

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

MARINA MAURO GOMES

Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de malte submetido a pré-tratamentos físicos

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2019



MARINA MAURO GOMES

Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de malte submetido a pré-tratamentos físicos

Dissertação de mestrado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Bernadete A. Varesche.

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

G633a           Gomes, Marina Mauro  
                  Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de malte  
                  submetido a pré-tratamentos físicos / Marina Mauro  
                  Gomes; orientadora Maria Bernadete Amâncio Varesche.  
                  São Carlos, 2019.

                  Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação  
                  em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de  
                  Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de  
                  Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,  
                  2019.

                  1. Biomassa lignocelulósica. 2. Resíduo de  
                  cervejaria. 3. Reator hidrotérmico. 4. Pré-tratamento  
                  em autoclave. 5. Metodologia de superfície de resposta.  
                  I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **MARINA MAURO GOMES**.

Título da dissertação: "Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de milho submetido a pré-tratamentos físicos".

Data da defesa: 09/05/2019.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

Profa. Associada **Maria Bernadete Amancio Varesche Silva**  
(Orientadora)  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Dr. **Marcus César Avezum Alves de Castro**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- Rio Claro)

Aprovada

Prof. Dr. **Michel Brienzo**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- Rio Claro)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Eduardo Mario Mendiondo**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



Aos meus pais, Márcio e Lurdinha,  
aos meus irmãos Elisa e André,  
à Heloísa e vó Cema (*in memoriam*),  
com amor e gratidão.





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcio e Lurdinha, por todo amor, oportunidades oferecidas e apoio em minhas decisões pela vida. Agradeço também aos meus irmãos, Elisa e André, ao Pedro, meu primo, aos meus tios Maria e Antônio, por sempre terem palavras de carinho e incentivo.

À professora Maria Bernadete pela orientação e todo o aprendizado proporcionado desde a graduação. Muito obrigada!

Aos demais professores do LPB, Eugênio Foresti, Marcelo Zaiat, Márcia Damianovic e Wiclef por todos os ensinamentos.

Às técnicas do LPB, Isabel, Janja, Carol e Helô, as quais foram fundamentais, pela convivência, prontidão e eficiência em ajudar. Agradeço também à Juliana, Silvana e Fernando por todo o auxílio.

Aos colegas do LPB, pelas discussões e por compartilhar tantos conhecimentos.

Aos amigos Marie, Caroline, Mayra, Franciele, Schay, Henrique, Jean, Andressa, Camila e Isabele pela amizade, por fazerem tudo ser mais simples e leve.

À Universidade de São Paulo,

À Escola de Engenharia de São Carlos,

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Muito obrigada!



## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 Fluxograma operacional para avaliação da biodegradabilidade do BM nas granulometrias, majoritariamente de: 5,6 a 4,75 mm ( <i>in natura</i> ), 0,84 a 1,00 mm (triturado) e 0,59 a 0,84mm (moído).....	40
Figura 4.2 Fluxograma operacional para reatores com BM em granulometria majoritariamente de: 5,6 a 4,75 mm ( <i>in natura</i> ), 0,84 a 1,00 mm (triturado) e 0,59 a 0,84mm (moído) aplicados ao reator hidrotérmico. ....	41
Figura 4.3 Fluxograma operacional do DCC e DCCR para BM pré-tratado em sistema hidrotérmico. ....	42
Figura 4.4 Fluxograma operacional do DCCR para BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.....	43
Figura 4.5 BM lavado em água corrente (1) e seco a temperatura ambiente (2).....	44
Figura 4.6 Moinho de facas.....	44
Figura 4.7 BM após trituração em liquidificador (1) e BM após moagem (2).....	45
Figura 4.8 Unidade experimental do reator hidrotérmico. ....	50
Figura 4.9 Fluxograma operacional para a avaliação da biodegradabilidade do BM em granulometrias reduzidas.....	51
Figura 4.10 Fluxograma operacional para avaliação dos efeitos do pré-tratamento hidrotérmico aliado a redução da granulometria do BM. ....	51
Figura 5.1 Granulometria do BM <i>in natura</i> .....	61
Figura 5.2 Granulometria do BM triturado. ....	62
Figura 5.3 Granulometria do BM moído.....	62
Figura 5.4 Variação temporal da produção de metano. ....	65
Figura 5.5 Variação temporal de carboidratos solúveis dos reatores em batelada em diferentes condições do BM. ....	67
Figura 5.6 Variação temporal de matéria orgânica solúvel dos reatores em batelada em diferentes condições do BM. ....	69
Figura 5.7 Ácidos orgânicos em função dos ensaios em reatores em batelada nas condições (IN), (INH), (T), (TH), (M) e (MH).....	71
Figura 5.8 Perfil de bandas do DGGE para domínio Bacteria e Archaea. ....	73
Figura 5.9 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para o domínio Bacteria. ....	75
Figura 5.10 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para o domínio Bacteria. ....	75

Figura 5.11 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea.....	77
Figura 5.12 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para o domínio Archaea.....	77
Figura 5.13 Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis: temperatura ( $x_1$ ) e tempo ( $x_2$ ).....	80
Figura 5.14 Superfície de resposta para os efeitos da temperatura e tempo do pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico. ....	81
Figura 5.15 Variação temporal de metano para os ensaios de DCC.....	82
Figura 5.16 Variação temporal de carboidratos totais nos ensaios do DCC. ....	86
Figura 5.17 Variação temporal das concentrações de matéria orgânica solúvel para os ensaios do DCC.....	88
Figura 5.18 Variação das concentrações de ácido acético, propiônico e butírico nos ensaios do DCC.....	89
Figura 5.19 Perfil de bandas do DGGE para os domínios Bacteria (I) e Archaea (II) para os ensaios do DCC. ....	92
Figura 5.20 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para domínio Bacteria dos ensaios do DCC.....	93
Figura 5.21 Índices de Shannon -Wiener e Dominância para domínio Bacteria dos ensaios do DCC.....	93
Figura 5.22 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para domínio Archaea dos ensaios do DCC.....	95
Figura 5.23 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para domínio Archaea dos ensaios do DCC.....	95
Figura 5.24 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis ( $x_1$ ) temperatura, ( $x_2$ ) concentração de BM e ( $x_3$ ) hidrolisado. ....	98
Figura 5.25 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis ( $x_1$ ) temperatura e ( $x_2$ ) volume de hidrolisado. ....	99
Figura 5.26 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis ( $x_2$ ) concentração de BM e ( $x_3$ ) volume de hidrolisado. ....	100
Figura 5.27 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis ( $x_1$ ) temperatura e ( $x_2$ ) concentração de BM.....	101
Figura 5.28 Variação temporal da produção de metano a partir de ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico. ....	104
Figura 5.29 Eficiência de consumo de carboidratos totais para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico. ....	107

Figura 5.30	Concentração máxima e final de matéria orgânica para cada ensaio do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.....	109
Figura 5.31	Ácidos orgânicos na amostra inicial (I), intermediária (II) e final (III) dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico. ....	110
Figura 5.32	Produção máxima de metano associada ao pH final dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico. ....	111
Figura 5.33	Variação temporal da produção de metano para o ensaio de validação do DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico. ....	112
Figura 5.34	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM. ....	115
Figura 5.35	Superfície de resposta dos efeitos da interação entre as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM na produção de metano. ....	116
Figura 5.36	Curvas de contorno para efeitos da interação entre as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM na produção de metano. ....	116
Figura 5.37	Variação temporal para a produção de metano dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave. ....	118
Figura 5.38	Eficiência de consumo de carboidratos totais para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave. ....	121
Figura 5.39	Concentração máxima e final de matéria orgânica nos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave. ....	123
Figura 5.40	Ácidos orgânicos na amostra inicial (I), intermediária (II) e final (III) dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave. ....	125
Figura 5.41	Produção máxima de metano associada ao pH final para cada ensaio do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.....	126
Figura 5.42	Variação temporal da produção de metano para ensaio de validação do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.....	127
Figura 5.43	Estruturas do bagaço de malte in natura (A), pré-tratado em autoclave (B) e pré-tratado em reator hidrotérmico (C). ....	128
Figura 5.44	Microrganismos aderidos ao bagaço de malte pré-tratado em autoclave (D) e pré-tratado em reator hidrotérmico (E). ....	129



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1 Análise da composição do bagaço de malte em base seca (g/100g). .....	29
Tabela 3-2 Experimentos conduzidos em batelada para a digestão anaeróbia de bagaço de malte e outros resíduos lignocelulósicos. ....	39
Tabela 4-1 Composição do meio basal Zinder. ....	48
Tabela 4-2 Composição da solução traço de metais. ....	48
Tabela 4-3 Composição da solução de vitaminas. ....	49
Tabela 4-4 Composição do meio reacional. ....	49
Tabela 4-5 matriz do Delineamento Composto Central. ....	53
Tabela 4-6 Delineamento Composto Central Rotacional para as variáveis (x1) temperatura, (x2) concentração de BM, (x3) volume de hidrolisado. ....	54
Tabela 4-7 Valores codificados para o DCCR de três fatores. ....	54
Tabela 4-8 Delineamento Composto Central Rotacional para otimização da (x1) temperatura e (x2) concentração de BM. ....	55
Tabela 4-9 Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para BM pré-tratado em autoclave. ....	56
Tabela 5-1 Composição mineral do BM. ....	59
Tabela 5-2 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada para diferentes condições do BM. ....	66
Tabela 5-3 Parâmetros físico-químicos dos ensaios em batelada para diferentes condições do BM. ....	66
Tabela 5-4 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Bacteria. ....	74
Tabela 5-5 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea. ....	76
Tabela 5-6 Matriz do DCC para as variáveis (x1) temperatura e (x2) tempo de pré-tratamento e respostas obtidas e predita. ....	79
Tabela 5-7 ANOVA para o efeito da temperatura e tempo de pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico. ....	79
Tabela 5-8 Características dos pré-tratamentos em reator hidrotérmico e a produção máxima de metano obtida. ....	81
Tabela 5-9 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada do DCC com diferentes condições de pré-tratamento do BM. ....	82

Tabela 5-10 Parâmetros físico-químicos dos ensaios em batelada para o DCC em diferentes condições de pré-tratamento do BM. ....	86
Tabela 5-11 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Bacteria. ....	92
Tabela 5-12 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea. ....	94
Tabela 5-13 Matriz do DCCR para as variáveis (x1) temperatura, (x2) concentração de BM e (x3) volume de hidrolisado.....	97
Tabela 5-14 ANOVA para o efeito da temperatura, concentração de BM e volume de hidrolisado. ....	98
Tabela 5-15 Parâmetros cinéticos referentes às curvas de produção de metano para ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico. ....	105
Tabela 5-16 Matriz do DCCR para as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM.....	113
Tabela 5-17 ANOVA para o efeitos da temperatura de operação e da concentração de BM pré-tratado em autoclave na produção máxima de metano. ....	114
Tabela 5-18 Parâmetros cinéticos referentes às curvas de produção de metano do DCCR com BM pré-tratado em autoclave. ....	118
Tabela 6-1 Produção máxima de metano para os ensaios de avaliação da biodegradabilidade do BM.....	131
Tabela 6-2 Produção máxima de metano para os ensaios com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.....	132
Tabela 6-3 Produção máxima de metano para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico. ....	133
Tabela 6-4 Produção máxima de metano para os ensaios com BM pré-tratado em autoclave.....	134



## RESUMO

GOMES, M.M. Avaliação da digestão anaeróbia do bagaço de malte submetido a pré-tratamentos físicos. 146 f. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2019.

O bagaço de malte, resíduo com maior significância na indústria cervejeira, pode ser utilizado na digestão anaeróbia para obtenção de gás metano, fonte energética passível de abastecer etapas da fabricação de cerveja. Nessa pesquisa foi avaliado o rendimento metanogênico em triplicata de reatores anaeróbios em batelada mantidos a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , sem agitação, empregando como substrato o bagaço de malte (BM) nas seguintes condições: (1) *in natura*, (2) pré-tratado em reator hidrotérmico e (3) pré-tratado em autoclave. O inóculo consistiu em consórcio microbiano misto advindo de lodo anaeróbio de reator UASB do tratamento de água residuária de avicultura. A princípio, foi realizada avaliação da aplicação do BM (a) *in natura* (IN), após trituração (T), após moagem (M), (b) *in natura* e pré-tratado hidrotérmicamente (TH), (c) triturado e pré-tratado hidrotérmicamente e (d) (MH) moído e pré-tratado hidrotérmicamente. O pré-tratamento hidrotérmico ocorreu a  $180^\circ\text{C}$  por 15 minutos a 9,6 bar. Observou-se a maior produção de metano para MH ( $320,64 \pm 7,72 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) e maior concentração de ácidos orgânicos para M e MH, sobretudo ácido butírico para M ( $388,32 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e ácido acético para MH ( $192,47 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Em seguida, foi realizado o delineamento composto central (DCC) com a finalidade de analisar a interação entre as variáveis ( $x_1$ ) temperatura do pré-tratamento e ( $x_2$ ) tempo de pré-tratamento visando à aplicação dessa biomassa em reatores em batelada. Para tanto, foram conduzidos 7 experimentos em triplicata, de 150 a  $210^\circ\text{C}$  com duração de 10 a 20 minutos de pré-tratamento hidrotérmico. A maior produção foi observada com BM pré-tratado a  $210^\circ\text{C}$  por 10 minutos ( $411,64 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ), e 90,45% de redução de carboidratos totais ( de  $142 \pm 1,41 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $14,0 \pm 1,41 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 81,12% de matéria orgânica ( de  $3.900 \text{ mg.L}^{-1}$  para  $627,5 \pm 3,53 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Utilizou-se do BM pré-tratado nas citadas condições para o DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com as variáveis ( $x_1$ ) temperatura de incubação, ( $x_2$ ) concentração de BM ( $x_3$ ) volume do líquido hidrolisado resultante do pré-tratamento hidrotérmico. Para tanto, 17 ensaios em batelada foram conduzidos em triplicata. Por meio da metodologia de superfície resposta, a condição ótima predita via ajuste do modelo foi a de  $36^\circ\text{C}$ , com  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  de BM e 3 mL de hidrolisado. Além disso, foi realizado DCCR para BM autoclavado por 30 minutos para a otimização da produção de metano a partir da interação entre as variáveis ( $x_1$ ) temperatura de operação e ( $x_2$ ) concentração de BM. Foram conduzidos 11 ensaios, em triplicatas, em temperaturas de  $30,86$  a  $59 \pm 1^\circ\text{C}$ , e  $8,34$  a  $19,66 \text{ mg.L}^{-1}$  de BM. Aplicando-se metodologia de superfície de resposta, obteve-se condição ótima predita a  $35^\circ\text{C}$  e  $14 \text{ mL}^{-1}$  de BM, com produção máxima de  $289,10 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ .

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; Resíduo de cervejaria; Reator hidrotérmico; Pré-tratamento em autoclave; Metodologia de superfície de resposta.



## ABSTRACT

GOMES, M.M. **Anaerobic digestion from brewery spent grain subject to physical pretreatment.** 2019. 146 f. Dissertation (Master) - Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2019.

Brewers spent grain (BSG), the major by-product of brewing industry, can be used in anaerobic digestion for methane production, which can provide energy for brewery process. This study evaluated the methane production in batch reactors, in triplicates, at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , without agitation, from BSG under the following conditions: (1) raw, (2) pretreated in hydrothermal system (3) pretreated in autoclave. The inoculum source was obtained from upflow anaerobic sludge blanket reactor used in slaughterhouse of poultry. At first, an evaluation was accomplished using BSG (a) raw, (IN), pretreated, ground (T) milled (M), (b) raw and pretreated in hydrothermal system (INH), ground and pretreated in hydrothermal system (TH) and milled and pretreated in hydrothermal system. Hydrothermal pretreatment occurred at  $180^\circ\text{C}$  for 15 minutes under 9.6 bar. The highest methane production was observed in MH ( $320.64 \pm 7.72 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) and higher volatile fatty acids was verified in M and MH, mainly butyric acid in M ( $388.32 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and acetic acid in MH ( $192.47 \text{ mg.L}^{-1}$ ). A central composite design (CCD) involving two factors was held for evaluate the interaction between ( $x_1$ ) hydrothermal pretreatment temperature and ( $x_2$ ) hydrothermal pretreatment time for BSG. The range of temperature was  $150\text{-}210^\circ\text{C}$  with runtime of 10 -20 minutes. Seven batch reactors assays was reached and the highest methane production ( $411.64 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) was verified for BSG pretreated at  $210^\circ\text{C}$  for 10 minutes under 12 bar. In this assay was observed carbohydrates consume of 90.45% (from  $142 \pm 1.41 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $14.0 \pm 1.41 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and COD removal of 81.12% (from  $3.900 \text{ mg.L}^{-1}$  to  $627.5 \pm 3.53 \text{ mg.L}^{-1}$ ). BSG pretreated under this condition was employed in a CCD, with seventeen batch reactors condition, involving three variables ( $x_1$ ) incubation temperature, ( $x_2$ ) BSG concentration and ( $x_3$ ) hydrolizate liquid from hydrothermal pretreatment. According to methodology of the CCD and response surface, the highest methane production was predicted in assay at  $36^\circ\text{C}$ , with  $18 \text{ mg.L}^{-1}$  and 3 mL of hydrolizate liquid. A CCD using BSG pretreated in autoclave was reached with two variables ( $x_1$ ) incubation temperature and ( $x_2$ ) BSG concentration. For this purpose, eleven batch reactors conditions were conducted, in triplicates, at temperature in the range of  $30,86 - 59,14^\circ\text{C}$  and BSG concentration in the range of 8.34 a  $19.66 \text{ mg.L}^{-1}$ . By means of methodology of the CCD and response surface, the optimal predicted condition was at  $35^\circ\text{C}$  and  $14 \text{ mg.L}^{-1}$  with methane production of  $289.10 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ .

Keywords: Lignocellulosic biomass; Brewery waste; Hydrothermal reactor; Autoclave pretreatment; Response surface methodology.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	23
2	OBJETIVO GERAL.....	24
2.1	Objetivos específicos.....	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1	Indústria cervejeira e bagaço de malte .....	25
3.2	A composição lignocelulósica do bagaço de malte.....	28
3.3	Fracionamento da biomassa lignocelulósica.....	29
3.4	Digestão anaeróbia .....	33
3.5	A digestão anaeróbia do bagaço de malte e de outros materiais lignocelulósicos .....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Fluxograma Operacional .....	40
4.2	Inóculo.....	43
4.3	Substrato .....	44
4.3.1	Caracterização do bagaço de malte .....	45
4.3.1.1	Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF) .....	45
4.3.1.2	Extrativos e Lignina Klason .....	45
4.3.1.3	Granulometria .....	46
4.3.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
4.4	Meio de Cultura .....	47
4.5	Pré-tratamento do bagaço de malte em reator hidrotérmico.....	50
4.6	Reatores em batelada.....	50
4.6.1	Avaliação da biodegradabilidade do bagaço de malte in natura e submetido à moagem e trituração.....	50
4.6.2	Planejamento experimental por Delineamento Composto Central para o bagaço de malte em reator hidrotérmico .....	52
4.6.3	Planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional para bagaço de malte em reator hidrotérmico .....	53
4.6.4	Delineamento Composto Central Rotacional para o bagaço de malte em autoclave .....	55
4.6.5	Análises físico-químicas e cromatográficas .....	56

4.7	Caracterização Microbiana .....	57
4.7.1	Análises de Biologia Molecular .....	57
4.8	Ajuste dos dados experimentais .....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1	Caracterização química do bagaço de malte .....	58
5.1.1	Teor de umidade e ST, STV e STF .....	58
5.1.2	Minerais .....	58
5.1.3	Lignina Klason e carboidratos totais solúveis .....	60
5.1.4	Granulometria do bagaço de malte.....	61
5.2	Reatores em batelada.....	62
5.2.1	Ensaio com bagaço de malte <i>in natura</i> .....	62
5.2.2	Caracterização microbiana.....	72
5.2.2.1	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante .....	72
5.2.3	Planejamento experimental por Delineamento Composto Central para o bagaço de malte em reator hidrotérmico .....	78
5.2.3.1	Caracterização microbiológica.....	91
5.2.4	Planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional para bagaço de malte em reator hidrotérmico .....	96
5.2.4.1	Validação do modelo de produção de metano .....	112
5.2.5	Delineamento Composto Central Rotacional para o bagaço de malte em autoclave .....	112
5.2.5.1	Validação do modelo de produção de metano .....	127
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	127
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
7	CONCLUSÕES.....	135
8	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	136
	REFERÊNCIAS.....	137

# 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de redução da carga poluente gerada em processos industriais é preocupação atual, sobretudo quando se deseja aliar tratamento eficiente, disposição final adequada e custo reduzido. Seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, por pressão política ou social, indústrias têm adotado políticas que evitem o desperdício, adaptando o processo produtivo com vistas à reciclagem ou reincorporação de subprodutos. Dessa forma, para muitas empresas os resíduos gerados junto à linha de produção não são rejeitos, mas matéria-prima para um novo processo.

Na indústria cervejeira são produzidas grandes quantidades de subprodutos, dentre eles os mais significativos são o bagaço de malte, resultante da etapa de filtração, e as leveduras residuais da fermentação. O bagaço de malte é amplamente disponibilizado durante todo o ano a valor reduzido e até mesmo sem custo. Embora, possa ser reutilizado no setor agropecuário e alimentício, não raro entraves com o transporte desse resíduo contribui para a sua disposição em aterros.

Em 2017, o Brasil correspondia ao terceiro maior produtor mundial de cerveja do mundo, com volume de 14 bilhões de litros, atrás da China e Estados Unidos, os quais produziram 39,8 e 21,7 bilhões de litros no mesmo ano, respectivamente (Kirin Holdings, 2018). Portanto, considerando que são gerados de 14 a 20 kg de bagaço de malte a cada 100 litros de cerveja produzida (MATHIAS et al., 2015), estima-se residual da ordem de 2 milhões de toneladas para a produção brasileira no mesmo período.

Os resíduos sólidos da indústria cervejeira são biodegradáveis devido a sua composição rica em carboidratos e, diante da sua vasta disponibilidade, uma opção ambiental e economicamente interessante é a digestão anaeróbia. A aplicação desse processo biológico torna-se promissora no que se refere à recuperação de energia e à reutilização de resíduos. Assim, a recuperação de biogás a partir da degradação anaeróbia da matéria orgânica descartada durante o processo industrial vai ao encontro da necessidade de redução de custos com disposição de resíduos e da utilização de fonte de energia alternativa aos combustíveis fósseis, o que significa economia e garantia de fonte energética.

Em razão das numerosas etapas que exigem água a temperaturas elevadas, inclusive na maceração e fervura, é usual caldeiras movidas a óleo em operação na fabricação de cervejas em grande escala. Além disso, é necessário energia para resfriamento após a fermentação e refrigeração nos locais de armazenamento. Geralmente, essa demanda é suprida por aparelhos

elétricos de ar condicionado e refrigeradores dependentes de combustível fóssil (SANTOS e RIBEIRO, 2005; STURM et al., 2012).

Após a etapa de filtração, o bagaço de malte é caracterizado por elevado teor de umidade e, caso seja destinado à nutrição animal, requer uma etapa de secagem para redução do volume transportado acarretando em gasto energético. Diante da alta demanda por energia em cervejarias, é bastante conveniente um sistema combinado de energia utilizando-se a combustão de metano.

Algumas formas de pré-tratamentos tem sido estudadas com o intuito de romper a estrutura lignocelulósica do bagaço de malte e potencializar a biodegradabilidade dessa biomassa. Entretanto, um procedimento industrial bem sucedido e sustentável ainda não foi estabelecido para eficaz conversão da parcela pouco degradável do material.

Por meio deste trabalho se propôs avaliar o potencial de produção de metano a partir do bagaço de malte gerado na indústria cervejeira, bem como a aplicação de pré-tratamentos a esse resíduo, com o objetivo de se obter o melhor rendimento metanogênico mediante a otimização do processo por planejamento experimental.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a produção de metano e ácidos orgânicos do bagaço de malte de cevada *in natura* e condicionado a dois pré-tratamentos distintos, em sistema hidrotérmico e autoclave.

### 2.1 Objetivos específicos

- i. Avaliar morfológicamente o substrato, BM, com vistas à digestão anaeróbia antes e após os pré-tratamentos em autoclave e reator hidrotérmico;
- ii. Comparar a biodegradabilidade e conversão em metano do BM após pré-tratamentos físicos de redução da granulometria do substrato utilizando consórcio microbiano misto;
- iii. Otimizar o tratamento hidrotérmico para o BM quanto a temperatura e ao tempo do tratamento em sistema hidrotérmico visando às melhores condições para a produção de metano;
- iv. Avaliar as comunidades de bactérias e arqueias metanogênicas dos ensaios com bagaço de malte antes e após o pré-tratamento físico de redução de granulometria;



- v. Avaliar os efeitos da severidade do pré-tratamento na estrutura das comunidades de bactérias e arqueias;
- vi. Avaliar os efeitos da temperatura de incubação, concentração de BM e líquido hidrolisado residual do sistema hidrotérmico na digestão anaeróbia do BM pré-tratado em reator hidrotérmico em relação a produção de metano e ácidos orgânicos;
- vii. Avaliar os efeitos da temperatura de incubação e concentração de substrato para o BM pré-tratado em autoclave em relação a produção de metano e ácidos orgânicos;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Indústria cervejeira e bagaço de malte

A cerveja está entre as bebidas mais consumidas no mundo, tornando o setor cervejeiro bastante relevante para a economia (HAY et al., 2017). No Brasil, a tendência de crescimento expressivo de cervejarias foi relatada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) uma vez que, em 2014, haviam 356 unidades produtoras registradas e, em 2018, esse montante passou a 835 unidades em funcionamento.

Na fabricação da cerveja são usados padrões básicos de processos e matérias-primas, cujas etapas ocorrem, essencialmente, em batelada nas quais os principais componentes adicionados são malte de cevada, lúpulo, água e leveduras (JATUNARACHT et al., 2006).

A princípio, ocorre o processo de malteação devido à necessidade de se elevar o potencial enzimático dos grãos de cevada, sendo esta dividida em maceração, germinação e secagem (REINOLD, 1997; TSCHOPE, 2001). Desse modo, os grãos de cevada são recebidos a granel da lavoura, passam por limpeza para remoção de impurezas e, em seguida, são selecionados conforme seu tamanho, em três ou quatro graduações, com vistas à obtenção de malte homogêneo para posterior armazenagem em silos (SANTOS; RIBEIRO, 2005).

Ao final dessa triagem, a cevada necessita ser armazenada por período de 4 a 6 semanas para atingir alto poder germinativo, o que é comprovado por testes laboratoriais (TSCHOPE, 2001).

A maceração é a etapa em que a cevada absorve água até atingir 50% de umidade em relação a seu peso, sob condições controladas de temperatura e oxigênio. Dessa forma, as sementes saem do estado de latência e incham devido à absorção de água, caracterizando o princípio da germinação (REINOLD, 1997; SANTOS; RIBEIRO, 2005). Em seguida, as mesmas são dispostas em estufas sob condições controladas de temperatura (15 - 21°C) e

umidade, resultando na ativação das principais enzimas do malte por período de 5 a 8 dias, quando a germinação é finalizada. O malte é submetido à secagem para remoção de água e caramelização dos grãos, transformando-os em malte. A temperatura e tempo de secagem, bem como a umidade final do malte são fatores que dependem da receita em que o malte será empregado (REINOLD, 1997; TSCHOPE, 2001; SANTOS; RIBEIRO, 2005).

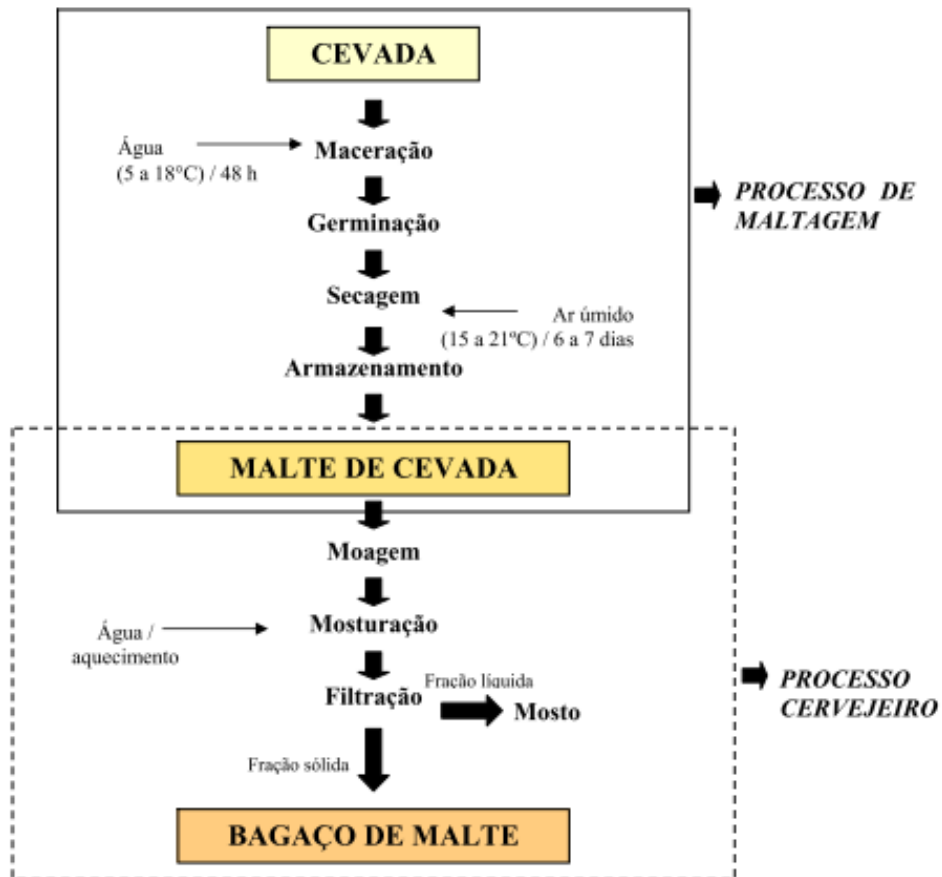
A partir de então, pode-se iniciar a preparação do mosto cuja composição é uma solução de açúcares decorrente da sacarificação do amido presente no malte e no adjunto, que são cereais não maltados, por exemplo, milho e arroz, frequentemente adicionados à receita, sejam por razões econômicas ou para tornar o produto final mais leve (JATUNARACHT et al., 2006).

O preparo do mosto consiste em cozinhar o malte, o que inclui moagem, mosturação, separação e filtração, o cozimento em si e etapas de clarificação e resfriamento. Na mosturação, o malte moído é misturado à água aquecida, em torno de 65°C, com o objetivo de induzir a hidrólise enzimática, sobretudo do amido, obtendo-se açúcares fermentáveis (maltose, maltotriose e glicose), bem como não-fermentáveis (dextrinas). Em seguida, procede-se a fervura, o resfriamento e a filtração para a remoção dos resíduos de grãos de malte e adjuntos. A parte sólida retida é denominada bagaço de malte ou *dreche*, enquanto a fase líquida, o mosto, será substrato para fermentação (SANTOS; RIBEIRO, 2005; DRAGONE, 2007). Fluxograma ilustrativo da geração bagaço de malte está delineado na Figura 3.1.

De acordo com Santos e Ribeiro (2005), a maioria dos resíduos sólidos é gerada nas etapas de filtragem, envase e tratamento de água de efluentes líquido. Os principais subprodutos da indústria cervejeira são o bagaço de malte umidificado, grãos de cevada, leveduras e proteínas insolúveis resultantes do processo (JATUNARACHT et al.2006).

O bagaço de malte corresponde entre 20 a 31%, em média, do peso original do malte, o que representa cerca de 20 kg por 100 litros de cerveja, considerando o resíduo úmido (MUSSATO et al., 2006). Jatunaracht et. al (2006), a partir de dados obtidos da Ceylon Brewery Ltd. Sri Lanka, calcularam que 200 gramas de bagaço de malte e onze litros de água residuária são formados para cada litro de cerveja produzido naquela indústria. Logo, para indústria cervejeira de grande porte, o volume residual é significativo e podem acarretar problemas ambientais se mal gerenciados.

Figura 3.1- Fluxograma de obtenção do bagaço de malte.



Fonte: DAGRONE et al. (2006).

Nos últimos anos, o tratamento de águas residuárias de cervejarias tem atraído maior atenção. Geralmente, o tratamento de efluentes de cervejaria tem sido aprimorado utilizando-se sistemas anaeróbios com biomassa granular, em reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB) e, mais recentemente, reatores em batelada sequencial (ASBR) (ZUPANČIČ et al., 2017). Tanto, a levedura residual, quanto o bagaço de malte tem sido estudados como substrato em decorrência da sua alta disponibilidade (PANJIČKO et al., 2015). Entretanto, em reatores UASB problemas significativos são observados na degradação de substratos com alto teor de sólidos, o que ocorre quando o afluente é composto por elevadas concentrações de levedura residual e bagaço de malte (ZUPANČIČ et al., 2017).

O bagaço de malte oriundo da fabricação de cerveja é empregado, tanto na alimentação animal, quanto na humana, uma vez que é rica fonte de fibras e proteínas. Atualmente, o mercado primário desse subproduto é a alimentação do gado leiteiro (KAUR, SAXENA, 2004; STURM, 2012). A farinha de bagaço de malte é inserida na panificação com restrições em virtude do seu forte aroma e sabor. A propriedade sensorial de produtos da

panificação tem sido investigada ao longo dos anos e, é conhecido que a adição de fibras geralmente resulta em produtos mais escuros, de menor volume, maior dureza e estrutura mais densa (KTENIOUDAKI et al., 2015). A substituição de farinha de trigo por farinha de bagaço de malte, em até 10% em massa, não altera a textura e implica em aroma característico do bagaço de malte, sendo bem aceito pelos consumidores (KTENIOUDAKI et al., 2013).

Além disso, trata-se de material com alto teor de umidade, tornando-se rapidamente deteorável e, caso seja destinado à alimentação humana ou animal, o mesmo deve passar por secagem com o objetivo de reduzir custos com transporte e armazenamento (JATUNARACHCHI et al., 2006).

### **3.2 A composição lignocelulósica do bagaço de malte**

Os principais componentes do bagaço de malte são as paredes formadas por camadas de casca-pericarpo-semente, ricas em celulose, polissacarídeos não-celulósicos, lignina, bem como proteínas e lipídeos (PANJIČKO et al., 2015). Embora a composição do bagaço de malte seja variável de acordo com a espécie de cevada, além do processo de malteação e aqueles de moagem, mosturação e clarificação (CELUS et al., 2006), em geral, o material lignocelulósico é rico em proteínas e fibras, que correspondem a cerca de 20 e 70% da sua estrutura, respectivamente (PANJIČKO et al., 2015).

Em virtude do seu alto teor de umidade, valor nutricional e significativa presença de açúcares fermentáveis residual, o bagaço de malte é muito instável e suscetível a contaminação microbiana, sobretudo por fungos filamentosos. Portanto, diferentes técnicas de conservação devem ser utilizadas, tais como secagem, congelamento e adição de conservantes químicos (MATHIAS et al., 2015).

Possível alternativa para a produção de energia a partir do bagaço de malte é a digestão anaeróbia. No entanto, a biodegradação do bagaço de malte é laboriosa para microrganismos anaeróbios em razão, sobretudo, da estrutura complexa formada pela lignina, provida de alta massa molecular, estabilidade química e insolubilidade, a qual envolve a matéria orgânica degradável (PANJIČKO et al., 2015). A presença de lignina e hemicelulose, de fato, dificulta o acesso da celulase ao substrato de forma a inibir a degradação da celulose (PIERRE et al., 2011). Portanto, é de interesse o pré-tratamento do bagaço de malte em benefício de maior susceptibilidade do material à digestão anaeróbia (PANJIČKO et al., 2015). Pré-tratamentos de diversos tipos tem sido estudados visando o rompimento da estrutura lignocelulósica, os quais podem ser químicos, físicos e físico-químicos.

Na Tabela 3-1 está disposta a composição lignocelulósica do bagaço de malte em base seca segundo caracterização realizada por alguns autores.

Tabela 3-1 Análise da composição do bagaço de malte em base seca (g/100g).

Celulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Cinzas (%)	Referência
17- 25	8-28	28	4,6	Mussato e Roberto (2005)
25,4	11,9	nd	2,4	Kanauchi et al. (2001)
23,3	24,6	nd	nd	Bochmann et al. (2015)
42	18	nd	8-30	Ezeonu e Okaka (1996)
9-25	nd	19-40	3,3	Xiros et al. (2008)
24	nd	15	nd	Pierre et al. (2011)
40-50	nd	20-30	nd	Ogeda e Petri (2010)
31-33	20-22	nd	nd	Jay et al. (2008)

\*nd se refere aos valores não determinados.

### 3.3 Fracionamento da biomassa lignocelulósica

A biomassa celulósica é formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio entre si. Por sua vez, a celulose é um polissacarídeo constituído por moléculas de glicose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. As cadeias celulósicas formam extensas fibras envolvidas por hemicelulose e lignina. A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado composto, sobretudo, por D-xilose, mas também por L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido-manurônico em menores quantidades; e a lignina é uma macromolécula polimérica tridimensional constituída por unidades de fenilpropano interligadas (WYMAN *et al.*, 2005; OGEDA e PETRI, 2010).

A lignina consiste em polímero reticulado de compostos fenólicos com uma complexa estrutura molecular, a qual está presente em paredes celulares das plantas, proporcionando sustentação, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos (PEREZ *et al.*, 2007). Os processos hidrolíticos, realizados por bactérias e fungos, não são triviais em virtude das complexas interações entre celulose, hemicelulose e lignina, haja vista a natureza cristalina da celulose e a barreira física formada pela lignina em torno da celulose (OGEDA ; PETRI, 2010). Geralmente, por meio de hidrólises enzimáticas tem-se rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto se uma etapa de pré-tratamento for aplicada no material lignocelulósico, o rendimento pode ser superior a 90% (GHOSH; GHOSE, 2003).

Quando hidrolisada, a celulose origina glicose e celobiose (um dímero de glicose), enquanto as hidrólises de ligninas e hemicelulose geram açúcares e subprodutos, os quais inibem a atividade microbiana fermentativa. Dentre esses compostos tem-se, sobretudo, os difenóis, derivados de fenilpropano, furfural, ácido acético e cetonas (AGUILAR et al., 2002; OGEDA e PETRI, 2010). Portanto, concentrações desses subprodutos podem ser inibitórias para as etapas seguintes da digestão anaeróbia (acidogênese, acetogênese e metanogênese).

A metanogênese é especialmente sensível, o que confere à produção de biogás da biomassa lignocelulósica maior dificuldade (PANJIČKO et al., 2015). Em razão de produtos de degradação inibidores de microrganismos em processos fermentativos, é necessário obter hidrolisados com baixas concentrações destes compostos, o que requer estudos para otimização das condições operacionais a serem empregadas (MUSSATTO; ROBERTO, 2005).

Por meio da explosão a vapor do material promove-se o rompimento dos componentes da estrutura lignocelulósica pelo aquecimento que pode levar à formação de compostos orgânicos solúveis devido às forças de cisalhamento e expansão (CARRERE et al., 2016)

Alternativa de pré-tratamento amplamente empregada é o processo hidrotérmico por meio do qual a biomassa é submetida ao vapor pressurizado por certo tempo e é, então, subitamente despressurizada. Durante o processo, é formada uma fração sólida cujo conteúdo é celulose, bem como, uma fração líquida, constituída por hexoses (glicose) e pentoses (xilose e arabinose), visto que o método congrega forças mecânicas (descompressão explosiva que provoca a separação das fibras) e efeitos químicos (hidrólise dos grupos acetila presentes na hemicelulose) (ALVIRA et al., 2010; LEI et al., 2013).

Soares et al. (2018) compararam o rendimento de hidrogênio obtido a partir de bagaço de cana-de-açúcar entre ensaios com o substrato *in natura* e tratado por meio hidrotérmico. O tratamento foi realizado em faixas de temperaturas de 150-210 °C em intervalos de 10-20 minutos e variação de severidade entre 2,77 e 4,41. Para as condições do tratamento com maior severidade (210°C por 15 minutos a 20 bar) promoveu-se maior recuperação de xilose e lignina, bem como maior liberação de furfural, 5-hidroximetil furfural (HMF) e ácidos orgânicos no hidrolisado líquido. Constatou-se que quanto maior a severidade, maior foi a recuperação de açúcares, bem como, a liberação de fenóis. No entanto, com a aplicação do pré-tratamento hidrotérmico (210°C por 15 minutos a 20 bar), foi obtido melhor rendimento de hidrogênio (5,17 mmol.L<sup>-1</sup>) se comparado ao bagaço *in natura* (3,52 mmol.L<sup>-1</sup>).

Montoya e Varesche (2017) testaram o pré-tratamento hidrotérmico em polpa de café, variando o tempo de reação entre 10 e 30 minutos e determinando a faixa de temperatura para maior concentração de carboidratos (51 e 58%) e fração líquida com menor concentração de fenol (598 a 741 mg.L<sup>-1</sup>). Os autores observaram para a polpa de café moída em tratamento hidrotérmico prévio a 180 °C por 15 minutos a maior produção de H<sub>2</sub> (7,2 mmol H<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>).

Os efeitos da temperatura e tempo em cada condição de pré-tratamento pode ser avaliado correlacionando-os com o fator de severidade (RUIZ et al., 2013). A severidade (Ro) é calculada segundo a Equação (1):

$$\log Ro = \log \left[ t \exp \left( \frac{T-100}{14,75} \right) \right] \quad (1)$$

Em que:

T= temperatura (°C);

t= tempo de pré-tratamento (minutos).

O aumento da severidade de pré-tratamentos pode favorecer a formação de compostos potencialmente inibidores da fermentação-metanogênese, entre os quais: 5-HMF, elevadas concentrações de ácidos (ácido acético, fórmico, levulínico), fenóis e furfural (RASMUSSEN et al., 2014). Em condições de maior severidade (4,13 e 4,41), há relatos que o furfural e 5-HMF são liberados em maiores concentrações no líquido hidrolisado, quando comparadas com condições de menores severidades (1,29 e 2,37). Parte da celulose amorfa e da hemicelulose é removida da fase sólida para a líquida na forma de glicose, arabinose, xilose e galactose após a explosão a vapor em altas severidades (ROCHA et al., 2015; BAËTA et al., 2017; SOARES et al., 2018).

Devido ao seu alto teor de açúcares solúveis, a fração líquida resultante do tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica pode ser utilizada também para obtenção de produtos de interesse em perspectiva de biorrefinaria, tais como etanol, biomateriais ou enzimas celulolítica (GULLÓN et al., 2012).

Kaparaju et.al. (2009) relataram bons resultados no que se refere à produção de etanol e biogás a partir das diferentes frações decorrentes da palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente. Barakat et al. (2012) demonstraram que compostos furânicos e monômeros fenólicos gerados da lignina, o siringaldeído e a vanilina, podem ser aclimatizados e convertidos à metano quando em concentração máxima de 1g.L<sup>-1</sup>. Todavia, a partir dessa concentração foi constatado efeito inibitório.

Costa et al. (2014) obtiveram produção de metano de  $195\text{L.kg}^{-1}$  com a fração líquida gerada em tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em sistema hidrotérmico a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Contudo, é impossível prever o potencial de produção de metano tendo em vista a severidade do pré-tratamento utilizada, uma vez que a liberação de compostos furânicos, derivados de lignina, concentrações de açúcares solúveis dependem do substrato em uso, configuração do reator hidrotérmico e se há utilização de agente catalítico (AHMAD et.al., 2018).

Hernandez e Edyvean (2008) pesquisaram a toxicidade para diferentes concentrações de fenol (0,5; 1; 2, 4 e  $8\text{ g.L}^{-1}$ ) no processo de anaerobiose em reatores em batelada incubados a  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Lodo da estação de tratamento de esgoto municipal de Rotherham, no Reino Unido, foi utilizado como fonte de inóculo ( $17,6\text{ g. L SSV}^{-1}$ ). Como substrato, empregaram  $2\text{g.L}^{-1}$  de glicose,  $2\text{g.L}^{-1}$  de extrato de levedura, bem como meio nutricional resultando em volume reacional de 140 mL. O percentual de inibição foi calculado em 48 horas de incubação, antes da estabilização dos ensaios, os quais tiveram duração de 96 horas. Hernandez e Edyvean (2008) concluíram que a adição de  $24,64 \pm 2,21$ ;  $120,63 \pm 7,03$  e  $309,21 \pm 5,03\text{ mg}$  de fenol acarretou em 20, 50 e 80% de redução da metanogênese, respectivamente. A completa inibição da metanogênese ocorreu a partir da adição de  $800\text{ mg.L}^{-1}$  de fenol.

Alternativa para rompimento de materiais lignocelulósicos é o pré-tratamento térmico da biomassa, que consiste na aplicação de temperatura e pressão específicos, gerando apenas uma fase sólida ao término do processo. Rabelo et al. (2018) avaliaram a produção de hidrogênio em reatores anaeróbios em batelada a partir do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e submetido ao pré-tratamento em autoclave ( $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 atm por 15 minutos) e em sistema hidrotérmico a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 16 bar de pressão por 10 minutos. Os autores verificaram valores para produção máxima de hidrogênio semelhantes,  $3,47\text{ mmol.L}^{-1}$  para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e  $3,79\text{ mmol.L}^{-1}$  para o pré-tratado em autoclave, respectivamente. Todavia, observaram maior velocidade de produção de  $\text{H}_2$  para o bagaço pré-tratado em autoclave ( $0,04\text{ mmol.L.dia}^{-1}$ ), em relação aquela observada para o substrato *in natura* ( $0,02\text{ mmol.L.dia}^{-1}$ ). Provavelmente, o pré-tratamento em autoclave pode ter favorecido a hidrólise e fermentação. Para o bagaço de cana-de-açúcar aplicado ao sistema hidrotérmico observaram menor produção de hidrogênio ( $1,67\text{ mmol.L}^{-1}$ ), o que foi relacionado com a possibilidade de inibição da atividade fermentativa por compostos liberados pela hidrólise do material lignocelulósico nessas condições.



A área superficial e o tamanho das partículas do substrato são fatores importantes para a taxa de degradação microbiana. A redução do tamanho das partículas e consequente aumento da área superficial pode favorecer o processo biológico quando o substrato possui alto teor de fibras e baixa degradabilidade, conduzindo a maior volume de biogás produzido (YADVIKA et al.,2004).

Algumas pesquisas foram desenvolvidas para estudar os efeitos do tamanho das partículas de substratos provenientes da agroindústria com o objetivo de obter alto rendimento metanogênico, nas quais moagem, trituração, corte e maceração foram aplicados como um pré-tratamento físico. Desse modo, a estrutura lignocelulósica é rompida supondo facilitar a etapa de hidrólise. No entanto, a composição lignocelulósica de variados tamanhos de partículas pode ter composição diferente e devem ser estudadas (DE LA RUBIA et al.,2011).

De La Rubia et al. (2011) pesquisaram a influencia de diferentes tamanhos de partículas de torta de girassol aplicada como substrato em reatores anaeróbios em batelada cuja fonte de inóculo foi lodo anaeróbio da estação de tratamento de esgoto municipal, incubados a 35°C. As dimensões de partículas analisadas foram 0,355-0,55m, 0,710-1,0 mm, 1,4-2.0 mm.

Os autores verificaram que não houve efeito significativo do tamanho das partículas de torta de girassol em relação aos parâmetros pH final, DQO, nitrogênio amoniacal solúvel e alcalinidade total. Contudo, observaram rendimento metanogênico mais expressivo quando foi utilizado partículas de 1,4 -2,0 mm ( $213 \pm 8$  mL de  $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_{\text{adicionado}}$ ) se comparado às partículas de 0,355-0,55m, 0,710-1,0 mm, com as quais foram obtidos  $182 \pm 2$  e  $190 \pm 4$  mL  $\text{CH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \text{SV}_{\text{adicionado}}$ , respectivamente. A diferença entre os desempenhos de produção de metano foram atribuídos à detecção de distintas composições químicas das partículas, que inclui hemicelulose, celulose, proteínas e carboidratos solúveis.

Diante disso, compreende-se que cada substrato possui características específicas e, portanto, sofrem alterações estruturais diferentes após a aplicação de pré-tratamentos. Não é possível comparar e prever resultados a partir de outro substrato.

### 3.4 Digestão anaeróbia

A conversão de macromoléculas complexas, como proteínas, carboidratos (polissacarídeos) e lipídeos em águas residuárias ou sólidos à metano e gás carbônico acontece em etapas metabólicas mediante a atuação de diversos grupos de microrganismos

(KHANAL et al., 2008). Este processo biológico de estabilização da matéria orgânica ocorre em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 3.2).

A hidrólise consiste na transformação de moléculas insolúveis e de alta massa em compostos orgânicos solúveis e mais simples, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos de cadeia longa, por intermédio de enzimas liberadas por bactérias fermentativas (grupo 1), (YADVIKA et al., 2004).

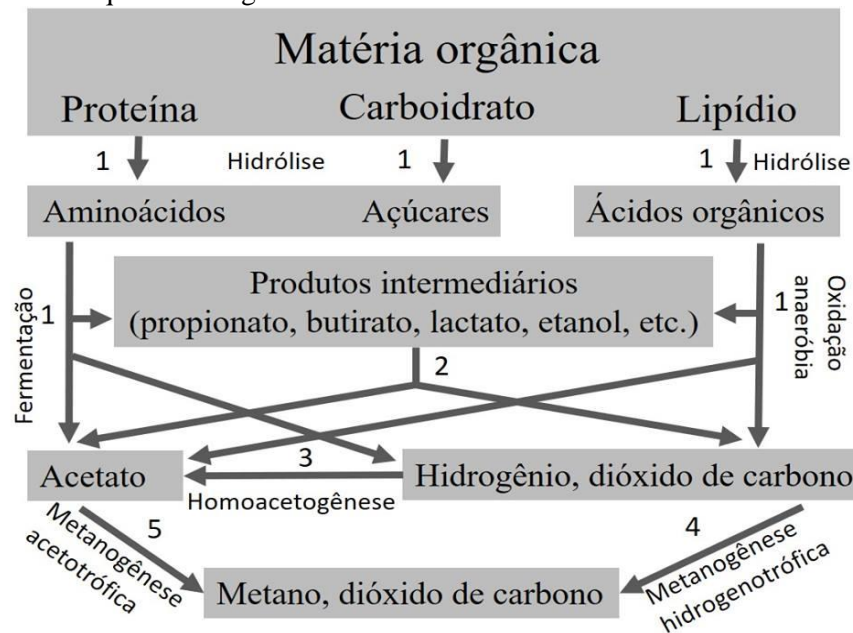
Na acidogênese acontece a conversão dos produtos solúveis provenientes da hidrólise em hidrogênio, álcoois e ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta, como ácido propiônico e ácido butírico. Estes ácidos orgânicos de cadeia curta e etanol são convertidos em ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono pela ação de bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio (grupo 2) na etapa de acetogênese. (LETTINGA et al., 1996; KHANAL, 2008).

Ácido acético, hidrogênio e gás carbônico são os substratos primários para a metanogênese, a qual transcorre por duas vias distintas: quando ocorre clivagem do ácido acético, produzindo dióxido de carbono e metano pela atuação de microrganismos conhecidos como metanogênicos acetotróficos (grupo 3) ou quando há redução de dióxido de carbono e consumo de hidrogênio por intermédio de metanogênicos hidrogenotróficos (grupo 4). Aproximadamente 2/3 do volume de metano é derivado da metanogênese acetoclástica, o que significa que essa via é a limitante para a produção de metano (YADVIKA et al., 2004). Assim, para que haja produção de metano por essa via, deve-se garantir remoção de ácido acético.

O gerenciamento de reatores anaeróbios envolve a adequação da taxa de carregamento orgânico, balanço de C/N, manutenção de valores de pH ideais e mitigação dos efeitos inibitórios (GARCÍA-GEN et al., 2014). A caracterização do substrato é essencial para o *design* e operação de reatores anaeróbios: os parâmetros de interesse incluem umidade, sólidos voláteis, estrutura do substrato, biodegradabilidade e potencial para produção de metano (ANGELIDAKI e SANDERS, 2004; NIETO et al. 2012).

O pH é um parâmetro indicador da estabilidade do processo capaz de impactar o crescimento microbiano (YADVIKA et al., 2004). Microrganismos metanogênicos se adaptam melhor à ambientes com pH entre 7,8 -8,2 enquanto microrganismos fermentativos e hidrolíticos, geralmente, se desenvolvem em pH entre 5,5-6,5(KHANAL,2008; SCHNURER; JARVIS, 2009). Em ambientes onde ambas culturas coexistem, o pH ótimo é entre 6,8 -7,4. Considerando que a metanogênese é a etapa limitante da digestão anaeróbia e que ambos os grupos de bactérias estão presentes, é necessário manter o pH do reator próximo ao neutro (KHANAL,2008).

Figura 3.2 - Esquema da digestão anaeróbia



- 1- Bactérias fermentativas; 2- Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3- Metanogênicas acetoclásticas; 4- Metanogênicas hidrogenotróficas e 5- Homoacetogênicas.

Fonte: Adaptado de Khanal, 2018.

A digestão anaeróbia, como outros processos biológicos, é fortemente dependente da temperatura. A taxa de conversão da matéria orgânica quando mais eficiente nas temperaturas entre 35- 40 °C é chamada mesofílica e, em temperaturas entre 55°C, é considerada termofílica (KHANAL, 2008). Condições mesofílicas são amplamente utilizadas para a digestão anaeróbia em virtude do processo, nessa faixa de temperatura, ser mais eficiente e exigir menos energia quando comparado com as condições termofílicas (SCHNURER; JARVIS, 2009). Para a digestão anaeróbia, geralmente a temperatura ideal está em torno de  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , considerada a faixa mesofílica ótima (BENBELKACEM et al., 2010).

Como em qualquer reação bioquímica, macronutrientes e micronutrientes são fundamentais no processo anaeróbio para viabilizar o crescimento microbiano (KHANAL et al., 2008). Os macronutrientes exigidos pelos microrganismos são carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo e enxofre (JAIN et al., 2015). Os micronutrientes são cobalto, zinco, molibdênio, níquel, ferro, cobre, selênio e tungstênio, bem como vitaminas, demandados em menores quantidades, mas essenciais ao crescimento (KAYHANIAN e RICH, 1995). A eficiência da digestão pode ser enriquecida pela adição dos nutrientes apropriados até atingir a concentração ótima ou, ainda, realizar a co-digestão de dois ou mais tipos de resíduos de modo a favorecer a disponibilidade de nutrientes (JAIN et al., 2015). No entanto, não estão

bem determinados quais são os elementos traços essenciais para a metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica. O excesso de nutrientes durante o processo pode ser tóxico ou inibitório para os microrganismos.

### 3.5 A digestão anaeróbia do bagaço de malte e de outros materiais lignocelulósicos

As cervejarias geram subprodutos com alto potencial de reaproveitamento e, embora sejam destinados à nutrição animal em sua grande maioria, pesquisas tem sido desenvolvidas com o objetivo de agregar valor a esses materiais, por exemplo, via digestão anaeróbia (VITANZA et al.,2016; ZUPANČIČ et al.; 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

Ezeonu e Okaka (1996) relataram a produção anaeróbia de metano em batelada, resultando em rendimento metanogênico de 2,29 mL. g<sup>-1</sup> STV de bagaço de malte, sem pré-tratamento, ao final de quinze dias de operação. Cama de frango (20g) foi adicionada ao reator para co-digestão com o bagaço de malte (100g) na proporção (1:5 p/p), o inóculo utilizado foi o rúmen bovino (20 ml), 800 ml de água aquecida a 37 °C foi adicionada resultando em volume total de 820 ml. A operação ocorreu em temperatura mesofílica (28-33°C).

Jatunaracht et al. (2006) utilizaram grãos de malte umidificados e triturados em liquidificador, em reatores de alta taxa e agitação de 400 rpm para condições A, B,C e D e sem agitação na condição E e F, sempre em temperatura mesofílica de 30 ou 37°C, aplicando lodo anaeróbio como inóculo. A alimentação foi feita utilizando-se a pasta formada por grãos de malte misturados ao lodo anaeróbio. Para os quatro reatores finais (C, D, E e F) verificou-se estabilidade da digestão anaeróbia, produzindo biogás contendo de 56-59% de metano e 25-31% de gás carbônico. Nessas condições, verificou-se pH de 7,5 a 7,8 e 57-744 mg.L<sup>-1</sup> de ácidos orgânicos voláteis. O rendimento máximo de metano foi de 596 mL.g<sup>-1</sup>SV, para o ensaio E. Os autores verificaram para maior taxa de carga orgânica, maior produção de biogás a 37° C.

Goberna et al.(2013) comprovaram que a aplicação do bagaço de malte e lodo anaeróbio (25% p/v e 20% p/v, respectivamente) em reatores em batelada, sob operação mesofílica, foi favorável para maior rendimento metanogênico se comparado com reatores cujo substrato era apenas bagaço de malte ( 25% p/v) e bagaço de malte junto a inóculo de bagaço de malte pré-fermentado (25% p/v e 5% p/v, respectivamente). Os resultados obtidos foram 1.767; 143 e 140 mL CH<sub>4</sub>. g<sup>-1</sup> ST para a primeira, segunda e terceira condição, respectivamente. A prolongada aclimatização da microbiota do bagaço de malte ao ambiente

anaeróbio colaborou para as alterações impostas pela adição do lodo anaeróbio (Goberna et al., 2013).

Em pesquisa realizada por Malakhova et al. (2015), cujos ensaios em batelada foram submetidos a 55°C e 30°C, foi empregado bagaço de malte (15; 50; 100 e 500 g.L<sup>-1</sup>) na co-digestão com folhas de alcachofra (10 g.L<sup>-1</sup>). Mistura de esterco de bovinos, equinos e ovinos foi usada como inóculo a 10% (v/v). Além disso, também foram testadas as mesmas condições apenas com o bagaço de malte como substrato, sem alcachofra. A máxima produção de metano foi obtida para 50 g.L<sup>-1</sup> de bagaço de malte, em condição termofílica com alcachofra, obtendo-se 61 % de metano na composição do biogás e rendimento de 108 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> de bagaço de malte, em 15 dias de incubação. Na mesma condição, sem a alcachofra, no entanto, foram produzidos 620 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> de bagaço de malte. Por outro lado, na condição mesofílica, o máximo rendimento de metano representou 58,3% da composição do biogás e foi igual a 580 mLCH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> de bagaço de malte, em intervalo de 44 dias de operação para 100 g.L<sup>-1</sup>. Quando não foi adicionado alcachofra, obteve-se melhor rendimento na mesma concentração (480 mL CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> de bagaço de malte) em 30 dias de operação.

Oliveira et. al. (2018) determinaram o potencial metanogênico (BMP) do bagaço de malte, sem pré-tratamento, obtendo-se 301 ± 5 mL.g<sup>-1</sup> SV. Os autores utilizaram como fonte de inóculo lodo granular anaeróbio de reator usado para tratamento de efluente de cervejaria, a 37 °C, sem agitação.

A produção de metano a partir do bagaço de cana-de-açúcar foi investigada por Ahmad et al. (2018). Desse modo, foram realizados ensaios em batelada inoculados com lodo de reator anaeróbio empregado no tratamento de efluente de abatedouro de aves obedecendo à razão substrato-inóculo de 1:2 (1g kg<sup>-1</sup> STV: 2g kg<sup>-1</sup> STV). Os reatores foram operados a 37°C, detectando-se produção de 147,84 mL. g<sup>-1</sup> STV para o bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento.

A digestão anaeróbia da casca de arroz foi avaliada por Chandra et al. (2012) em reatores em batelada conduzidos a 37°C por 60 dias, com lodo anaeróbio como fonte de microrganismos. Os resultados apontaram que, nos ensaios com casca de arroz *in natura*, obteve-se 140 mL. g<sup>-1</sup> SV de metano.

Utilizando como substrato a cana-do-reino (*Arundo donax*) em reatores anaeróbios em batelada, Girolamo et al. (2013) avaliaram o potencial de produção de metano a partir dessa biomassa, triturada em partículas de cerca de 10 mm. Os autores fizeram uso de efluente de reator anaeróbio termofílico em escala piloto como fonte de inóculo, o qual foi alimentado com 75% de esterco animal e 25% de resíduos de alimentos. Os experimentos foram

conduzidos a temperatura termofílica (53 °C) , por 39 dias e com adição de 4 g SV L<sup>-1</sup> de substrato. A partir de então, obteve-se rendimento metanogênico de 273 mL g<sup>-1</sup> SV.

Na Tabela 3-2 pode-se visualizar os resultados obtidos pelos autores citados quanto ao rendimento da produção de metano conduzidos em ensaios em batelada.

Embora, o bagaço de malte possa ser submetido à pré-tratamentos mecânicos, químicos ou termoquímicos, os inibidores das atividades fermentativa e metanogênica não são prevenidos. A adaptação de microrganismos anaeróbios às elevadas concentrações desses compostos pode ser uma alternativa possível para superar esse problema, o que provavelmente é facilitado com a utilização de um consórcio microbiano misto (NOIKE e NIIGATA, 2001; MUSSATO, 2013). Há ainda que se desenvolver pesquisas visando à melhor estabilidade do processo de produção de biogás e ao estudo da viabilidade da aplicação de pré-tratamentos a esse substrato.

Tabela 3-2 Experimentos conduzidos em batelada para a digestão anaeróbia de bagaço de malte e outros resíduos lignocelulósicos.

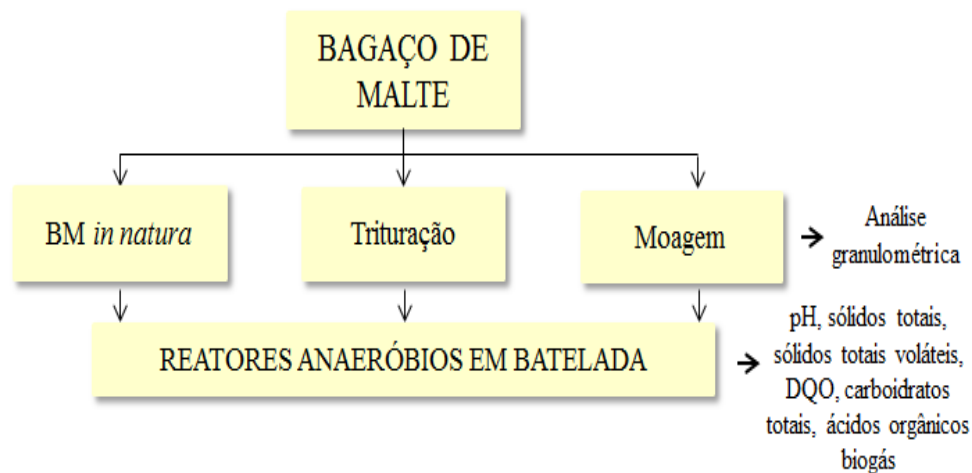
Substrato	Inóculo	Co-digestão	Temperatura (°C)	Rendimento de CH <sub>4</sub>	Referência
Bagaço de malte	Rúmen bovino	Cama de frango	28-33	2,29 mL. g <sup>-1</sup> SV de bagaço de malte	Ezeonu e Okaka (1996)
Bagaço de malte	Lodo anaeróbio UASB	-	37	1.767 mL. g <sup>-1</sup> ST	Goberna et al.(2013)
Bagaço de malte	Lodo anaeróbio UASB	-	37	596 mL. g <sup>-1</sup> SV	Jatunaracht et al. (2006)
Bagaço de malte	Esterco de herbívoros	Folhas de alcachofra	55	108 mL .g <sup>-1</sup> de bagaço de malte	Malakhova et al.(2015)
Bagaço de malte	Esterco de herbívoros	Folhas de alcachofra	37	58 L .g <sup>-1</sup> de bagaço de malte	Malakhova et al.(2015)
Bagaço de malte	Lodo anaeróbio	-	37	301 mL.g <sup>-1</sup> SV	Oliveira et al. (2018)
Casca de arroz	Lodo anaeróbio	-	37	140 mL. g <sup>-1</sup> SV	Chandra et al. (2012)
Cana-do-reino ( <i>Arundo donax</i> )	Efluente de reator anaeróbio	-	53	273 mL g <sup>-1</sup> SV	Girolamo et al. (2013)
Cana-de-açúcar	Lodo anaeróbio UASB	-	37	147,84 mL. g <sup>-1</sup> STV	Ahmad et al. (2018)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma Operacional

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). A princípio realizou-se análise dos efeitos da redução da granulometria do bagaço de malte (BM) na digestão anaeróbia (Figura 4.1). Além disso, foi aplicado pré-tratamento hidrotérmico ao substrato com dimensões reduzidas e *in natura*, conforme Figura 4.2.

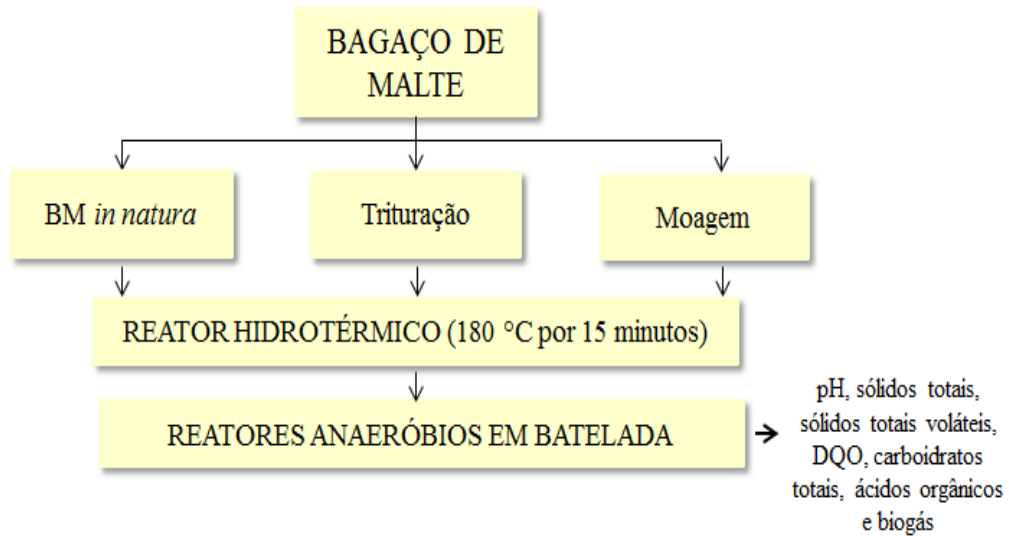
Figura 4.1 Fluxograma operacional para avaliação da biodegradabilidade do BM nas granulometrias, majoritariamente de: 5,6 a 4,75 mm (*in natura*), 0,84 a 1,00 mm (triturado) e 0,59 a 0,84mm (moído).



Fonte: o autor.



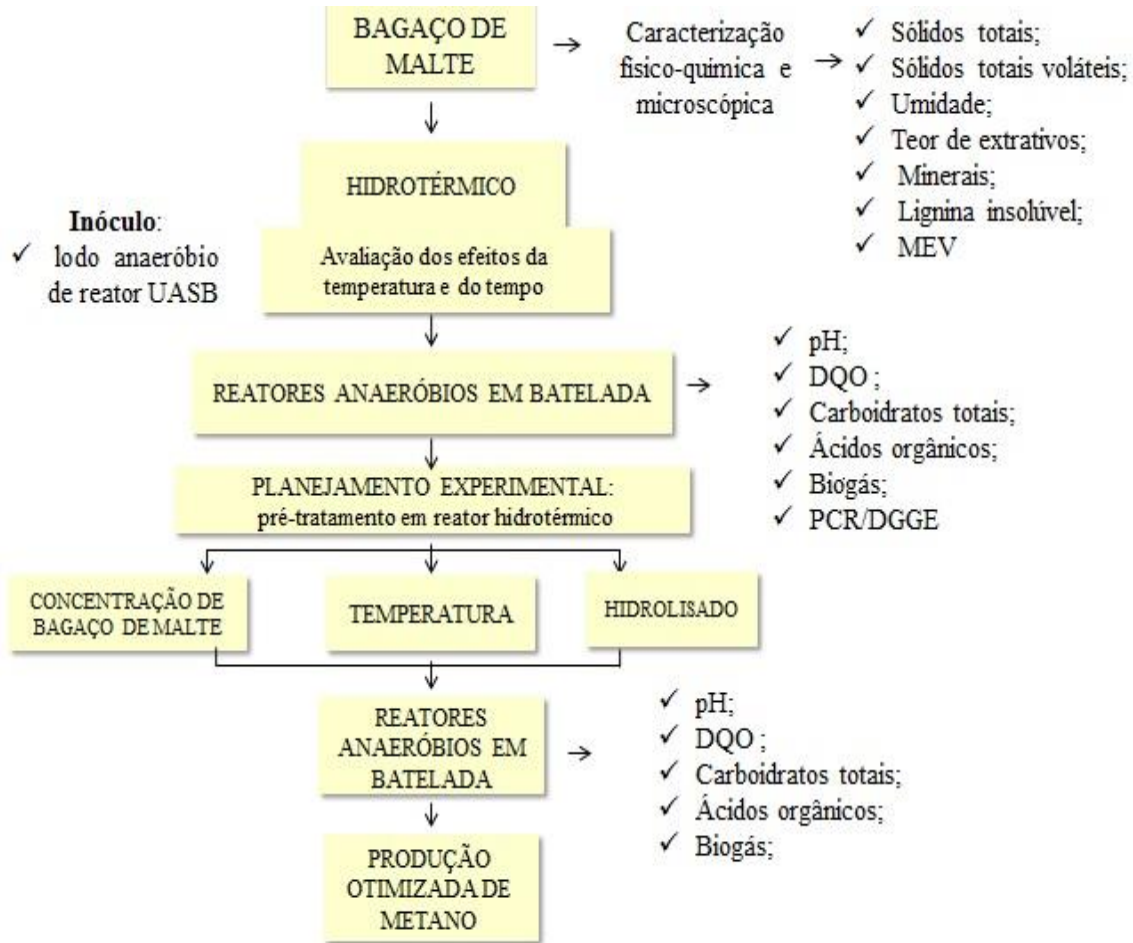
Figura 4.2 Fluxograma operacional para reatores com BM em granulometria majoritariamente de: 5,6 a 4,75 mm (*in natura*), 0,84 a 1,00 mm (triturado) e 0,59 a 0,84mm (moído) aplicados ao reator hidrotérmico.



Fonte: o autor.

Posteriormente, realizou-se o planejamento experimental com variações da temperatura e tempo do pré-tratamento do BM e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização na digestão anaeróbia do BM considerando três variáveis : ( $x_1$ ) temperatura de operação; ( $x_2$ ) concentração de BM e ( $x_3$ ) volume da fração líquida resultante do pré-tratamento (hidrolisado)(Figura 4.3). O DCCR também foi realizado com BM pré-tratado em autoclave considerando os efeitos das variáveis: ( $x_1$ ) temperatura de operação e ( $x_2$ ) concentração de BM (Figura 4.4).

Figura 4.3 Fluxograma operacional do DCC e DCCR para BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.



Fonte: o autor.

Figura 4.4 Fluxograma operacional do DCCR para BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.



Fonte: o autor.

## 4.2 Inóculo

Nessa pesquisa foi empregada como fonte de inóculo lodo granular proveniente de reator anaeróbio de fluxo ascendente da Avícola Pereira, localizada no município de Tietê-SP.

O inóculo foi mantido em temperatura de 4 °C até a sua caracterização e inoculação dos reatores em batelada, quando foi previamente macerado em liquidificador. Antes de ser inoculado nos reatores em batelada, o lodo foi mantido por 7 dias a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  para recuperação da atividade microbiana e eliminação de matéria orgânica biodegradável, reduzindo a possibilidade de produção de metano em decorrência do lodo. Para os ensaios em batelada, foi realizado ensaio controle (C) nas mesmas condições dos demais, exceto pela ausência do BM com o intuito de averiguar a atividade metanogênica do lodo.

O inóculo foi caracterizado por meio de análise de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF) conforme Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 2005).

### 4.3 Substrato

O substrato foi cedido pela cervejaria Kirchen, localizado em São Carlos - SP, em processo produtivo no qual houve utilização apenas malte de cevada, sem adição de adjuntos. No laboratório, o bagaço de malte (BM) foi lavado para remoção de impurezas advindas do processo produtivo da cerveja e seco a temperatura ambiente. Uma porção do BM foi mantida íntegra (*in natura*), enquanto a outra foi triturada em liquidificador durante 3 minutos. Uma parcela do BM triturado foi macerada em moinho de facas (tipo Willey SL-31, marca Solab) (Figura 4.5). O BM foi, então, armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C (Figura 4.6 e 4.7).

Figura 4.5 BM lavado em água corrente (1) e seco a temperatura ambiente (2).



Fonte: o autor.

Figura 4.6 Moinho de facas



Fonte: o autor.

Figura 4.7 BM após trituração em liquidificador (1) e BM após moagem (2).



Fonte: o autor.

#### 4.3.1 Caracterização do bagaço de malte

##### 4.3.1.1 Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF)

Análise de ST, STV e STF foi realizada de acordo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 2005).

##### 4.3.1.2 Extrativos e Lignina Klason

Primeiramente, o BM *in natura* foi submetido ao extrator Soxhlet para remoção de extrativos (ceras, gorduras, gomas, amidos, resinas, taninos e óleos essenciais) em duas etapas, utilizando-se o solvente hexano e água. A extração ocorreu em triplicata de amostras. Assim, foi possível extrair, tanto os compostos solúveis em água, quanto àqueles solúveis em etanol (SLUITER et al., 2005). Para tanto, utilizou-se cartuchos de celulose onde foram adicionados 3g de BM e posicionados no extrator Soxhlet. Foram inseridos cerca de 200 mL de água nos aparatos de vidro do Soxhlet, prosseguindo-se o refluxo e aquecimento por 8 horas. Em seguida, após remoção da água do sistema, foram inseridos 200 mL de hexano em cada um dos aparatos de vidro do Soxhlet e o refluxo foi executado por 24 horas.

O teores de cinzas e de lignina de Klason do BM, antes e após os pré-tratamentos, foram determinados segundo Sluiter et al (2011). Para a análise da lignina de Klason, o BM (0,3 g) foi misturado a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 mL a 72% w/w) em banho aquecido a 30 °C durante 1 hora.



Em seguida, com o intuito de se obter concentração do ácido igual a 4% w/w, foram adicionados 84 mL de água destilada. Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 1 hora e seu conteúdo foi filtrado em cadinhos de porcelana pré-calcinados, com membrana de fibra de vidro cuja porosidade foi de 0,2 µm (Sartorius stedim Biotech). A fração líquida foi analisada quanto ao teor de carboidratos totais pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956, modificado por HERBERT; PHILIPPS; STRANG, 1971), com glicose como padrão. Os sólidos foram secos em estufas a 105 °C por 24 horas e, então, em mufla a 550 °C por 3 horas. A lignina de Klason foi calculada por meio da Equação (2):

$$\% \text{ Lignina de Klason} = \frac{(\text{Massa resíduo} - \text{Massa cinzas})}{\text{Massa seca na estufa}} \times 100 \quad (2)$$

Os macro e micro elementos cálcio (Ca), cobre (Cu), magnésio (Mg), manganês (Mn), sódio (Na), potássio (K), ferro (Fe), zinco (Zn), níquel (Ni), concentração total de fósforo (P) e concentração nitrogênio orgânico total (N) foram quantificados pela empresa Bioagri Ambiental segundo o método descrito em EPA 6010 D-3051 (USEPA,2014).

#### 4.3.1.3 Granulometria

A análise granulométrica por peneiramento foi realizada segundo Nogueira (1995). Para tanto, foram separados 100 g do material seco para peneiramento com agitação manual. As peneiras foram posicionadas verticalmente em ordem decrescente de abertura, no sentido do topo para a base. Para o BM *in natura*, os tamanhos das aberturas dos poros das peneiras foram os seguintes: 5,00 mm; 2,83 mm, 1,70 mm; 1,41mm; 1,00 mm e 0,84 mm. Para o BM triturado e moído, as aberturas dos poros foram as seguintes: 1,41 mm; 1,00 mm; 0,84 mm; 0,59 mm; 0,42 mm e 0,210 mm. Após o peneiramento, os grãos retidos em cada peneira tiveram suas massas determinadas.

#### 4.3.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura do BM foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes, após os pré-tratamentos e ao término do período de incubação dos reatores com BM pré-

tratado em autoclave por 30 minutos e pré-tratado em sistema hidrotérmico a 210 °C por 10 minutos. As amostras foram preparadas segundo Nation (1983), as quais foram fixadas em 0,1 M de tampão fosfato (pH= 7,3) contendo glutaraldeído a 2,5% a 4°C por 2 horas. Desse modo, as amostras foram lavadas por três vezes com solução tampão fosfato durante 10 minutos e desidratadas utilizando-se etanol nas concentrações: 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada. Em seguida, as amostras foram secas a temperatura inferior a 60 °C por 2 horas, fixadas em *stub* com o auxílio de fitas de carbono e revestidas com camada de platina. Para a observação foi empregado microscópio Digital Scanning Microscope da Zeiss modelo DSM-960.

#### 4.4 Meio de Cultura

Como forma de suprir a necessidade nutricional microbiana foi utilizado o meio basal Zinder (Zinder et al,1984), preparado a partir da dissolução de seus componentes em água ultrapurificada na ordem apresentada na Tabela 4.1. O meio foi distribuído em frascos Duran (250 mL) conforme o volume requerido para cada ensaio.

A composição da solução traço de metais, constituinte do meio Zinder, foi preparada pela dissolução inicial de Tritriplex III em água ultrapurificada e ajuste do pH a 7,0 com KOH 10N. Em seguida, os sais foram dissolvidos na solução segundo a ordem apresentada na Tabela 4.2.

Além disso, foi acrescida solução de vitaminas (Tabela 4.3) ao meio reacional. Tanto a solução traço de metais, quanto a solução de vitaminas foram filtradas a vácuo em membrana de 0,22 µm. A solução foi submetida à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%) por 20 minutos e armazenada em refrigerador a 4°C. Solução de bicarbonato de sódio 10% foi utilizada para manutenção do pH do meio reacional, cujo preparo foi realizado pela dissolução do sal em água ultrapurificada, sob atmosfera de N<sub>2</sub> (100%).

Tabela 4-1 Composição do meio basal Zinder.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (q.s.p. 1000 mL) de água Milli-Q</b>
NH <sub>4</sub> Cl	0,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05 g
Solução traço de metais	10 mL

Tabela 4-2 Composição da solução traço de metais.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (q.s.p. 1000 mL) de água Milli-Q</b>
<b>Solução de Metal Traço</b>	
Tritriplex III	4,5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,556g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,086g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,17g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,21g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,19g
NiCl <sub>2</sub>	0,02g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,01g

Fonte: ZINDER et al. (1984).



Tabela 4-3 Composição da solução de vitaminas.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (q.s.p. 1000 mL) de água Milli-Q</b>
<b>Solução de Vitaminas</b>	
Biotina	0,02g
Ácido fólico	0,02g
Tiamina HCl	0,005g
Riboflavina	0,005g
Ácido nicotínico	0,005g
Pantotenato de cálcio	0,005g
Piridroxina HCl	0,010g
Ácido lipóico	0,005g
Vitamina B <sub>12</sub>	0,0001 g

Fonte: DUBOUGUIER et al. (1987).

Assim, a composição do meio reacional foi: meio Zinder, solução de vitaminas (10%), bicarbonato de sódio (10%), inóculo e extrato de levedura (1g.L<sup>-1</sup>), conforme a Tabela 4.4.

Tabela 4-4 Composição do meio reacional.

<b>Componentes do meio reacional</b>	<b>Quantidade</b>
Meio Zinder et al. (1984)	122,5 mL*
Solução de vitaminas DUBOUGUIER et al. (1987) (1% v/v)	1,25 mL
Solução de bicarbonato de sódio (10%)	1,25 mL
Extrato de levedura	1 g.L <sup>-1</sup>
Inóculo	2g.kg <sup>-1</sup> STV de inóculo: 1g. kg <sup>-1</sup> STV de substrato

\*A partir desse valor foi subtraído o volume de inóculo e de hidrolisado (quando utilizado).

#### 4.5 Pré-tratamento do bagaço de malte em reator hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico foi executado no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos. A unidade experimental (Figura 4.8) é constituída por painel elétrico (1), manômetro (2), tanque para aquecimento de água e biomassa (3), ciclone de separação das frações líquida e sólida (4).

Figura 4.8 Unidade experimental do reator hidrotérmico.



Fonte: o autor.

#### 4.6 Reatores em batelada

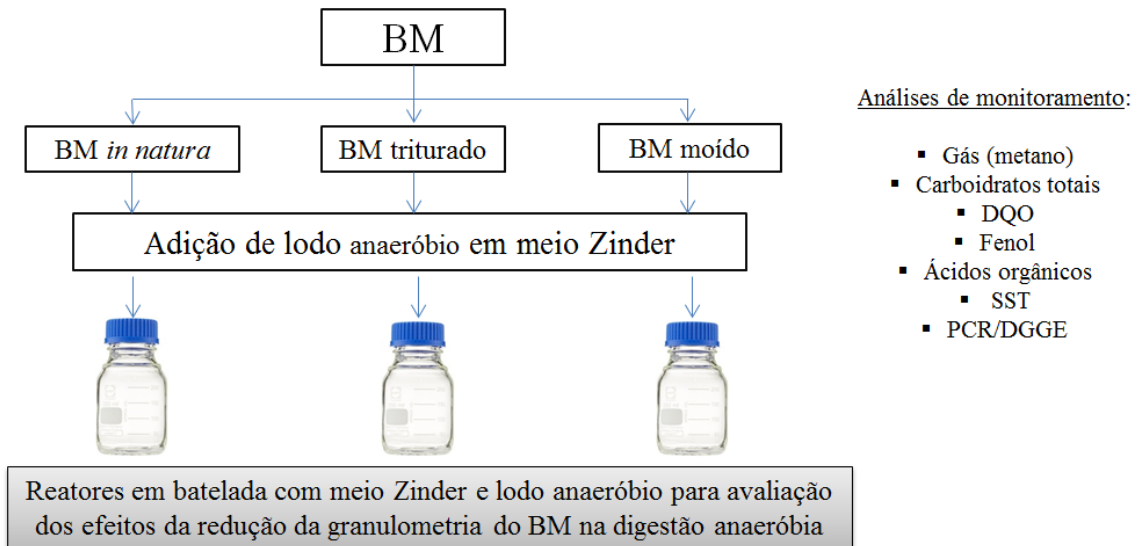
##### 4.6.1 Avaliação da biodegradabilidade do bagaço de malte in natura e submetido à moagem e trituração

A princípio, foi desenvolvida essa etapa do estudo com o objetivo de verificar se a redução do tamanho das partículas do BM iria favorecer a digestão anaeróbia e determinar com qual faixa granulométrica iria prosseguir a pesquisa experimental (Figura 4.9). Além disso, foi aplicado o pré-tratamento em reator hidrotérmico com o intuito de analisar os efeitos do tratamento a explosão de vapor nos diferentes tamanhos de partícula do resíduo (Figura 4.10).

As condições do BM avaliadas foram: (IN) *in natura*, ou seja, em sua forma íntegra e isento de qualquer pré-tratamento; (INH) bagaço pré-tratado em reator hidrotérmico; (T)

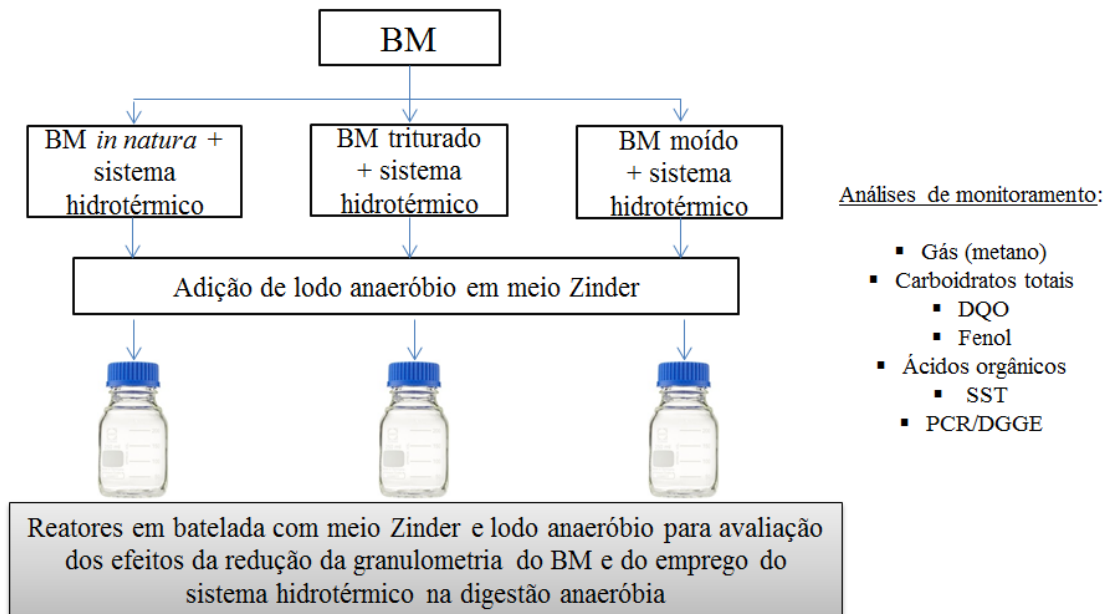
bagaço triturado em liquidificador; (TH) bagaço triturado em liquidificador e submetido ao reator hidrotérmico; (M) bagaço moído e (MH) bagaço moído e pré-tratado em reator hidrotérmico.

Figura 4.9 Fluxograma operacional para a avaliação da biodegradabilidade do BM em granulometrias reduzidas.



Fonte: o autor.

Figura 4.10 Fluxograma operacional para avaliação dos efeitos do pré-tratamento hidrotérmico aliado a redução da granulometria do BM.



Fonte: o autor.

O pré-tratamento em reator hidrotérmico consistiu na adição de BM (1) *in natura* (íntegro), (2) triturado e (3) moído e 210 mL de água destilada com operação a 180 °C por 15 minutos à pressão de 9,6 bar. Ao término da reação, a fração sólida foi separada da fração líquida com auxílio de peneira de 2 mm de diâmetro de poro.

Os reatores anaeróbios em batelada foram operados em triplicata em frascos Duran de 250 mL, com volume de meio reacional igual a 125 mL e *headspace* de 125 mL. O meio reacional foi composto por meio basal Zinder, bicarbonato de sódio (10%), solução de vitaminas (1%), extrato de levedura (1 g.L<sup>-1</sup>), o inóculo (2g STV de inóculo: 1g STV de substrato) e 10 g.L<sup>-1</sup>de bagaço de malte. Os reatores foram submetidos à atmosfera de N<sub>2</sub> (100%) por 10 minutos. O pH do meio reacional foi ajustado em 7,0 com HCl (0,5 M). Em seguida, os reatores foram selados com tampa de butila e tampa de rosca plástica e incubados a 37 ± 1 °C, sem agitação.

#### **4.6.2 Planejamento experimental por Delineamento Composto Central para o bagaço de malte em reator hidrotérmico**

Os delineamentos em esquema fatorial 2<sup>k</sup>, ocorrem quando tem-se k fatores, todos com dois níveis. Delineamentos desse tipo são muito utilizados em laboratórios e/ou locais onde as fontes externas de variação são, geralmente, muito bem controladas (RODRIGUES E IEMMA, 2014).

Desse modo, o planejamento experimental 2<sup>2</sup> com três repetições do ponto central teve a finalidade de avaliar a influência da temperatura e do tempo de tratamento hidrotérmico do BM (Tabela 4.5).

Para essa pesquisa foi feito planejamento experimental entre a faixa de 150 a 210 °C, com tempo variando entre 10 e 20 minutos, de modo que o ponto central a ser estudado foi de 180°C por 15 minutos.

Tabela 4-5 matriz do Delineamento Composto Central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
B1	150	10
B2	210	20
B3	150	20
B4	210	10
B5	180	15
B6	180	15
B7	180	15

Dessa forma, foram conduzidos ensaios em batelada para verificação da produção de metano a partir do BM pré-tratado nas condições dos pontos fatoriais (B1, B2, B3 e B4) e centrais (B5, B6 e B7). Após a obtenção dos dados do delineamento experimental.

O teste ANOVA foi realizado com a finalidade de se obter o valor de  $F_{\text{calculado}}$  e compará-lo com  $F_{\text{tabelado}}$ , uma vez que o modelo é estatisticamente significativo se  $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$  (RODRIGUES E IEMMA, 2014).

#### **4.6.3 Planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional para bagaço de malte em reator hidrotérmico**

Após a aplicação dos pré-tratamentos hidrotérmico e elaboração da curva de superfície-resposta do DCC, foi possível verificar quais opções de temperatura e tempo mais favoráveis no que se refere à recuperação de energia na forma de metano. Com o intuito de verificar os valores de temperatura, concentrações de BM e volume da fração líquida (hidrolisado) residual do pré-tratamento hidrotérmico que resulta em máximo rendimento de metano, foi realizado delineamento composto central rotacional (DCCR) como método para o planejamento experimental de 3 variáveis independentes.

Logo, nessa etapa o BM foi pré-tratado a 210 °C por 10 minutos e, então, foram conduzidos 17 ensaios em batelada, com três repetições no ponto central (ensaios C-15, C-16 e C-17). Para a obtenção da resposta na forma de produção máxima de metano em cada ensaio, foram acrescentadas as concentrações de BM ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e volume de hidrolisado (mL) segundo a Tabela 4-6. Os reatores foram fechados com tampa de butila e tampa de rosca plástica e incubados conforme temperatura designada na Tabela 4-8.

Tabela 4-6 Delineamento Composto Central Rotacional para as variáveis (x1) temperatura, (x2) concentração de BM, (x3) volume de hidrolisado.

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	29,86	36,0	45,0	54,0	60,14
Concentração de bagaço de malte (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub>	7,27	10,0	14,0	18,0	20,73
Hidrolisado (mL)	X <sub>3</sub>	0,61	3,0	6,5	10,0	12,39

Tabela 4-7 Valores codificados para o DCCR de três fatores.

Ensaio	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> (mL)
C-1	-1	-1	-1
C-2	1	-1	-1
C-3	-1	1	-1
C-4	1	1	-1
C-5	-1	-1	1
C-6	1	-1	1
C-7	-1	1	1
C-8	1	1	1
C-9	-1,68	0	0
C-10	1,68	0	0
C-11	0	-1,68	0
C-12	0	1,68	0
C-13	0	0	-1,68
C-14	0	0	1,68
C-15	0	0	0
C-16	0	0	0
C-17	0	0	0

#### 4.6.4 Delineamento Composto Central Rotacional para o bagaço de malte em autoclave

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis foi elaborado para verificação das faixas de temperatura de incubação e concentração de BM mais adequadas para a digestão anaeróbia do BM pré-tratado em autoclave a 121 °C, a 1 atm por 30 minutos.

Foram realizados 11 ensaios em batelada conforme a Tabela 4-8, com três repetições no ponto central (ensaios D-9, D-10 e D-11). Essa estratégia permite a elaboração de um modelo matemático que, se validado estatisticamente, será usado para a construção de uma superfície de resposta a partir da qual será feita uma análise para determinação das condições otimizadas, conhecendo-se a significância estatística das respostas.

Para a obtenção do rendimento metanogênico de cada ensaio (respostas), foram empregadas concentrações de BM e temperatura conforme a Tabela 4-9.

Tabela 4-8 Delineamento Composto Central Rotacional para otimização da (x1) temperatura e (x2) concentração de BM.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	1	+1,41
Temperatura (°C)	X <sub>1</sub>	30,86	35	45	55	59,14
Concentração de bagaço de malte (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub>	8,34	10	14	18	19,66

Tabela 4-9 Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional para BM pré-tratado em autoclave.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
D-1	35	10
D-2	55	10
D-3	35	18
D-4	55	18
D-5	30,86	14
D-6	59,14	14
D-7	45	8,34
D-8	45	19,66
D-9	45	14
D-10	45	14
D-11	45	14

#### 4.6.5 Análises físico-químicas e cromatográficas

Amostras do início e término dos ensaios foram coletadas para análises de DQO, carboidratos totais solúveis, fenóis totais, Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Totais Fixos (STF) e pH. Para análise de carboidratos totais solúveis foi utilizado o método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956, modificado por HERBERT; PHILIPPS; STRANG, 1971), utilizando glicose como padrão. As demais análises citadas foram realizadas segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 2005).

Concentrações de ácidos orgânicos e álcoois foram determinadas em amostras do meio reacional coletadas durante a operação dos reatores. Para tanto, utilizou-se cromatógrafo gasoso GC-2010 Shimadzu com detector de ionização de chama (FID), coluna HP INNOWAX de 30m x 0,25mm (diâmetro interno) x 0,25 µm (espessura do filme). A amostra foi preparada adicionando-se 2 mL de amostra em fase líquida, 1 g de NaCl, 70 µL de isobutanol, 100 µL de ácido crotônico e 200 µL de ácido sulfúrico 2M, conforme metodologia elaborada por Adorno et al. (2014).



A determinação dos gases gerados na fermentação e metanogênese (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) foi realizada por meio do cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 equipado com detector de condutividade térmica (TCD) provido por coluna Carboxen® 1010 plot 30 m x 0,53 mm e argônio como gás de arraste. As amostras gasosas, de volume igual a 0,5 mL, serão retiradas do *headspace* com seringa *gastight* com trava.

## 4.7 Caracterização Microbiana

### 4.7.1 Análises de Biologia Molecular

As comunidades de bactérias e arqueias metanogênicas após os ensaios de seleção da granulometria do bagaço de malte, do DCC com o bagaço de malte pré-tratado em reator hidrotérmico do pré-tratamento em autoclave, bem como ao término dos ensaios controle (sem BM) foram analisadas por meio da reação em cadeia da polimerase e eletroforese em gel desnaturante (PCR/DGGE). Realizou-se extração do DNA (GRIFFITHS et al., 2000) e amplificação com os iniciadores 968 FGC e 1392 R (NIELSEN et al., 2011) e 1100 FGC e 1400R (KUDO et al., 1997) para os domínios Bacteria e Archaea, respectivamente. O *software* Bionumerics foi empregado para análise dos padrões de bandas de DGGE e determinação dos coeficientes de similaridade. O programa Past foi aplicado para a determinação dos índices de diversidade de Shannon-Wiener, Dominância e riqueza de Chao-1.

## 4.8 Ajuste dos dados experimentais

O ajuste dos dados experimentais foi realizado para a média dos valores obtidos por triplicata de reatores por meio do software OriginPro 5.8. Os dados de produção acumulada de metano foram ajustados aplicando-se a equação de Gompertz (Equação 3) modificada por Zwietering et al. (1990). Desse modo, estimou-se o potencial de produção de metano (P); a taxa máxima de produção de metano (R<sub>m</sub>) e o período de duração da fase lag (λ).

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Em que:

P= potencial de produção de metano (mL de CH<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup>STV);

$R_{im}$  = taxa máxima de produção de metano (mL de  $CH_4$ .gSTV.  $h^{-1}$ );

$\lambda$  = período da fase lag (h);

e = constante de Euler (2,71828182);

Para determinar dissimilaridades entre  $P$ , foi utilizada análise de variância (ANOVA) com  $p \geq 0,05$ , sendo considerado significativamente diferente, por meio do Origin Pro 9.0. A análise de variância (ANOVA), efeitos das variáveis (concentração de BM, temperatura, concentração de licor) sobre a produção de metano e coeficientes de regressão foram realizadas a partir do programa Statistica 10.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização química do bagaço de malte

#### 5.1.1 Teor de umidade e ST, STV e STF

Constatou-se valores de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Voláteis (STV) e Sólidos Totais Fixos (STF) de 301,6; 289,6 e 12,05 g.  $kg^{-1}$ , respectivamente. Esses valores foram superiores aos observados por Vitanza et al. (2016) e Bougrier et al. (2017), em relação ao teor de ST (187 g.  $kg^{-1}$  e 93,9 g.  $kg^{-1}$ ) e STV (182,32 g.  $kg^{-1}$  e 89,7 g.  $kg^{-1}$ ), respectivamente. A porcentagem de cinzas foi de 3,15 %, valor maior em relação aquele observado por Luft (2016) e Vitanza et. al (2016) de 2,19 % e 2,5%, respectivamente.

Os extrativos são compostos não pertencentes à estrutura da parede celular e podem ser extraídos da biomassa lignocelulósica pelo uso de solventes apolares ou polares. Dentre tais compostos encontram-se sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água); ésteres graxos, ceras, resinas, ácidos, compostos fenólicos e álcoois (solúveis em solventes orgânicos). Para o BM utilizado nessa pesquisa observou-se 16% de extrativos, valor superior ao verificado por Dragone (2017) de 5,82% e inferior ao relatado em amostra utilizada por Luft (2016), de 39,31%.

#### 5.1.2 Minerais

A composição mineral do BM segundo as concentrações (mg. $kg^{-1}$ ) de: fósforo (4.560), cálcio (1.610), magnésio (2.280), sódio (280,0), potássio (1.460), ferro (121,0), zinco (104,0),

manganês (39,1) e cobre (87,7) podem ser observadas na Tabela 5.1, em comparação com os resultados obtidos por Mussato e Roberto (2006), Waters et al. (2012) e Meneses et al. (2013). Deve-se considerar que foi observada para a composição química desse material significativas variações devido a fatores, como características da cevada, época de colheita e condições de cultivo, forma de maltagem, maceração e acréscimo de adjuntos ao processo produtivo da cerveja (MUSSATO, 2014).

Comparando-se as concentrações de minerais da amostra de BM utilizada nesse trabalho com os relatos de Mussato e Roberto (2006), Waters et al. (2012) e Meneses et al. (2013), verificou-se amplas concentrações de minerais, exceto em relação ao magnésio, com 2.280 mg.kg<sup>-1</sup> neste estudo, 1.958 mg.kg<sup>-1</sup> e 1.900 mg.kg<sup>-1</sup> segundo Mussato e Roberto (2006) e Meneses et al. (2013), respectivamente.

Na Tabela 5-1 constam resultados de estudos desenvolvidos com malte de cevada cultivada em países diferentes (Brasil, Portugal e Irlanda). Além disso, o BM usado neste trabalho deriva da produção de cerveja cujo malte de cevada foi utilizado sem acréscimo de adjuntos, assim como, aos relatos de Mussato e Roberto (2006) e Waters et al. (2012).

Tabela 5-1 Composição mineral do BM.

Parâmetros	Neste trabalho	Mussato e Roberto (2006)	Waters et al. (2012)	Meneses et al. (2013)
		(mg.kg <sup>-1</sup> )		
Fósforo	4.560	5.186	4.600	6.000
Cálcio	1.610	3.515	2.200	3.600
Magnésio	2.280	1.958	2.400	1.900
Sódio	280,0	309,3	100	137,1
Potássio	1.460	258,1	700	600
Ferro	121	193,4	100	154,9
Zinco	104	178	100	82,1
Manganês	39,1	51,4	NR	40,9
Cobre	87,7	18,0	NR	11,4

NR, não relatado.

Entretanto, Meneses et al. (2013) fizeram uso de BM gerado em produção com adição de adjuntos, o que sugere alteração da composição das amostras de BM analisadas. Estão explícitas as diferenças entre a composição mineral de cada amostra de BM, provavelmente, em decorrência das diferentes condições de cultivo da cevada no que se refere ao clima,

espécie de cevada e tempo de colheita e do processo produtivo, com variações na maltagem, maceração e na adição de adjuntos.

### 5.1.3 Lignina Klason e carboidratos totais solúveis

Observou-se reduzida alteração da porcentagem de Lignina Klason após a aplicação dos pré-tratamentos. Observou-se para o BM *in natura* 26,5% de lignina insolúvel, enquanto para o BM pré-tratado em autoclave (121 °C, 1 atm por 30 minutos) e em reator hidrotérmico (210 °C por 10 minutos) foram observadas porcentagens de 28,2% e 29,1%, respectivamente. Embora, altas temperaturas não tenham ocasionado impacto significativo em relação à lignina foi constatada maior solubilização de carboidratos totais (celulose e hemicelulose) entre o BM *in natura* (33,5%), pré-tratado em autoclave (40,6%) e pré-tratado em reator hidrotérmico (53,5%).

Ravindran et al. (2017) analisaram a composição do bagaço de malte *in natura* obtendo-se 19,21 % de celulose, 26,94 % de hemicelulose e 30,48 % de lignina para o bagaço de malte em base seca. Mussato e Roberto (2005) relataram BM composto por 16,8% de celulose, 27,8% lignina e 28,4% de hemicelulose. Por outro lado, Vitanza et al. (2016) caracterizaram BM *in natura* com 12,3% de lignina e 49,2% de carboidratos totais. Os resultados dessa pesquisa para teor de lignina do BM *in natura* se aproximam daqueles relatados por Ravindran et al. (2017) e Mussato e Roberto (2005) ao passo que a concentração de carboidratos totais foi inferior àquelas observadas pelos autores citados. Qualquer variação pode estar relacionada com a variedade do grão, tempo de colheita ou condições de esmagamento (FORSELL et.al., 2008).

O pré-tratamento em autoclave acarretou aumento do teor de carboidratos totais solúveis (40,6%) em relação ao BM *in natura* (33,5%), comprovando que houve alterações da estrutura lignocelulósica. Ravindran et al. (2017) realizaram pré-tratamento térmico do bagaço de malte utilizando autoclave a 121 °C por 30 minutos e estudaram a composição química do BM após o pré-tratamento, o que resultou em 28,88% de lignina, 19,31% de celulose, em relação a 30,48 % de lignina e 19,21 % de celulose para o BM *in natura*. No entanto, devido ao pré-tratamento provavelmente ocorreu a redução de monômeros (galactose, arabinose, xilose e manose). Segundo Jönsson e Martín (2016), esse pré-tratamento age rompendo a estrutura lignocelulósica por descompressão repentina, afetando o interior da estrutura. Também, foi verificada maior solubilização de carboidratos e não solubilização de lignina por Pagliaccia et al.(2019), após emprego de pré-tratamento em

autoclave (134°C por 20 minutos a 3,2 bar) de resíduos orgânicos municipal (alimentos, jardinagem e papéis).

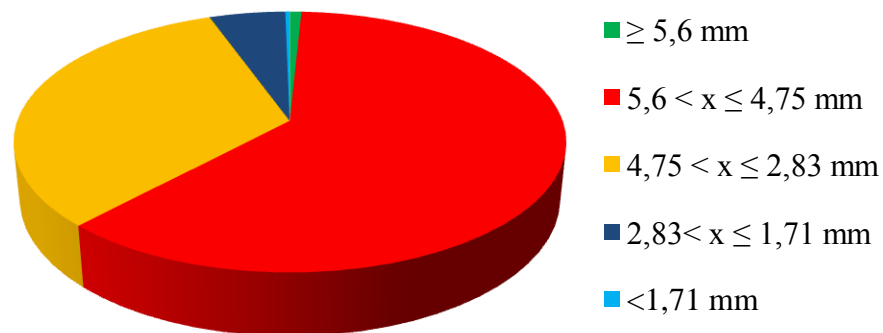
Em relação ao pré-tratamento em reator hidrotérmico, o aumento do teor de carboidratos totais disponíveis foi ainda maior quando comparado ao BM *in natura*, com 53,5% e 33,5%, respectivamente. Efeitos da explosão a vapor na composição do material lignocelulósico foram observados por Baêta et al.(2017), quando aplicaram casca de café ao sistema hidrotérmico e correlacionaram o aumento da severidade a maior solubilização de celulose e hemicelulose no meio líquido. Ao submeterem a casca de café à severidade de 4,13 (180° C por 60 minutos) e 4,41 (210 °C por 15 minutos), os autores relataram solubilização de 43% e 76% de celulose e 58% e 55% de hemicelulose, respectivamente.

Confirmou-se que em função do pré-tratamento em autoclave e em sistema hidrotérmico tem-se alteração da estrutura lignocelulósica do BM, solubilizando carboidratos (hemicelulose e celulose) envoltos pela rede formada por lignina (TAMPIO et al., 2014).

#### 5.1.4 Granulometria do bagaço de malte

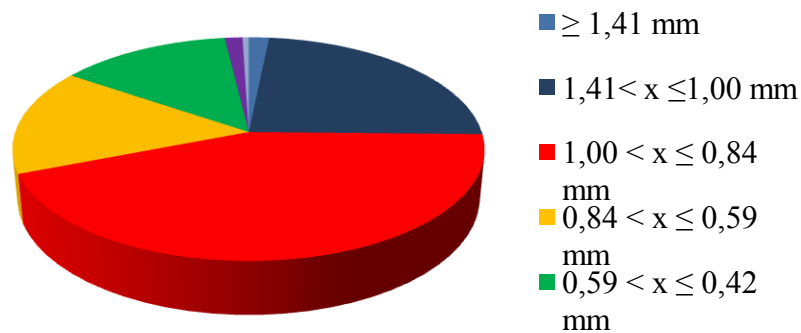
Verificou-se para o BM *in natura*, triturado e moído grãos majoritariamente com diâmetro entre 2,83 a 5,6 mm (Figura 5.1), 0,42 a 1,41 mm (Figura 5.2) e 0,42 a 0,84mm (Figura 5.3), respectivamente.

Figura 5.1 Granulometria do BM *in natura*



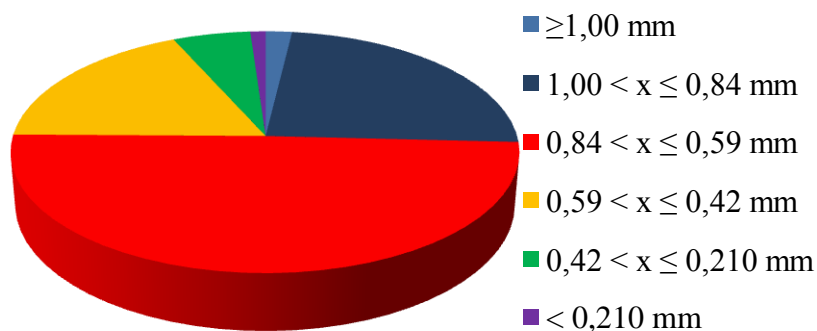
Fonte: o autor.

Figura 5.2 Granulometria do BM triturado.



Fonte: o autor.

Figura 5.3 Granulometria do BM moído



Fonte: o autor.

## 5.2 Reatores em batelada

### 5.2.1 Ensaio com bagaço de malte *in natura*

Na fase inicial deste estudo foram realizados ensaios para analisar a produção de metano após a redução da granulometria do BM e verificar os efeitos da aplicação do pré-tratamento em sistema hidrotérmico na digestão anaeróbia desse material. Logo, foram testados em reatores em batelada: (I) BM *in natura*, (INH) BM *in natura* mais hidrotérmico, (T) BM triturado, (TH) BM triturado mais hidrotérmico, (M) BM moído, (MH) BM moído mais hidrotérmico.

De acordo com análise da série de sólidos, o lodo utilizado como inóculo era composto por 63,46 g.L<sup>-1</sup> de ST, 50,98 g.L<sup>-1</sup> de STV e 12,48 g.L<sup>-1</sup> de STF. Foi realizado

ensaio controle (C) para verificação do potencial metanogênico do lodo e, assim, o volume produzido foi descontado dos demais ensaios para garantir cálculo da produção de metano decorrente apenas da digestão anaeróbia do BM.

Foi constatado potencial para digestão anaeróbia e produção de metano a partir do BM utilizando-se meio de suplementação Zinder. Desse modo, observou-se maior produção de metano ( $P$ ) para BM moído precedido de tratamento em reator hidrotérmico ( $320,64 \pm 7,72$  mL  $g^{-1}$  STV), enquanto a menor produção foi obtida para a condição com BM *in natura* ( $164,18 \pm 4,94$  mL  $g^{-1}$  STV) (Figura 5.4 e Tabela 5-2). Obteve-se ajuste de  $R^2 \geq 0,95$  ao modelo Gompertz modificado para todos os ensaios de produção de metano, obtendo-se para as demais condições  $226,73 \pm 5,13$  mL  $g^{-1}$  STV (INH),  $175,76 \pm 2,66$  mL  $g^{-1}$  STV (T),  $230,93 \pm 2,87$  mL  $g^{-1}$  STV (TH),  $171,58 \pm 4,87$  mL  $g^{-1}$  STV (M).

Por meio do teste ANOVA com  $p > 0,05$  e verificação a partir do teste Tukey foi comprovado estatisticamente que o tratamento com BM moído mais sistema hidrotérmico (MH) foi significativamente superior quando comparado aos pré-tratamentos moído (M), triturado (T), triturado mais hidrotérmico (TH), *in natura* mais hidrotérmico (INH) e *in natura* (INH).

Não foi verificada diferença significativa estatisticamente entre ( $P$ ) dos ensaios (IN) (T) e (M), com  $164,18 \pm 4,94$ ;  $175,76 \pm 2,66$  e  $171,58 \pm 4,87$  mL $g^{-1}$  STV, respectivamente. De forma análoga, Ferreira et al. (2012) observaram produção de metano semelhante quando foi reduzido o tamanho das partículas de palha de trigo de 3-5 cm ( $245$  mL  $g^{-1}$  STV) para menor que  $1,00$  mm ( $239$  mL  $g^{-1}$  STV). De la Rubia et al. (2011) relataram diferença não significativa entre ensaios com granulometrias distintas para a torta de óleo de girassol. Por outro lado, Palmowski e Müller (2000), verificaram 57% e 86% de acréscimo na produção de metano ao utilizar partículas de dimensões de 5 cm e 0,2 cm respectivamente, se comparada à amostra sem pré-tratamento ( $182$  mL  $g^{-1}$  STV), com maiores dimensões. A composição de cada substrato deve ser estudada para diferentes tamanhos de partículas, já que os teores de lipídeos, carboidratos e proteínas entre as frações do substrato podem ser variáveis e, por esse motivo, partículas maiores e menores de um mesmo material podem apresentar diferentes potenciais de produção de metano (FERREIRA et al., 2012).

Em relação ao rendimento metanogênico ( $R_m$ ), observou-se  $1,23 \pm 0,14$  (IN);  $2,36 \pm 0,22$  (T) e  $2,78 \pm 0,43$  mL  $g^{-1}$  STV  $h^{-1}$  (M), com período de início para produção de metano ( $\lambda$ ) de  $48,01 \pm 7,63$ ,  $27,31 \pm 4,11$  e  $35,10 \pm 4,99$  horas. Portanto, a redução da granulometria do BM favoreceu o  $R_m$  em (T) e (M) em relação à (IN). Já em (T) e (M) os valores de  $R_m$  foram similares. Aliado a isso, houve redução de  $\lambda$  para (T) e (M) se comparado à (IN) e

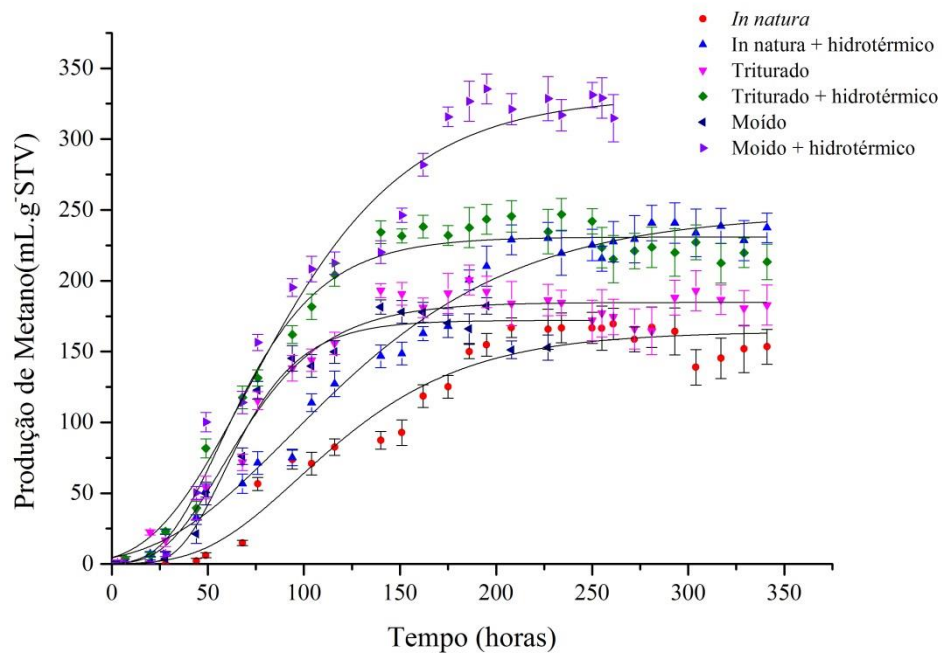
valores muito próximos em (T) e (M). Tsapekos et al. (2018) também constataram a redução de  $\lambda$  quando utilizaram grama submetida a cisalhamento, cuja produção de metano foi de 367 mL  $\text{g}^{-1}\text{STV}$  e  $\lambda$  igual a 2,69 dias para a grama com pré-tratamento mecânico, enquanto para a grama *in natura* os resultados obtidos foram de 305 mL  $\text{g}^{-1}\text{STV}$  e  $\lambda$  a 3,35 dias.

Por meio desses resultados verificou-se que a trituração e moagem do BM foram favoráveis ao acesso dos microrganismos ao substrato, uma vez que pré-tratamentos mecânicos, isto é, redução de partículas e alterações da área superficial, são favoráveis na redução da resistência da matéria-prima sólida à ação enzimática de modo a alterar as características da biomassa e favorecer a conversão a biogás, obtendo-se menor  $\lambda$  (HENDRIKS E ZEEMAN, 2009; TSAPEKOS et al. 2017).

Os efeitos da aplicação do sistema hidrotérmico para o BM com granulometria igual foram considerados significativos, segundo ANOVA com verificação do teste Tukey, para a variável  $P$ . Desse modo, obteve-se  $164,18 \pm 4,94$  mL  $\text{g}^{-1}$  STV (IN) e  $226,73 \pm 5,13$  mL  $\text{g}^{-1}$  STV (INH);  $184,76 \pm 0,22$  (T) e  $230,93 \pm 0,24$  mL  $\text{g}^{-1}$  STV (TH);  $171,58 \pm 0,24$ (M) e  $320,64 \pm 7,72$  mL  $\text{g}^{-1}$  STV (MH). O acréscimo da produção de metano para o BM *in natura*, trituração e moído após o pré-tratamento foram de 37,6%; 31,4% e 86%. Esses resultados são comparáveis aos de Ferreira et al. (2012), que também obtiveram maior produção de metano (296 mL  $\text{g}^{-1}$  STV) com palha de trigo pré-tratada em sistema hidrotérmico (180°C por 15 minutos) diante da palha de trigo *in natura* ( 233 mL  $\text{g}^{-1}$  STV), cujo acréscimo foi de 27%. Em concordância, Bauer et al. (2009) observaram acréscimo de 275 para 331 mL  $\text{g}^{-1}\text{STV}$  de metano (20%) com pré-tratamento de palha a 180 °C por 15 min. Chandra et al. (2012) também relataram aumento de 22% com o pré-tratamento da casca de arroz em sistema hidrotérmico (200 °C por 10 minutos), obtendo-se 132,7 mL  $\text{g}^{-1}\text{STV}$  quando a casca de arroz foi pré-tratada e 59,8 mL  $\text{g}^{-1}$  STV para a casca de arroz *in natura*. Rajput et al. (2018) verificaram 57,7% de acréscimo na produção de metano quando pré-trataram a palha de trigo a 180°C. Não foi mencionada a granulometria da matéria-prima utilizada por esses autores. Contudo, mesmo considerando o BM *in natura* e triturado (37,1 e 31,4%), nesta pesquisa o incremento de metano foi superior a todos os relatos. Provavelmente, isso se deveu à composição do substrato aplicado.



Figura 5.4 Variação temporal da produção de metano.



Fonte: o autor.

Em relação ao Rm, verificou-se  $1,23 \pm 0,14$  (IN),  $1,35 \pm 0,07$  (INH),  $2,36 \pm 0,07$  (T),  $2,87 \pm 0,24$  (TH),  $2,78 \pm 0,43$  (M) e  $2,57 \pm 0,22$  mL g<sup>-1</sup> STV.h<sup>-1</sup> (MH), não sendo significativa, portanto, a aplicação do sistema hidrotérmico para a variável Rm entre os ensaios com mesma granulometria. Quanto aos valores de  $\lambda$ , a diferença foi significativa apenas entre o IN, com BM *in natura* ( $48,01 \pm 7,63$  horas) e INH com o BM *in natura* mais hidrotérmico ( $26,21 \pm 4,53$  horas). Por outro lado, entre T ( $27,31 \pm 4,11$  horas) e TH ( $26,74 \pm 3,54$  horas), M ( $35,10 \pm 5,99$  horas) e MH ( $22,81 \pm 7,27$ ) mL g<sup>-1</sup> STV.h<sup>-1</sup> (MH) o pré-tratamento hidrotérmico não implicou diferença entre os valores de  $\lambda$ . Embora o pré-tratamento hidrotérmico do BM, provavelmente, tenha favorecido o acesso enzimático, verificou-se maior disponibilização de carga orgânica devido à solubilização de hemicelulose e celulose, o que exigiu a adaptação de microrganismos e pode ter contribuído para a manutenção de  $\lambda$ .

Observou-se valores iniciais de carboidratos totais solúveis para (IN), (INH), (T), (TH), (M) e (MH), respectivamente, de  $61,0 \pm 1,41$ ;  $95,5 \pm 2,12$ ;  $129,0 \pm 6,36$ ;  $132,5 \pm 3,53$ ;  $137,0 \pm 4,24$  e  $121,0 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> e finais de  $28,5 \pm 2,12$ ;  $29,0 \pm 2,82$ ;  $24,0 \pm 1,41$ ;  $13,5 \pm 2,12$ ;  $49,5 \pm 0,70$  e  $14,0 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>, resultando em redução de carboidratos de 53,3 ; 69,6; 81,4; 89,8; 85,4 e 88,4%. A redução de carboidratos ao término da operação foi elevada, sobretudo para os ensaios com o BM moído (M) e *in natura*, triturado e moído após pré-

tratamento hidrotérmico (INH, TH e MH). Todas as condições favoreceram a redução de mais da metade dos carboidratos solúveis (Tabela 5-3).

Tabela 5-2 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada para diferentes condições do BM.

Ensaio	$P$ (mL g <sup>-1</sup> STV)	$R_m$ (mL g <sup>-1</sup> STV.h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$R^2$
IN	164,18 ± 4,94	1,23 ± 0,14	48,01 ± 7,63	0,96
INH	226,73 ± 5,13	1,35 ± 0,07	26,21 ± 4,53	0,99
T	175,76 ± 2,66	2,36 ± 0,22	27,31 ± 4,11	0,98
TH	230,93 ± 2,87	2,87 ± 0,24	26,74 ± 3,54	0,98
M	171,58 ± 4,87	2,78 ± 0,43	35,10 ± 4,99	0,95
MH	320,64 ± 7,72	2,57 ± 0,22	22,81 ± 7,27	0,97

IN: *in natura*; INH: in natura e pré-tratado hidrotermicamente; T: triturado; TH: triturado e pré-tratado hidrotermicamente; M: moído e MH: moído e pré-tratado hidrotermicamente.

Constatou-se que para o BM *in natura*, cuja maioria das partículas esteve entre 5,6 e 4,75 mm, as concentrações de carboidratos totais foram relativamente reduzidas no início da operação, 61,0 ± 1,41 mg.L<sup>-1</sup> (IN) e 95,5 ± 2,12 mg.L<sup>-1</sup> (INH), comprovando a maior resistência de solubilização desses compostos em comparação com ao BM nas demais granulometrias (Figura 5.5).

Tabela 5-3 Parâmetros físico-químicos dos ensaios em batelada para diferentes condições do BM.

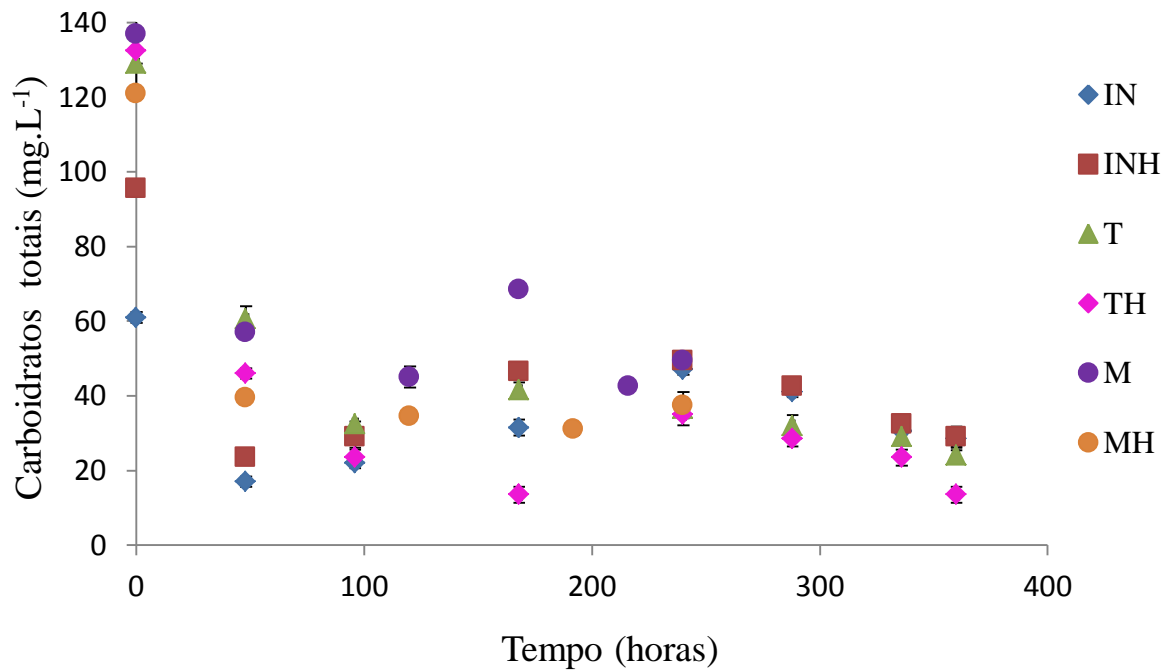
Ensaio	DQO		Carboidratos		Fenóis		SST	
	Máxima concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Remoção (%)	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Remoção (%)	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Final (mg.L <sup>-1</sup> )
IN	351 ± 5,65	52,70	61 ± 1,41	53,3	16,16 ± 1,41	5,47	485	480
INH	1.982 ± 11,31	88,5	95,5 ± 2,12	69,6	26,6 ± 2,12	18,49	325	330
T	1.985 ± 9,19	88,7	129 ± 6,36	81,4	30,23 ± 2,12	17,44	454,3	450,8
TH	3.720 ± 4,24	96,30	132,5 ± 3,53	89,8	38,49 ± 2,78	32,21	286	290
M	5.015 ± 14,94	77,38	137 ± 4,24	86,6	35,81 ± 1,48	25,38	180	150
MH	4.480 ± 11,31	84,7	121 ± 1,41	96,9	52,46 ± 4,24	26,28	290	300

IN: *in natura*; INH: in natura e pré-tratado hidrotermicamente; T: triturado; TH: triturado e pré-tratado hidrotermicamente; M: moído e MH: moído e pré-tratado hidrotermicamente.

Quanto aos ensaios com BM triturado (com maioria das partículas de 1,00 a 0,84 mm) e moído (de 0,59 a 0,84 mm, majoritariamente) e ambos, após o pré-tratamento hidrotérmico, as concentrações iniciais de carboidratos observou-se valores próximos 129 ± 6,36; 132,5 ± 3,53; 132,5 ± 3,53 e 121 ± 1,41 mg.L<sup>-1</sup> para (T), (TH), (M) e (MH), respectivamente. No entanto, é provável que nos períodos posteriores da operação, a metabolização de celulose e

hemicelulose tenha prosseguido com maior facilidade, haja vista a matéria orgânica carbonácea liberada após 48 horas observadas nos ensaios (INH), (T), (TH), (M) e (MH).

Figura 5.5 Variação temporal de carboidratos solúveis dos reatores em batelada em diferentes condições do BM.



Fonte: o autor.

Observou-se tendência de redução dos carboidratos totais no meio reacional nas primeiras 48 horas, quando ocorreu a etapa de adaptação microbiana, com  $17,0 \pm 1,41$  (IN);  $23,5 \pm 0,71$  (INH);  $60,5 \pm 3,53$  (T);  $46 \pm 1,41$  (TH);  $57,0 \pm 2,14$  (M) e  $39,5 \pm 0,70$  mg.L<sup>-1</sup> (MH). Durante a operação verificou-se liberação de carboidratos em decorrência da hidrólise da biomassa, certificada pela detecção do aumento das concentrações até  $47,0 \pm 1,41$  (IN);  $49,5 \pm 0,70$  (INH);  $41,5 \pm 2,12$  (T);  $35,0 \pm 2,82$  (TH);  $68,5 \pm 0,70$  (M) e  $37,5 \pm 3,53$  mg.L<sup>-1</sup> (MH), prosseguindo redução em virtude da atividade microbiana (Figura 5.5).

Em relação à matéria orgânica, valores iniciais de  $342,5 \pm 3,53$  (IN);  $415 \pm 8,48$  (INH);  $430,5 \pm 9,19$  (T);  $555,5 \pm 25,57$  (TH);  $595 \pm 7,07$  (M) e  $679 \pm 11,31$  mg.L<sup>-1</sup> (MH) foram observados (Figura 5.6). Verificou-se tendência de solubilização de compostos orgânicos no decorrer da operação, a partir de 48 horas de operação, exceto em IN. As máximas concentrações verificadas no decorrer da operação foram de  $351,0 \pm 5,65$  (IN);  $1.982,0 \pm 11,31$  (INH);  $1.985 \pm 9,19$  (T);  $3.720,0 \pm 16,24$  (TH);  $5.015,0 \pm 14,94$  (M) e  $4.480 \pm 11,31$  mg.L<sup>-1</sup> (MH). A adaptação microbiana às condições do reator metanogênico causou

acréscimo da matéria orgânica solúvel devido à produção de ácidos orgânicos e monômeros de açúcares pela ação de bactérias fermentativas (AHMAD et al., 2018). Em estudo visando à degradação anaeróbia de bagaço de cana de açúcar, Rabelo et al. (2018) também observaram formação de matéria orgânica carbonácea relacionada, sobretudo, aos ácidos orgânicos, após dois dias de operação. Ao término constatou-se consumo de matéria orgânica de  $162,0 \pm 2,82$  (IN);  $227,0 \pm 9,89$  (INH);  $225,0 \pm 7,07$  (T);  $137,5 \pm 6,36$  (TH);  $1.134,0 \pm 62,22$  (M) e  $684,5 \pm 20,5$  mg.L<sup>-1</sup>(MH), e remoção de 52,70; 88,5; 88,7; 96,30; 79,4 e 84,7%, respectivamente, em relação às concentrações máximas detectadas.

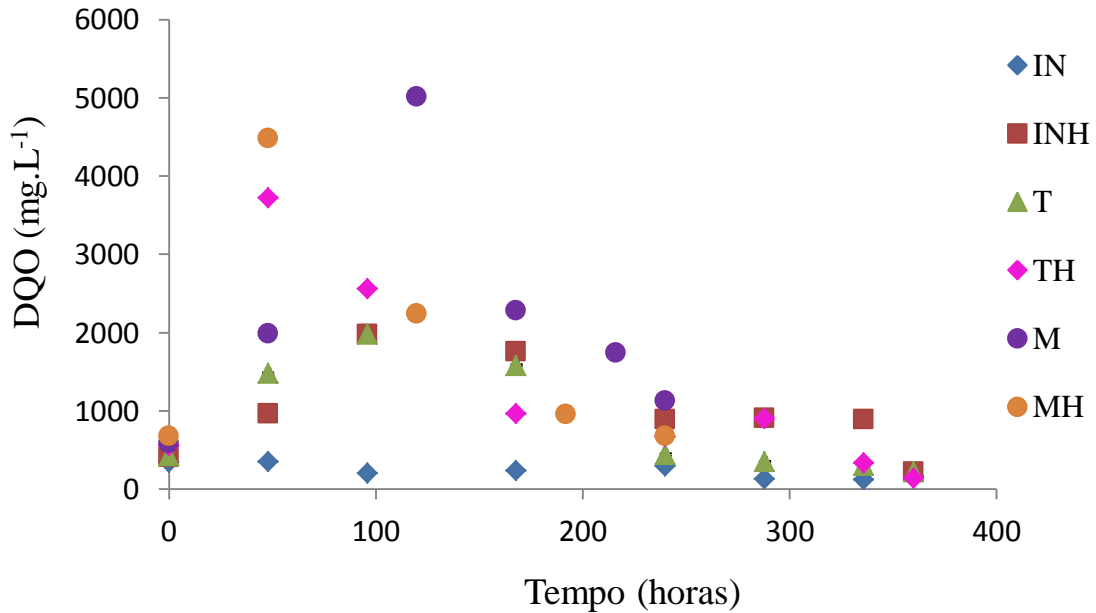
A tendência de, inicialmente, aumentar a matéria orgânica carbonácea e as concentrações de ácidos orgânicos, e posteriormente, ocorrer consumo de ambos se deveu à dificultosa degradação da lignina e hemicelulose da fração sólida. Essa tendência também foi relatada por Veluchamy e Kalamdhad (2017) durante a digestão anaeróbia da polpa de papel. Diante disso, pode-se afirmar que houve metabolização de mais da metade da matéria orgânica solúvel, sobretudo para os ensaios cujo substrato havia sido pré-tratado.

Para as condições do ensaio (IN) observou-se menor remoção de matéria orgânica (52,70%), bem como menor  $P$  ( $164,18 \pm 4,94$  mL. g<sup>-1</sup> STV) e maior  $\lambda$  ( $48,01 \pm 7,63$  horas). Além disso, houve pouca variação da matéria orgânica solúvel durante a operação, reiterando a elevada recalcitrância da estrutura lignocelulósica do BM nessa condição (Figura 5.6). Já para (MH), constatou-se elevada liberação de matéria orgânica ( $4.480 \pm 11,31$  mg.L<sup>-1</sup>), capacidade de assimilação pela consórcio microbiano resultando em maior  $P$  ( $320,64 \pm 7,72$  mL. g<sup>-1</sup> STV) e concentração final de  $684,5 \pm 20,5$  mg.L<sup>-1</sup>. Em (M) também verificou-se elevada solubilização de compostos orgânicos ( $5.015 \pm 14,94$  mg.L<sup>-1</sup>), no entanto, foi verificada maior concentração final de matéria orgânica para essa condição ( $1.134,0 \pm 62,22$  mg.L<sup>-1</sup>), com menor remoção (77,38%). Os resultados para (M) são condizentes com a alta concentração de ácidos orgânicos na amostra final do ensaio.

Em relação aos fenóis observou-se, respectivamente,  $16,16 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup>;  $26,6 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>;  $30,23 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>;  $38,49 \pm 2,78$  mg.L<sup>-1</sup>;  $35,8 \pm 1,48$  mg.L<sup>-1</sup> e  $52,46 \pm 4,24$  mg.L<sup>-1</sup>, para (IN), (INH), (T), (TH), (M) e (MH). Ao término de todos os ensaios observou-se  $5,5 \pm 4,77$  mg.L<sup>-1</sup>;  $18,5 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>;  $17,4 \pm 1,78$  mg.L<sup>-1</sup>;  $32,2 \pm 1,78$  mg.L<sup>-1</sup>;  $25,4 \pm 1,48$  mg.L<sup>-1</sup> e  $26,3 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup> para (IN), (INH), (T), (TH), (M) e (MH), respectivamente. O rompimento da estrutura lignocelulósica do BM em sistema hidrotérmico acarretou aumento da concentração de compostos fenólicos no meio, uma vez que as concentrações de (INH), (TH) e (MH) foram superiores a (IN), (T) e (M). Foi verificado  $52,46 \pm 4,24$  mg.L<sup>-1</sup> de compostos fenólicos no início da operação para (MH), com menor granulometria de BM,

enquanto para (INH) e (TH) as concentrações foram inferiores, de  $38,49 \pm 5,65$  e  $26,6 \pm 2,12$   $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 5.6 Variação temporal de matéria orgânica solúvel dos reatores em batelada em diferentes condições do BM.



Fonte: o autor.

A partir da degradação da hemicelulose e celulose ocorre a solubilização da lignina e consequente aumento das concentrações de fenólicos livres. Provavelmente, em (MH), o acréscimo da concentração de fenóis no meio foi decorrente da hidrólise mais eficiente e melhor solubilização de lignina no meio reacional (BARAKAT et al, 2012.). Por meio da remoção de carboidratos totais de 96,9%, elevada solubilização de matéria orgânica ( $4.480 \pm 11,31$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) e  $P$  de  $320,64 \pm 7,72$   $\text{mL g}^{-1}$  STV pode-se inferir que a concentração inicial de compostos fenólicos ( $52,46 \pm 4,24$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) não implicou em ambiente inibitório para a metanogênese.

Ao ensaio (IN) associou-se a menor liberação de fenóis no início da operação ( $16,16 \pm 1,41$   $\text{mg.L}^{-1}$ ), condição na qual obteve-se menor solubilização de carboidratos ( $61 \pm 1,41$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) e matéria orgânica ( $351 \pm 5,65$   $\text{mg.L}^{-1}$ ), o que resultou em menor atividade metanogênica, com de  $P$  ( $164,18 \pm 4,94$   $\text{mL.g}^{-1}$  STV). A reduzida concentração de fenóis é provável consequência da solubilização limitada de lignina no meio, assim como de hemicelulose e celulose.

O pré-tratamento térmico a elevadas temperaturas da biomassa lignocelulósica libera compostos tóxicos ao crescimento de microrganismos que, além de fenóis, compreendem

também furfural, 5-HMF e compostos furânicos que agem danificando o DNA e inibindo enzimas (HENDRICKS e ZEEMAN, 2009; NITSOS et al., 2013). É provável que a presença de compostos não detectados nessa pesquisa, como furfural e 5-HMF, ou as concentrações de compostos fenólicos observadas possam ter afetado a estrutura das populações de bactérias e arqueias sem, entretanto, inibir totalmente a atividade metanogênica nessas condições.

Para todos os ensaios foram constatadas concentrações finais de carboidratos inferiores às iniciais, confirmando consumo desses compostos. Maintinguer et al.(2008) relataram a degradação de 240 mg.L<sup>-1</sup> de fenóis (100% do total adicionado), fonte única de carbono empregada em reatores anaeróbios em batelada na presença de extrato de levedura. A conversão de fenol via fermentação anaeróbia ocorre com transformação em ácido acético, metano e dióxido de carbono. Logo, nesta pesquisa, é provável que o fenol liberado no meio em decorrência da degradação da estrutura lignocelulósica do BM tenha sido metabolizado e convertido em ácido acético, metano e dióxido de carbono.

No que se refere aos SST do meio reacional ao início e término dos ensaios, as concentrações iniciais e finais não representaram diferenças significativas (menor que 10%) de modo a não apresentar tendência de acordo com as condições estabelecidas. No entanto, a manutenção das concentrações de SST pode indicar a adaptação da biomassa microbiana. Os valores iniciais observados foram de 485 mg.L<sup>-1</sup>(IN); 325 mg.L<sup>-1</sup> (INH), 454,3 mg.L<sup>-1</sup> (T); 286 mg.L<sup>-1</sup> (TH); 180 mg.L<sup>-1</sup> (M) e 290 mg.L<sup>-1</sup>(MH), enquanto os finais foram de 480 mg.L<sup>-1</sup> (IN); 330 mg.L<sup>-1</sup> (INH), 450,8 mg.L<sup>-1</sup> (T); 290 mg.L<sup>-1</sup> (TH); 150 mg.L<sup>-1</sup> (M) e 300 mg.L<sup>-1</sup>(MH).

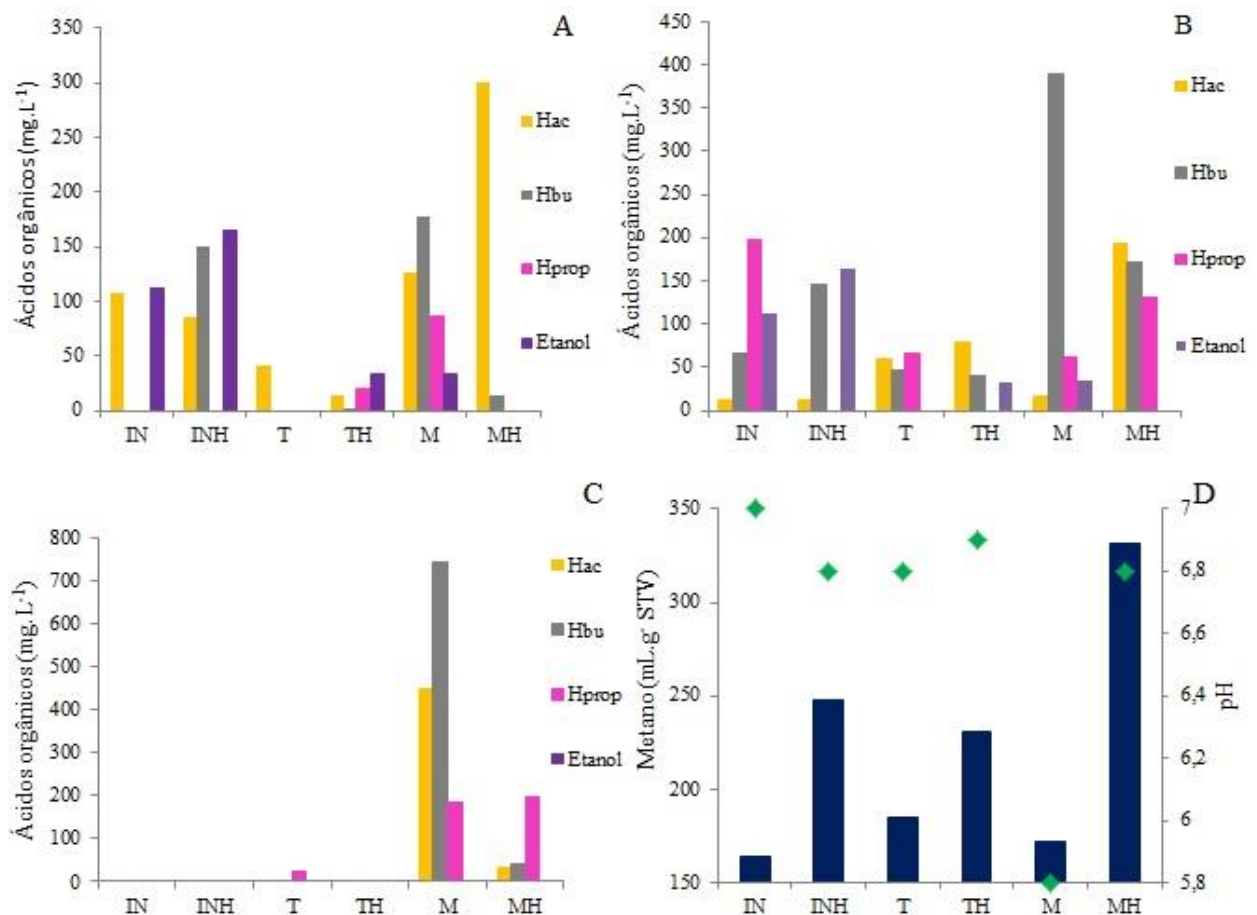
Por meio de análise de ácidos orgânicos e álcool foram observadas concentrações iniciais de, respectivamente: (IN) 108,0 e 112,83 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético e etanol; (INH) 85,69; 150,44 e 164,30 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, butírico e etanol; (T) 41,16 de ácido acético; (TH) 13,78; 2,97; 19,56 e 33,11 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, butírico, propiônico e etanol; (M) 126,57; 177,49; 86,40 e 33,51 de ácido acético, butírico, propiônico e etanol e (MH) 500,48 e 14,65 de ácido acético e butírico.

Durante a fase exponencial de produção de metano, foi verificada liberação e consumo desses ácidos a partir de, respectivamente: (IN) 12,34; 65,45; 198,29 e 112,83 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, butírico, propiônico e etanol; (INH) 11,23; 145,34 e 164,30 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, butírico e etanol; (T) 41,16 de ácido acético; (TH) 58,67; 45,46; 65,89 de ácido acético, butírico, e etanol; (M) 16,84; 388,32; 60,43 e 34,21 de ácido acético, butírico, propiônico e etanol e (MH) 192,47; 171,96; 131,15 de ácido acético, butírico e propiônico. Nessa fase, maior concentração de ácidos orgânicos foram constatadas para os (M) e (MH), o que

certamente contribuiu com a detecção de elevadas concentrações de compostos orgânicos com máximas de  $5.015 \pm 14,94$  e  $4.480 \pm 11,31$  mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5.7). As concentrações de ácido isobutanol, isobutírico e isovalérico foram observadas abaixo do limite de detecção do método cromatográfico.

Ao término dos ensaios (IN), (INH) e (TH) foram verificadas concentrações de ácidos orgânicos abaixo do limite de detecção e em (T), de 24,86 mg.L<sup>-1</sup> de ácido propiônico. Nessas condições, as reduzidas concentrações de ácidos orgânicos durante a fase exponencial e final de produção de metano se relacionaram ao eficiente consumo de ácidos orgânicos e sintrofia entre as bactérias fermentativas e arqueias metanogênicas (NIELSEN et al., 2011). Ao encontro das reduzidas concentrações de ácidos orgânicos, constatou-se pH final de  $7,0 \pm 0,10$  (IN);  $6,8 \pm 0,14$  (INH);  $6,8 \pm 0,12$  (T);  $6,9 \pm 0,12$  (TH).

Figura 5.7 Ácidos orgânicos em função dos ensaios em reatores em batelada nas condições (IN), (INH), (T), (TH), (M) e (MH).



A= amostra inicial; B= amostra intermediária e C= amostra final. Hac = ácido acético; Hbu = ácido butírico; Hprop = ácido propiônico.

Fonte: o autor.

Por outro lado, em (M) havia 447,92; 466,14 e 741,73 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente, no momento do encerramento dos reatores, o que certamente contribuiu para o pH de  $5,8 \pm 0,12$ . Nesse caso, provavelmente houve redução da atividade das arqueias metanogênicas acetoclásticas, enquanto as bactérias acidogênicas mantiveram atividade metabólica intensa, o que induziu ao acúmulo de ácido acético, butírico e propiônico. A relação simbiótica pode ter sido deturpada devido a toxicidade ou diminuição do pH pelo acúmulo de ácidos orgânicos e suas concentrações continuaram a aumentar, causando diminuição abrupta do pH e acidificação do reator (KHANAL et al., 2008).

Para o ensaio MH foi verificada, ao término da operação, 196,75 mg.L<sup>-1</sup>, 10,8 mg.L<sup>-1</sup> e 34,5 mg.L<sup>-1</sup> dos ácidos propiônico, acético e butírico, respectivamente. Apesar disso, observou-se pH próximo a neutralidade ( $6,8 \pm 0,15$ ). Para concentração de ácido acético no início da operação em (MH), de 300 mg.L<sup>-1</sup>, somado a outros fatores, provavelmente, pode ter contribuído a maior adaptação da microbiota, já que a fase  $\lambda$  foi reduzida ( $22,81 \pm 7,27$  horas). O ácido acético é um metabólito intermediário para a conversão a metano na digestão anaeróbia, que pode ser facilmente tolerado pelo consórcio microbiano e eficientemente utilizado por arqueias metanogênicas (MONLAU et. al, 2014.).

Portanto, nessa etapa, a aplicação do BM, com granulometria predominantemente de 0,59 a 0,84 mm, aliado ao pré-tratamento hidrotérmico a 180°C por 15 minutos, implicou em condições mais favoráveis a metanogênese, tendo em vista a maior produção de metano ( $320,64 \pm 7,72$  mL. g<sup>-1</sup> STV), eficiente consumo de carboidratos (96,9%) e matéria orgânica (84,7%) e a capacidade de sintrofia do consórcio microbiano.

## 5.2.2 Caracterização microbiana

### 5.2.2.1 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

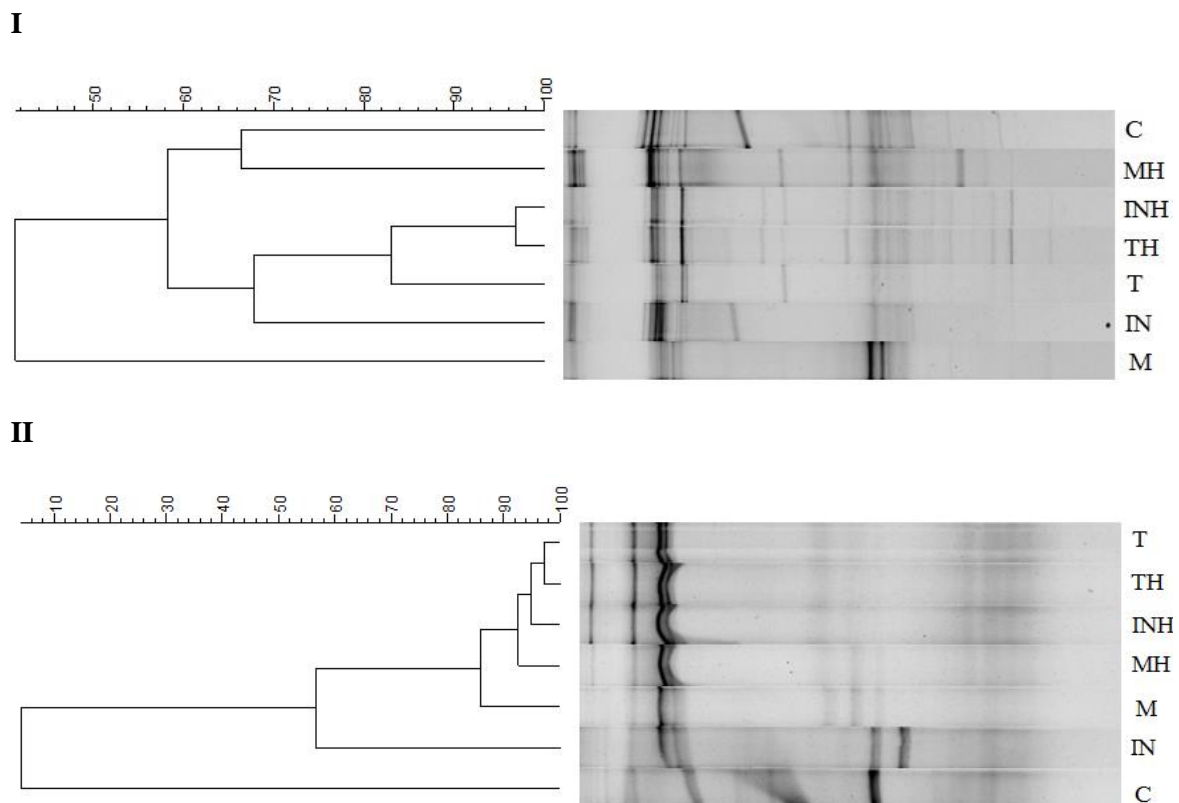
As populações de bactérias e arqueias dos reatores em batelada com BM *in natura* (IN), BM *in natura* e pré-tratado em reator hidrotérmico (INH), BM triturado (T), BM triturado e pré-tratado em reator hidrotérmico (TH), BM moído (M), BM moído e pré-tratado em reator hidrotérmico (MH), assim como dos reatores controle (C), foram comparadas utilizando PCR/DGGE (Figura 5.8).

As populações bacterianas foram modificadas pela ausência do substrato empregado, haja vista que a similaridade entre os reatores controle (C) e aqueles contendo BM *in natura* (IN) foi de 58%. A estrutura da comunidade de bactérias entre os ensaios (IN) e (T) e entre



(IN) e (M) foram de 68% e 41% de similaridade. Logo, pode-se inferir que a alteração das populações foi influenciada pelo tamanho das frações de BM, os quais eram majoritariamente de: 4,75 a 5,6 mm (IN); 0,84 a 1,41 mm (T) e 0,59 a 0,84 mm (M). A redução de carboidratos totais de 53,3% em IN, 81,4 % em T e 86,6 % em (M) reiteram que a atividade de bactérias hidrolíticas e acidogênicas foi distinta nas três condições, havendo variação da taxa de consumo de carboidratos.

Figura 5.8 Perfil de bandas do DGGE para domínio Bacteria e Archaea.



IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Fonte: o autor.

A partir dos índices de diversidade (Shannon-Wiener) para IN (1,91), T (2,38) e M (2,20) e os índices de riqueza relativa de Chao-1 em IN (11), T (16) e M (9) para a comunidade bacteriana, foi possível inferir que na condição com o BM *in natura*, de maior recalcitrância do substrato, na qual houve diversidade reduzida das populações e dominância de 0,213, provavelmente, populações com maior capacidade hidrolítica se sobressaíram em detrimento de outras, obtendo a menor redução de carboidratos totais (53,3%). Em (T), observou-se diversidade maior de populações e dominância menor (0,116), comprovando a atuação de vários grupos de bactérias na hidrólise, acidogênese e acetogênese, facilitadas pela

redução da granulometria. Quanto ao ensaio (M), no qual verificou-se acidificação do meio com concentrações elevadas de ácido butírico e acético verificou-se dominância de 0,162 e maior diversidade (2,20), provavelmente, devido ao crescimento de várias populações que atuaram nas etapas anteriores, facilitada pela redução da granulometria, e na formação de ácidos orgânicos.

Quanto às condições com o BM pré-tratado em hidrotérmico observou-se similaridade entre (INH) e (TH) de 58% e entre (INH) e (MH) também de 58% da estrutura da comunidade bacteriana, comprovando que o uso de BM com granulometria menor implicou em alteração das populações de bactérias, sobretudo, após o pré-tratamento. Aliado a isso, teve-se redução de carboidratos totais de 69,6% (INH), 89,8% (TH) e 96,9% (MH), possivelmente o pré-tratamento hidrotérmico somado à reduzida granulometria do BM, favoreceu a disponibilização de substrato, resultando em melhor desempenho na conversão de carboidratos.

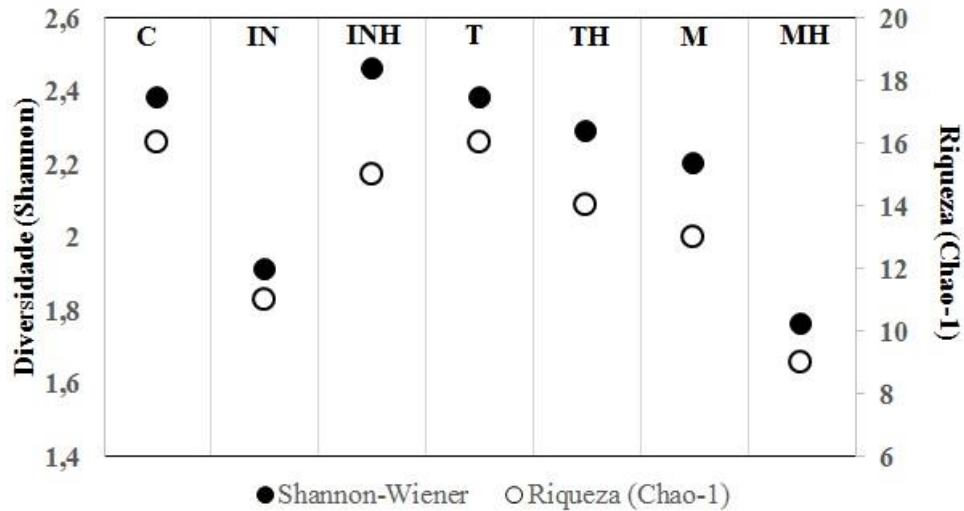
De acordo com os índices de diversidade (Shannon-Wiener) de INH (2,46); TH (2,29) e MH (1,76) e de riqueza relativa (Chao-1) de 15 (INH), 14 (TH) e 9 (MH), verificou-se tendência de decréscimo da diversidade e da riqueza relativa das populações de bactérias a medida que aplicou-se BM pré-tratado e com menor granulometria como substrato. Em concordância, os índices de dominância em (INH), (TH) e (MH) foram de 0,098; 0,120 e 0,216, respectivamente, ou seja, inversamente proporcional aos índices de Shannon-Wiener (Tabela 5-4 e Figura 5.9 e 5.10).

Tabela 5-4 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Bacteria.

	C	IN	INH	T	TH	M	MH
Dominância	0,111	0,213	0,098	0,116	0,120	0,162	0,216
Shannon-Wiener	2,38	1,91	2,46	2,38	2,29	2,20	1,76
Chao-1	16	11	15	16	14	13	9

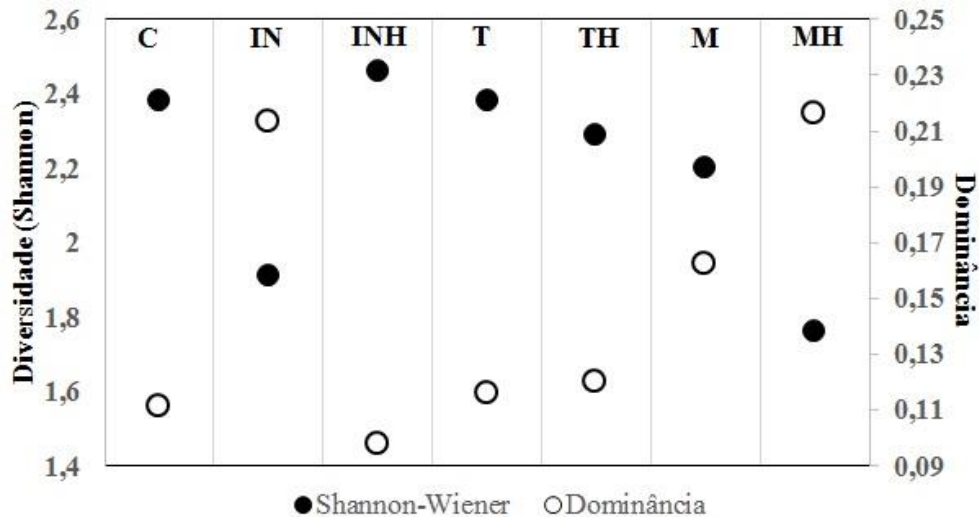
IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Figura 5.9 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para o domínio Bacteria.



IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Figura 5.10 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para o domínio Bacteria.



IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Fonte: o autor.

Em relação a estrutura populacional de arqueias metanogênicas verificou-se alteração expressiva na ausência do substrato, tendo em vista a similaridade de apenas 4% entre (C) e os demais ensaios. Foi observada similaridade de 57% entre populações de arqueias de (IN) e (T) e também de 57% entre (IN) e (M). Logo, pode-se inferir que as diferentes taxas de metabolização de carboidratos complexos a ácidos orgânicos, pela ação das populações de bactérias, influenciaram na disponibilização de substrato para a conversão a metano por meio de arqueias metanogênicas. Apesar da similaridade de 57% entre esses ensaios, foram obtidas

produções de metano próximas ( $164,18 \pm 4,94$ ;  $175,76 \pm 2,66$  mL.g<sup>-1</sup> STV e  $171,58 \pm 4,87$  mL.g<sup>-1</sup> STV para IN, T e M, respectivamente). Por outro lado, é provável que tenha ocorrido rápida metabolização de carboidratos complexos, como já mencionado nessa pesquisa, algumas populações de arqueias podem ter sido inibidas pela acidificação do meio, verificada pela diminuição do pH final (5,8) e acúmulo de ácidos butírico, acético e propiônico (Tabela 5.5). No entanto, algumas populações se adaptaram a essa condição e atuaram na produção de metano, uma vez que observou-se  $171,58 \pm 4,87$  mL.g<sup>-1</sup> STV para (M).

Nos ensaios sem pré-tratamento hidrotérmico os índices de diversidade (Shannon-Wiener) observados para arqueias foram de 1,61 (IN), 1,79 (T) e 2,00 (M), de dominância 0,283 (IN), 0,212 (T) e 0,168 (M) e de riqueza relativa (Chao-1) de 11 (IN), 10 (T) e 11 (M). Portanto, verificou-se acréscimo da diversidade de arqueias a medida que a granulometria foi reduzida, o que provavelmente foi relacionado a disponibilidade de substrato.

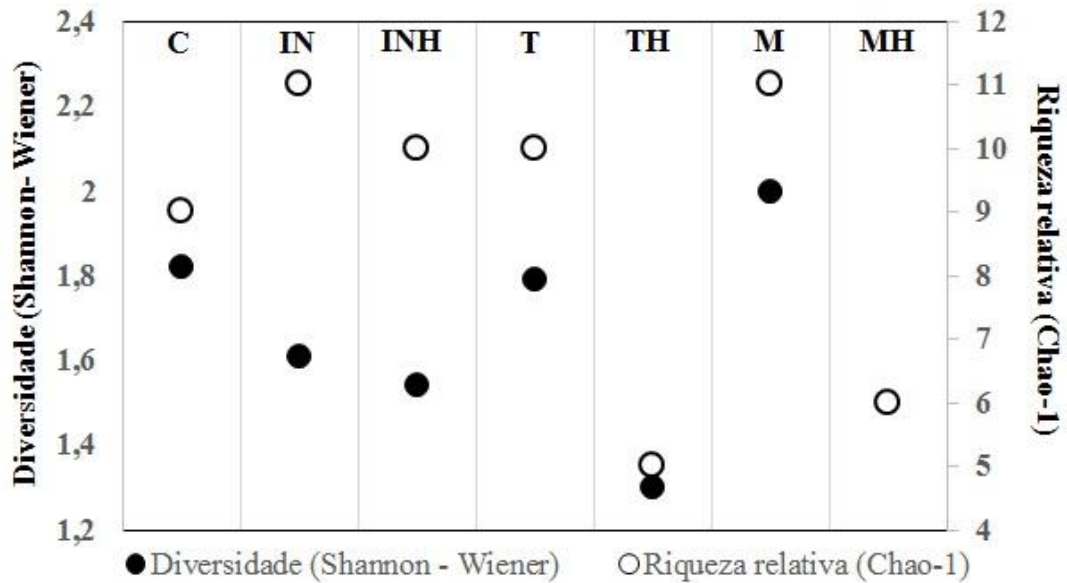
Em função da redução da granulometria aliada ao pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico verificou-se similaridade de 95% entre (INH) e (TH) e de 93% entre (INH) e (MH) e também de 93% entre (TH) e (MH). A produção de metano para os ensaios (INH) e (TH) foi próxima; ou seja de  $226,73 \pm 5,13$  e  $230,93 \pm 2,87$  mL. g<sup>-1</sup> STV, respectivamente. Por outro lado, em (MH), obteve-se produção de  $320,64 \pm 7,72$  mL. g<sup>-1</sup> STV devido a maior disponibilidade de substrato para a metanogênese (Tabela 5-5 e Figura 5.11 e 5.12).

Tabela 5-5 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea.

	C	IN	INH	T	TH	M	MH
Dominância	0,184	0,283	0,279	0,212	0,338	0,168	0,408
Shannon-Wiener	1,82	1,61	1,54	1,79	1,30	2,00	1,18
Chao-1	9	11	10	10	5	11	6

IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

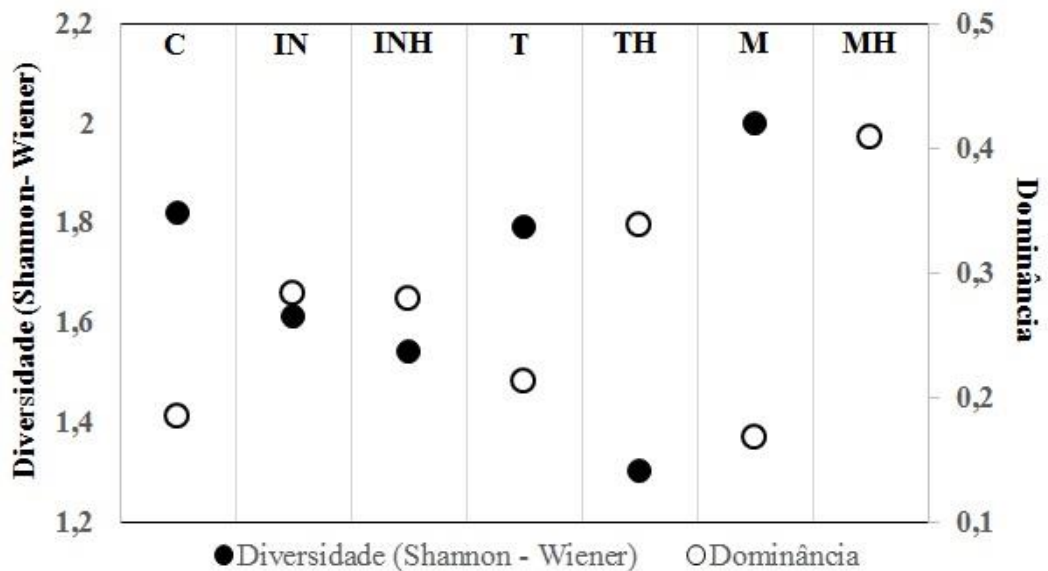
Figura 5.11 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea.



IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Fonte: o autor.

Figura 5.12 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para o domínio Archaea.



IN= *in natura*; INH= *in natura* mais hidrotérmico, T= triturado; TH= triturado mais hidrotérmico; M= moído; MH= moído mais hidrotérmico.

Fonte: o autor.

Em relação aos índices de diversidade foram observados 1,54 (INH), 1,30 (TH) e 1,18 (MH) e de riqueza relativa de 10 (INH), 5 (TH) e 6 (MH). Observou-se, portanto, tendência da redução da diversidade de populações a medida que a granulometria do BM foi reduzida e

pré-tratada em hidrotérmico. Concordante a isso, as dominâncias foram de 0,279 (INH), 0,338 (TH) e 0,408 (MH), evidenciando que algumas populações melhor se adaptaram às condições (TH) e (MH).

A eficiência de conversão de carboidratos a ácidos orgânicos interfere diretamente na produção de metano. Nessas condições, foi verificada simbiose entre o consórcio microbiano, uma vez que verificou-se consumo de carboidratos de 69,6% (INH), 89,8% (TH), 96,9% (MH) e foram verificadas remoções da matéria orgânica de 88,5% (INH), 96,30 (TH) e 84,7% (MH), sem acidificação do meio nos reatores em batelada.

### **5.2.3 Planejamento experimental por Delineamento Composto Central para o bagaço de malte em reator hidrotérmico**

O Delineamento Composto Central, planejamento experimental sem pontos axiais e com 3 repetições no ponto central, foi realizado com o intuito de apontar quais os efeitos das interações entre temperatura e tempo sob a resposta da variável produção de metano ( $P$ ) e, dessa forma, indicar qual a melhor condição para a etapa de DCCR, na qual foram estudadas as variações de temperatura de incubação, concentração de BM e volume da fração líquida resultante do sistema hidrotérmico (hidrolisado).

Desse modo, nessa etapa foram conduzidos 7 ensaios com BM moído e pré-tratado em reator hidrotérmico nas condições de temperatura e tempo: (B1) 150 °C por 10 minutos; (B2) 210 °C por 20 minutos; (B3) 150 °C por 20 minutos; (B4) 210 °C por 10 minutos; (B5) 180 °C por 15 minutos ; (B6) 180 °C por 15 minutos e (B7) 180 °C por 15 minutos. Os valores dos pontos centrais (B5, B6 e B7) foram definidos segundo resultados da literatura reportada neste estudo. As variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis codificados (-1,42; -1; 0; 1; 1,42). Considerou-se significativos os fatores com nível de confiança superior a 90%, enquanto os efeitos significativos foram considerados em relação à produção máxima de metano (Tabela 5-6).

A análise da variância (ANOVA) foi realizada com a finalidade de testar a significância das variáveis independentes perante a produção de metano (Tabela 5-7). O valor de  $p$  do coeficiente de regressão foi significativo ao nível de 0,10% e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 97,9%, com bom ajuste entre os valores experimentais e os preditos.

Tabela 5-6 Matriz do DCC para as variáveis (x1) temperatura e (x2) tempo de pré-tratamento e respostas obtidas e predita.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Valor experimental	Valor predito
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Produção de metano (mL. g <sup>-1</sup> STV)	Produção de metano (mL. g <sup>-1</sup> STV)
B1	-1	-1	150	10	250,04	253,55
B2	1	-1	210	20	333,02	336,53
B3	-1	1	150	20	235,01	238,52
B4	1	1	210	10	411,64	415,15
B5	0	0	180	15	302,33	310,94
B6	0	0	180	15	318,15	310,94
B7	0	0	180	15	326,37	310,94

Os dados experimentais ajustaram-se ao modelo linear por meio do método de superfície de resposta, o qual prediz a produção de metano (Equação 4):

$$Y_1 = 310,94 + 64,90 x_1 + 15,90 x_2 + 23,41 x_1 x_2 \quad (4)$$

Em que :

Y<sub>1</sub>= produção predita de metano (mL. g<sup>-1</sup> STV);

X<sub>1</sub>= temperatura do sistema hidrotérmico (°C);

X<sub>2</sub>= tempo de pré-tratamento (minutos);

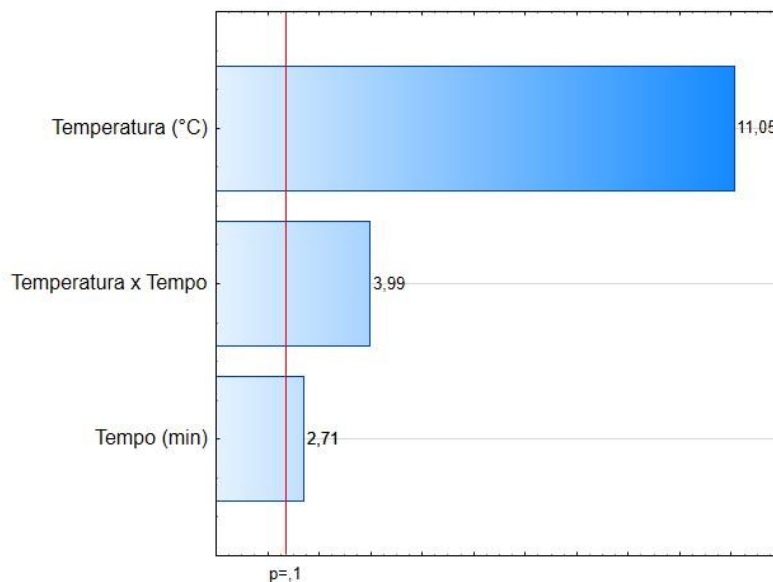
Tabela 5-7 ANOVA para o efeito da temperatura e tempo de pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos quadrados	F-valor	P-valor	Fatores
Temperatura	16849,34	1	16849,34	122,2222	0,001585	Significante
Temperatura x Tempo	2192,58	1	2192,58	15,9055	0,073286	Significante
Tempo	1010,92	1	1010,92	7,3335		Significante
Erro	413,55	3	137,85			
Total	20466,4	6				

Comparando-se os valores das variáveis t<sub>calculada</sub> e t<sub>tabelada</sub> (2,35) conclui-se que foram significativos os efeitos da temperatura, da interação entre temperatura e tempo e do tempo e

em relação à produção de metano, exibidos em ordem decrescentes de magnitude (Figura 5.13). A partir de então, observou-se que a variável resposta foi mais sensível à variação da temperatura do que do tempo de pré-tratamento.

Figura 5.13 Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis: temperatura ( $x_1$ ) e tempo ( $x_2$ ).

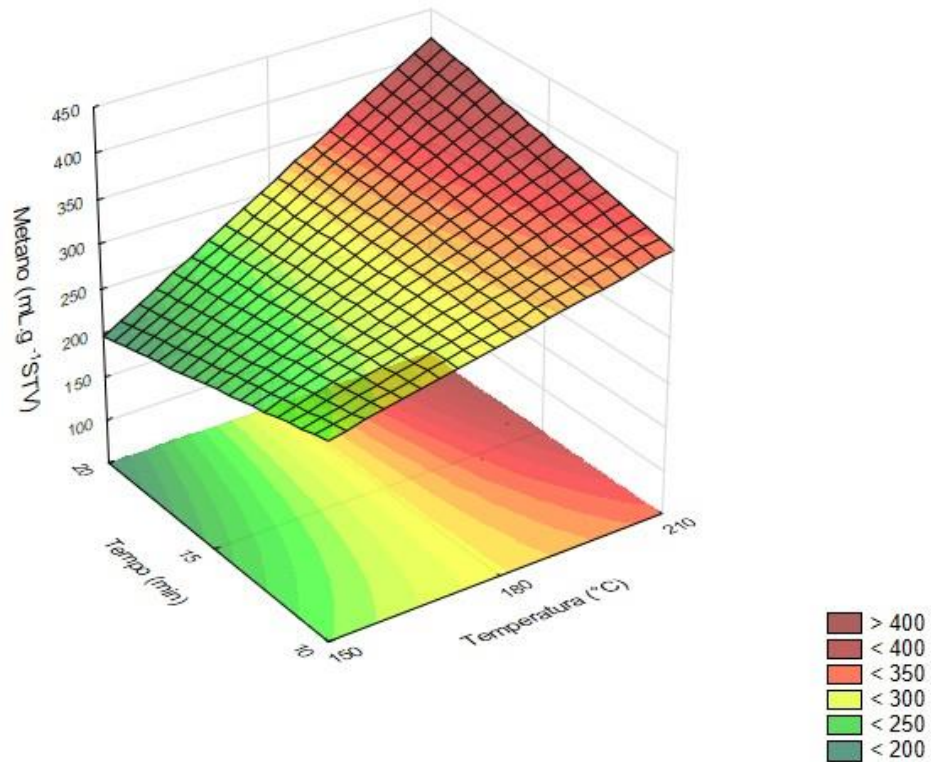


Fonte: o autor.

A superfície de resposta tridimensional ilustra o efeito da temperatura e do tempo no pré-tratamento em sistema hidrotérmico em relação à produção de metano (Figura 5.14).



Figura 5.14 Superfície de resposta para os efeitos da temperatura e tempo do pré-tratamento do BM em reator hidrotérmico.



Fonte: o autor.

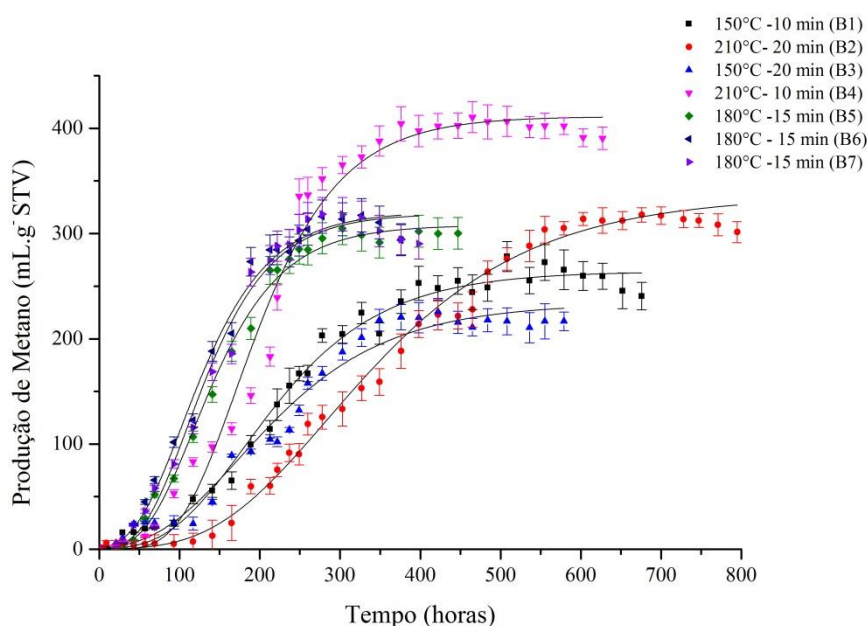
As severidades de cada condição de pré-tratamento, bem como as pressões atingidas e a produção de metano ( $P$ ) obtida estão correlacionados na Tabela 5-8.

Tabela 5-8 Características dos pré-tratamentos em reator hidrotérmico e a produção máxima de metano obtida.

Condição (Temperatura-tempo)	Severidade do pré-tratamento	Pressão (bar)	Produção de metano (mL. g <sup>-1</sup> STV)
150 °C – 10 minutos	2,5	5,0	250,04 ± 9,93
150 °C – 20 minutos	2,8	5,0	235,01 ± 10,14
180 °C – 15 minutos	3,5	9,6	302,33 ± 3,85; 318,15 ± 6,12 e 326,37 ± 7,01
210 °C – 10 minutos	4,2	12,0	411,64 ± 7,19
210 °C – 20 minutos	4,5	12,0	333,02 ± 11,28

Obteve-se ajuste dos perfis temporais para a produção de metano ao modelo de Gompertz com  $R^2 \geq 0,97$  para todos os sete ensaios (Figura 5.15 e Tabela 5-9).

Figura 5.15 Variação temporal de metano para os ensaios de DCC.



Fonte: o autor

O maior potencial de metano ( $411,64 \pm 7,19 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) foi verificado para (B4), com severidade de 4,2, enquanto o menor potencial ( $235,01 \pm 10,14 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) foi obtido para (B3), com severidade de 2,8. Observou-se para os demais ensaios produção de metano ( $P$ ) de  $250,04 \pm 9,93 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (B1);  $235,01 \pm 10,14 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (B3);  $302,33 \pm 3,85 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (B5);  $318,15 \pm 6,12 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (B6) e  $326,37 \pm 7,01 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (B7).

Tabela 5-9 Parâmetros cinéticos dos ensaios em batelada do DCC com diferentes condições de pré-tratamento do BM.

Ensaio	$P \text{ (mL.g}^{-1}\text{STV)}$	$R_m \text{ (mL.g}^{-1}\text{STV.h}^{-1})$	$\lambda \text{ (h)}$	$R^2$
B1	$250,05 \pm 9,93$	$0,890 \pm 0,06$	$77,11 \pm 7,59$	0,98
B2	$333,02 \pm 11,28$	$0,853 \pm 0,03$	$144,27 \pm 13,58$	0,97
B3	$235,01 \pm 10,14$	$0,833 \pm 0,14$	$70,98 \pm 14,31$	0,98
B4	$411,64 \pm 7,19$	$2,121 \pm 0,16$	$80,20 \pm 8,35$	0,98
B5	$302,33 \pm 3,85$	$1,866 \pm 0,08$	$56,62 \pm 3,77$	0,99
B6	$318,15 \pm 6,12$	$1,978 \pm 0,11$	$43,73 \pm 4,44$	0,99
B7	$326,37 \pm 7,01$	$2,022 \pm 0,146$	$52,56 \pm 5,74$	0,98

Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3:150 °C- 20 min; B4:210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7:180 °C- 15 min (III).

Em relação aos valores de  $P$  observados para (B1) e (B3), com severidades de 2,5 e 2,8, respectivamente, não se observou diferença estatística segundo o teste ANOVA com  $p >$

0,05 e verificação por teste Tukey. Por outro lado, conforme foi aumentada a severidade do pré-tratamento de 2,8 para 3,5, houve acréscimo de  $P$  em até 38,7%. Quando aplicada severidade de 4,2, verificou-se aumento de 75% de  $P$  em relação a severidade de 2,8 (B3). Por outro lado, as condições de (B2), com severidade de 4,5, não favoreceram acréscimo de  $P$ , para o qual foi verificado  $333,02 \pm 11,28 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , valor próximo àqueles obtidos para severidade de 3,5. Portanto, o intervalo ótimo do pré-tratamento hidrotérmico para o BM neste estudo foi de 3,5 - 4,2. Após teste de diferentes severidades para pré-tratamento da palha de trigo com recuperação de metano em reatores anaeróbios, Ferreira et al. (2014) relataram severidade ótima de 3,6. No entanto, essa foi a máxima severidade empregada pelos autores. Por outro lado, Soares et al. (2018) concluíram que a melhor severidade para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e produção de hidrogênio foi de 4,87.

O período para início da produção de metano ( $\lambda$ ) para os ensaios com menores severidades (B1) e (B3), foram  $77,11 \pm 7,59$  e  $70,98 \pm 14,31$  horas, respectivamente, valores superiores aos observados para (B5), (B6) e (B7), com  $56,62 \pm 3,77$ ;  $43,73 \pm 4,44$  e  $52,56 \pm 5,74$  horas, respectivamente. Provavelmente, as menores severidades do pré-tratamento implicou alterações mais brandas da estrutura do substrato lignocelulósico se comparado aos ensaios com severidade de 3,5, com menor solubilização de celulose e hemicelulose. Logo, a complexidade da estrutura do material manteve-se e acarretou maior tempo para acesso da microbiota aos açúcares fermentáveis. Nesse sentido,  $R_m$  foram inferiores para (B1) e (B3), com  $0,890 \pm 0,06$  e  $0,833 \pm 0,14 \text{ mL.gSTV.h}^{-1}$ , respectivamente.

Somado a isso, os desempenhos de  $P$  para (B1) e (B3) foram relativamente reduzidos, de  $264,05 \pm 9,93 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  para B1 e  $233,01 \pm 10,14 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  para B3. Em torno de  $150^\circ\text{C}$ , provavelmente ocorreu solubilização de reduzidas frações de hemicelulose. A temperatura é um parâmetro de grande relevância para a dissolução da hemicelulose já que baixas temperaturas não promovem impactos em sua solubilização (HENDRICKS E ZEEMAN, 2009; AHMAD et al, 2018). Nitsos et al. (2017) constataram a remoção de hemicelulose em madeira de faia (espécie arbórea *Fagus crenata*) a partir da condição de  $150^\circ\text{C}$  por 15 minutos do sistema hidrotérmico e foi completa em  $220^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, o que correspondeu a severidade de 4,69.

Em (B4) foi verificado  $\lambda$  de  $80,20 \pm 8,35$  horas, semelhante a (B1) e (B3). Apesar da provável maior liberação de açúcares decorrente da severidade mais elevada, em B4 é possível que maiores concentrações de compostos inibidores tenham sido gerados, os quais impactaram na adaptação da biomassa. Fenóis, furfural, 5-HMF são potenciais inibidores liberados pela degradação de pentoses, glicose ou hexose (HERNANDEZ E EDYVEAN,

2008; RASMUSSEM et.al., 2014) e podem ter afetado  $\lambda$  em B4. Neste trabalho, foi verificado que o BM pré-tratado a 210 °C por 10 minutos manteve o teor de lignina próximo ao BM *in natura*, enquanto houve significativa solubilização de hemicelulose e celulose. Portanto, para B4, provavelmente foram liberados concentrações elevadas de furfural e 5-HMF (gerados pela degradação da hemicelulose e celulose, respectivamente), bem como de fenóis em menor escala (liberados pela degradação de lignina). Apesar disso, provavelmente o consórcio microbiano se adaptou às condições e nos reatores (B4) foram verificadas Rm de  $2,121 \pm 0,16$  mLgSTV.h<sup>-1</sup>, maior rendimento entre os ensaios.

Na condição (B2), cuja severidade de pré-tratamento foi de 4,5, verificou-se prolongamento de  $\lambda$  ( $144,27 \pm 13,58$  horas), menor Rm ( $0,853 \pm 0,03$  mLgSV.h<sup>-1</sup>) aliado à redução de *P*, evidenciando que houve prejuízo à digestão anaeróbia. De modo semelhante, Wang et al. (2018) observaram que o aumento da severidade do pré-tratamento aplicado à palha de arroz de 3,5 para 4,6 acarretou redução de 32,6% da produção de metano com aumento de  $\lambda$  de 14,8 para 19,8 dias, o que foi atribuído ao elevado teor de inibidores gerados pela alta severidade. Rabelo (2018) também relatou a possibilidade de inibição de microrganismos quando empregou bagaço de cana-de - açúcar pré-tratado à temperatura de 200 °C por 10 minutos. Provavelmente, em B2 houve maior degradação de celulose e hemicelulose, convergindo esses polissacarídeos a inibidores em potencial. Logo, maior severidade do pré-tratamento não implicou em maior recuperação de metano para o BM.

Neste estudo, para o BM observou-se que temperatura de 150°C implicou nos menores teores de carboidratos solúveis (B1) e (B3), de  $56 \pm 1,41$  e  $61 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 5.9). Quanto aos demais ensaios, no início da operação dos reatores verificou-se concentrações de carboidratos totais de  $145 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> (B2);  $142 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> (B4);  $142,5 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup> (B5);  $127 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup> (B6) e  $120 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> (B7). A aplicação de severidades elevadas em B2 e B4 acarretou maior solubilização de carboidratos já no momento inicial da operação. De forma semelhante, Soares et al. (2018) relataram aumento das concentrações de açúcares (frutose, sacarose e xilose) no meio líquido a medida que o pré-tratamento do bagaço de cana-de - açúcar foi mais severo (com variação de 2,77 a 3,94). Segundo os autores, em função dessas frações de açúcares pode-se inferir sobre a degradação de hemicelulose e celulose. Para essa pesquisa, é provável que o aumento de carboidratos no meio seja resultado da degradação desses polissacarídeos.

Houve tendência de consumo de carboidratos totais em todos os ensaios em 48 horas, nos quais foram observados valores de  $18,5 \pm 0,70$  mg.L<sup>-1</sup> (B1);  $38,0 \pm 0,70$  mg.L<sup>-1</sup> (B2);  $13,5 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> (B3);  $23,0 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup> (B4);  $20,5 \pm 0,70$  mg.L<sup>-1</sup> (B5);  $18,5 \pm 2,87$  mg.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> (B6) e  $23,7 \pm 1,41 \text{ mg.L}^{-1}$  (B7). As concentrações finais para (B1), (B2), (B3), (B4), (B5), (B6) e (B7) foram de  $18,0 \pm 0,70$ ;  $48,9 \pm 1,41$ ;  $15,0 \pm 1,41$ ;  $14,0 \pm 1,41$ ;  $30,0 \pm 0,70$ ;  $20,0 \pm 1,41$  e  $24,0 \pm 0,70 \text{ mg.L}^{-1}$ , com remoção de carboidratos de 67,75; 66,90 ; 75,40; 90,45; 73,09; 84,25 e 80,0%. Desse modo, confirmou-se que grande parte dos carboidratos solubilizados foram convertidos a ácidos orgânicos, álcoois e cetonas, os quais são substratos para a acetogênese e influenciam diretamente no potencial metanogênico.

A remoção menos eficiente de carboidratos foi referente ao ensaio (B2), cujo pré-tratamento do BM foi o mais severo. Em função da variação temporal de carboidratos no meio comprovou-se que nessa condição ocorreu as maiores concentrações de monômeros até 240 horas de operação e, a partir de então houve consumo até concentração final de  $48,9 \pm 1,41 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 5.16). Logo, pode-se inferir que o ambiente foi adverso para alguns grupos de bactérias fermentativas, o que implicou menor taxa de consumo de açúcares constatada entre 96 e 240 horas de operação. No período posterior a 240 horas, provavelmente ocorreu adaptação da comunidade fermentativa, capaz de consumir os carboidratos disponíveis. É possível que a condição desfavorável seja resultado, entre outros fatores, do aumento de carga orgânica, ocasionado pela alta severidade, liberando monômeros e fenóis em maiores concentrações (Tabela 5-10), mas também outros compostos não analisados. O aumento da carga orgânica pode reduzir o contato de microrganismos ao substrato de modo a afetar a atividade fermentativa e, por consequência, a metanogênica (TIAN et al.,2015).

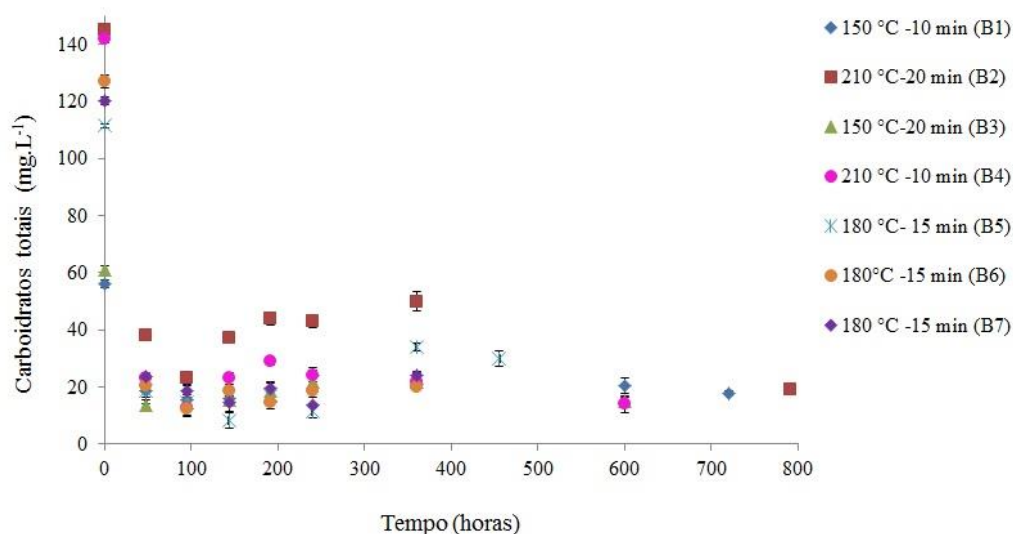
As concentrações de matéria orgânica solúvel na amostra inicial dos reatores foram de  $829 \pm 6,36 \text{ mg.L}^{-1}$  (B1);  $993 \pm 4,49 \text{ mg.L}^{-1}$  (B2);  $735 \pm 7,77$  (B3);  $1.063 \pm 8,48$  (B4);  $923 \pm 7,77$  (B5);  $715,5 \pm 4,94$  (B6);  $679,5 \pm 10,6$  (B7). Em 48 horas de operação foi verificada solubilização de compostos orgânicos, cujos valores foram de  $1.396 \pm 10,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (B1);  $1.987 \pm 14,14 \text{ mg.L}^{-1}$ (B2);  $794 \pm 7,07 \text{ mg.L}^{-1}$  (B3);  $3.900 \pm 21,21 \text{ mg.L}^{-1}$  (B4);  $2.692 \pm 10,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (B5);  $2.580 \pm 14,14 \text{ mg.L}^{-1}$  (B6);  $3.050 \pm 7,07 \text{ mg.L}^{-1}$  (B7).

Tabela 5-10 Parâmetros físico-químicos dos ensaios em batelada para o DCC em diferentes condições de pré-tratamento do BM.

Ensaio	DQO		Carboidratos		Fenóis		SST	
	Máxima concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Remoção (%)	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Redução (%)	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Final (mg.L <sup>-1</sup> )	Inicial (mg.L <sup>-1</sup> )	Final (mg.L <sup>-1</sup> )
B1	2.077 ± 7,77	82,65	56 ± 1,41	67,85	19,90	11,30	273,3	298,4
B2	4.024 ± 3,53	75,74	145 ± 1,41	66,90	42,55	46,97	415,0	425,9
B3	2.076 ± 4,24	78,32	61 ± 1,41	75,4	23,78	12,93	400	313,2
B4	3.900 ± 7,77	81,12	142 ± 1,41	90,45	36,51	37,90	378,0	430
B5	3.402 ± 7,80	81,55	111,5 ± 2,12	73,09	26,41	28,74	273,3	312,3
B6	2.580 ± 2,82	82,2	127 ± 2,12	84,25	24,23	26,72	373,3	397,8
B7	3.050 ± 2,82	83,6	120 ± 1,41	80,0	29,20	31,76	305,0	335,6

Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3:150 °C - 20 min; B4:210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min; B6: 180 °C- 15 min e B7:180 °C- 15 min.

Figura 5.16 Variação temporal de carboidratos totais nos ensaios do DCC.



Fonte: o autor.

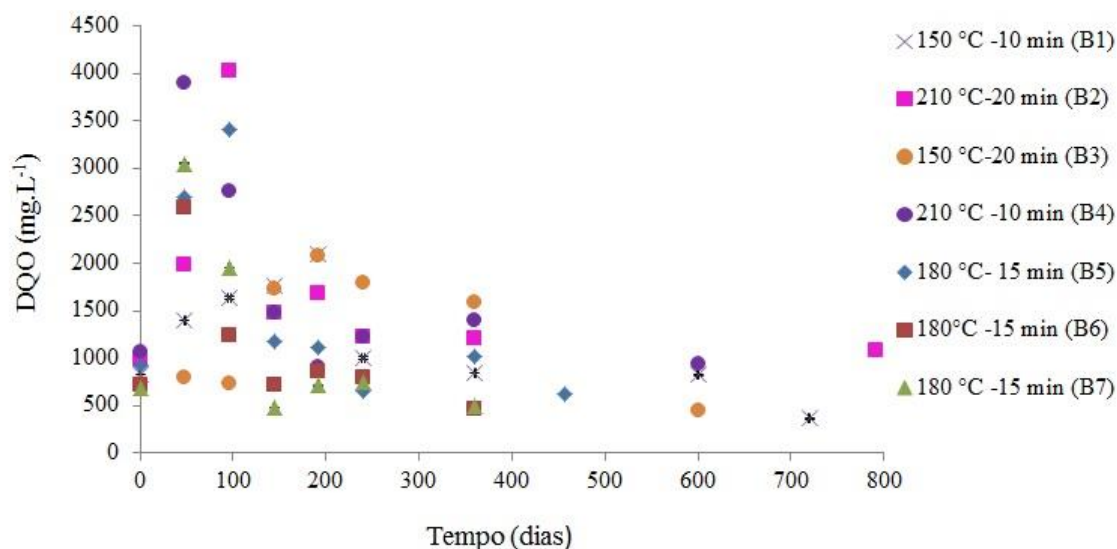
As máximas concentrações observadas em seus respectivos tempos de operação foram de (B1) 2.087 ± 17,67 mg.L<sup>-1</sup> em 144 horas; (B2) 4.024 ± 14,14 mg.L<sup>-1</sup> em 96 horas; (B3) 2.076 ± 10,6 mg.L<sup>-1</sup> em 144 horas; (B4) 3.900 ± 21,21 mg.L<sup>-1</sup> em 48 horas; (B5) 3.402 ± 21,21 em 48 horas.mg.L<sup>-1</sup>; (B6) 2.580 ± 17,67 mg.L<sup>-1</sup> em 48 horas e (B7) 3.050 ± 10,6 mg.L<sup>-1</sup> em 48 horas. Ressalta-se que as máximas concentrações de matéria orgânica foram verificadas para os ensaios com maiores severidades (B2 e B4). Wang et al. (2018) também correlacionaram o acréscimo da carga orgânica em períodos iniciais da operação de ensaios em batelada a medida houve aumento da severidade do pré-tratamento da palha de trigo o que se deve a subprodutos da digestão anaeróbia.

Em virtude das máximas concentrações estarem relacionadas ao início da fase exponencial de produção de metano para todos os ensaios, é possível inferir que a carga orgânica foi o aporte para a obtenção de metano sem a ocorrência de excesso que ocasionasse a falha dos reatores. Além disso, em (B1) e (B3) as máximas concentrações solubilizadas foram constatadas em período maior de operação (144 horas), um indicativo de que as etapas de hidrólise e fermentação foram mais laboriosas, supostamente, pela recalcitrância pouco alterada do BM. Em (B2), a máxima concentração de matéria orgânica foi observada em período superior ao de (B4), (B5), (B6) e (B7), e igual a 96 horas, o que pode estar associado com a maior quantidade de substrato disponível para bactérias fermentativas, as quais necessitaram de período maior para metabolização desse material.

As concentrações de matéria orgânica no encerramento da operação foram de:  $362,0 \pm 3,53 \text{ mg.L}^{-1}$  (B1),  $976 \pm 7,07 \text{ mg.L}^{-1}$  (B2),  $450,0 \pm 14,14 \text{ mg.L}^{-1}$  (B3),  $734 \pm 10,6 \text{ mg.L}^{-1}$  (B4),  $627,5 \pm 7,07 \text{ mg.L}^{-1}$  (B5),  $459 \pm 4,43 \text{ mg.L}^{-1}$  (B6),  $499 \pm 7,77 \text{ mg.L}^{-1}$  (B7). Em relação aos valores iniciais, verificou-se menor remoção de matéria orgânica, exceto em (B2), o qual foi constatado acréscimo (Figura 5.17). Portanto, foi calculada remoção a partir dos valores máximos verificados a fim de certificar a capacidade de assimilação do consórcio microbiano. Assim, obteve-se 82,65 % (B1); 75,74 % (B2); 78,32 % (B3); 81,12 % (B4); 81,55 % (B5); 82,2 % (B6) e 83,6 % (B7).

Apesar das remoções de 82,65% e 78,32 %, respectivamente, os ensaios (B1) e (B3), com BM pré-tratado a 150°C, foram menos eficientes em solubilizar matéria orgânica proveniente da degradação do BM e, portanto, por meio destes foram obtidos menor  $P$ , de  $250,05 \pm 9,93$  e  $235,01 \pm 10,14 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , respectivamente. Embora, em (B2) e (B4) tenha sido constatada remoção inferior de matéria orgânica, nessas condições foram verificadas maior solubilização para ambos, o que sugere melhor degradação da estrutura lignocelulósica do BM. A remoção menos eficaz de matéria orgânica em (B2), se comparada a (B4), está relacionada, entre outros fatores, a superiores concentrações de ácidos orgânicos detectadas na amostra final. Apesar disso, por meio atividade da comunidade de arqueias em (B2) resultou em produção de  $333,02 \pm 11,28 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ .

Figura 5.17 Variação temporal das concentrações de matéria orgânica solúvel para os ensaios do DCC.



Fonte: o autor.

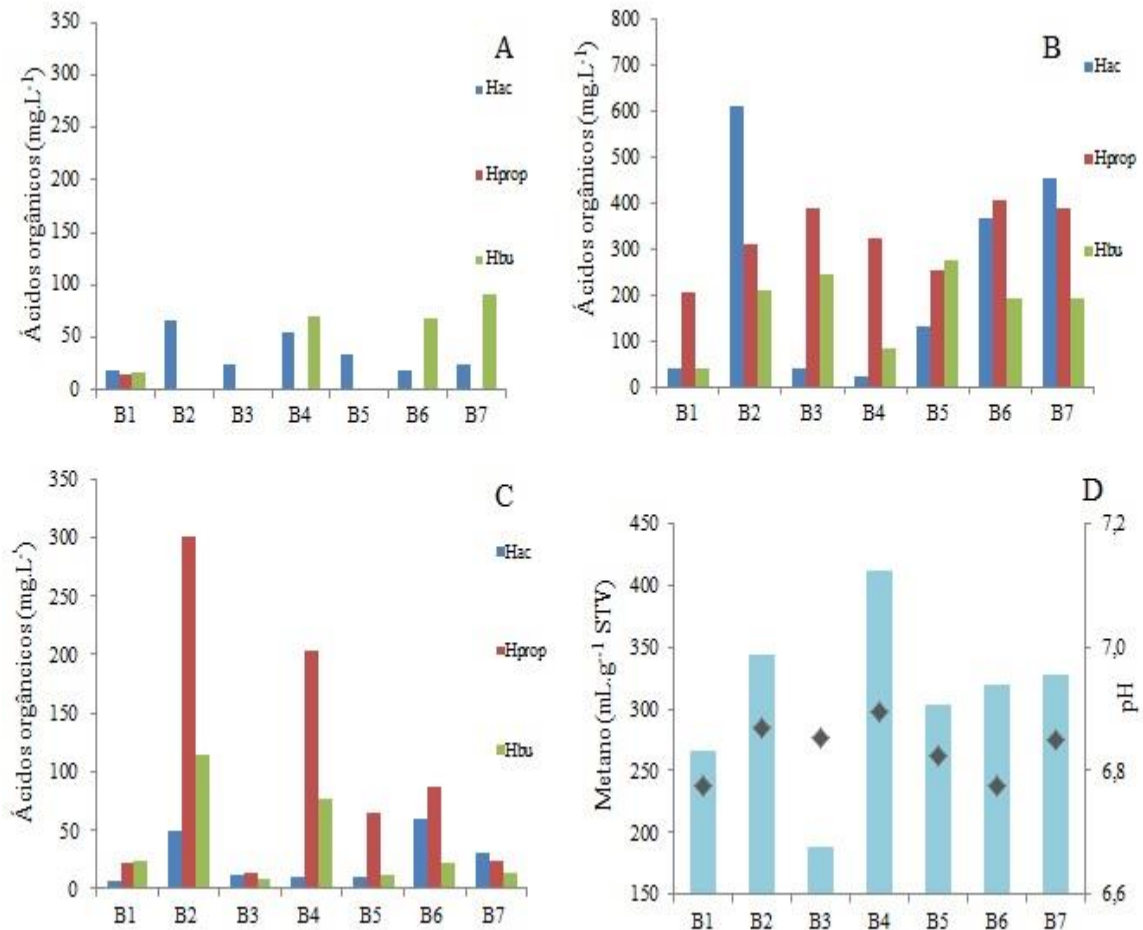
Em relação aos compostos fenólicos presentes no meio observou-se valores iniciais de 19,90 mg.L<sup>-1</sup> (B1); 42,57 mg.L<sup>-1</sup> (B2); 23,78 mg.L<sup>-1</sup> (B3); 36,51 mg.L<sup>-1</sup> (B4); 26,41 mg.L<sup>-1</sup> (B5), 24,23 mg.L<sup>-1</sup> (B6) e 135,56 mg.L<sup>-1</sup> (B7) e finais de 11,30 mg.L<sup>-1</sup> (B1); 46,97 mg.L<sup>-1</sup> (B2); 12,93 mg.L<sup>-1</sup> (B3); 67,90 mg.L<sup>-1</sup> (B4); 88,74 mg.L<sup>-1</sup> (B5), 75,72 mg.L<sup>-1</sup> (B6) e 61,66 mg.L<sup>-1</sup> (B7). A liberação de fenóis reitera a atividade hidrolítica e solubilização de lignina após o pré-tratamento da biomassa e, para esses ensaios, ocorreu acréscimo nas amostras iniciais conforme o pré-tratamento aplicado foi mais severo. O consumo de fenóis em (B1) e (B3) pode ser indicativo de atividade hidrolítica menos intensa durante o período operacional, influenciando nas etapas subsequentes da digestão anaeróbia e corroborando com menores *P* obtidos. Em contrapartida, nos demais ensaios, as concentrações de fenóis finais foram muito próximas às iniciais, pode-se inferir, portanto que concomitante a atividade hidrolítica do material durante os ensaios, ocorreu também a degradação de compostos fenólicos por meio da acetogênese e metanogênese (FANG et al., 2006).

Os ácidos acético, butírico e propiônico foram observados em concentrações mais expressivas no decorrer dos ensaios, ao passo que as concentrações dos ácidos valérico, isobutírico e isovalérico foram observadas abaixo do limite de detecção. As concentrações nas amostras iniciais eram de (B1) 18,72; 14,28 e 16,36 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente; (B2) 66,43 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético; (B3) 23,45 de ácido acético (B4) 53,88 e 69,78 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético e butírico, respectivamente; (B5) 34,56 mg.L<sup>-1</sup> de



ácido acético; (B6) 18,71 e 67,62 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético e butírico, respectivamente e (B7) 23,45 e 90,56 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético e butírico, respectivamente (Figura 5.18).

Figura 5.18 Variação das concentrações de ácido acético, propiônico e butírico nos ensaios do DCC.



Fonte: o autor.

Ácido acético foi observado em todas as amostras iniciais, sendo derivado de grupos acetil da hemicelulose e liberado, possivelmente, em virtude da sua decomposição no pré-tratamento hidrotérmico (PANAGIOTOPOULOS et al., 2011). De modo semelhante, Ahmad et al. (2018) observaram ácido acético no início da operação de reatores anaeróbios cujo substrato era bagaço de cana de açúcar pré-tratado em reator hidrotérmico, cujos valores foram de 57,2 - 145,6 mg.L<sup>-1</sup>. Nesse estudo, foi verificado 18,72 - 66,43 mg.L<sup>-1</sup>, com máximos valores correspondentes ao (B4) e (B5), de maior severidade no pré-tratamento do BM.

Em amostras coletadas na fase exponencial de produção de metano verificou-se concentrações de ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente, de (B1) 41,47; 209,08

e 43,21 mg.L<sup>-1</sup>; (B2) 613,58; 312,76 e 212,20 mg.L<sup>-1</sup>; (B3) 41,75; 389,76 e 247,04 mg.L<sup>-1</sup>; (B4) 22,80; 326,46 e 86,67, mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente; (B5) 134,89 ; 257,04 e 277,91 mg.L<sup>-1</sup>; (B6) 367,00; 406,60 e 195,87 mg.L<sup>-1</sup>; (B7) 456,35; 389,35 e 195,67 mg.L<sup>-1</sup>. Constatou-se produção de ácido acético em todas as condições, uma vez que este é um dos principais produtos da fermentação da biomassa celulósica, além de ser gerado pela degradação de fenóis (DESVVAUX, 2005; FANG et al., 2006) .

Ao término da operação foi observado ácido acético, propiônico e butírico, respectivamente de (B1) 6,53; 22,3 e 23,3 mg.L<sup>-1</sup>; (B2) 49,0; 300,85 e 114,63 mg.L<sup>-1</sup>; (B3) 12,34; 13,32 e 8,34 mg.L<sup>-1</sup>; (B4) 10,86; 202,40 e 76,68, mg.L<sup>-1</sup>; (B5) 10,48; 64,18 e 11,82 mg.L<sup>-1</sup>; (B6) 58,97; 87,45 e 22,34 mg.L<sup>-1</sup>; (B7) 30,76; 23,45 e 13,45 mg.L<sup>-1</sup>. Em relação ao pH, indicador direto da ocorrência excessiva de ácidos orgânicos no meio reacional, observou-se ligeira diminuição ao final de todos os ensaios, variando de (6,8-6,9).

Apesar das elevadas concentrações na etapa exponencial, sobretudo para (B2), (B6) e (B7), com 613,58; 367,00 e 456,35 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, verificou-se consumo de ácido acético em todos os reatores. A ocorrência de elevadas concentrações de ácido acético na fase exponencial, provavelmente ocorreu devido à taxa de crescimento relativamente reduzida das arqueias metanogênicas acetoclásticas diante das taxas de crescimento das bactérias formadoras de ácidos orgânicos. Portanto, o ambiente tornou-se susceptível ao acúmulo de ácidos (MOSEY, 1983). Contudo, a sobrecarga orgânica de ácido acético foi absorvida pelo sistema com conversão a ácido butírico, cuja liberação foi comprovada na fase exponencial dos ensaios. A eficiente utilização de ácido acético certificada para os reatores dessa etapa é indício do predomínio da comunidade de arqueias metanogênicas acetoclásticas em detrimento de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (AHMAD et al., 2018).

Observou-se na fase exponencial para todos os ensaios elevadas concentrações de ácido propiônico (209,08 - 406,60 mg.L<sup>-1</sup>) e provável consumo pelos microrganismos nas amostras finais (22,3 - 300,85 mg.L<sup>-1</sup>). Observou-se concentração mais elevadas de ácido propiônico em (B4) e (B2), no entanto, segundo a literatura, arqueias metanogênicas são inibidas a partir de 900 mg.L<sup>-1</sup> (WANG et al., 2009).

Diante da melhor produção de metano ( $411,64 \pm 7,19$  mL.g<sup>-1</sup>STV), remoção de DQO (81,12%) e carboidratos (90,45%), optou-se por prosseguir a pesquisa utilizando-se o BM pré-tratado em reator hidrotérmico a 210 °C por 10 minutos. Para tanto, foi realizado Delineamento Composto Central (DCCR) utilizando-se como variáveis a temperatura de incubação, concentração de BM pré-tratado nas condições citadas e volume da fração líquida resultante do pré-tratamento.

### 5.2.3.1 Caracterização microbiológica

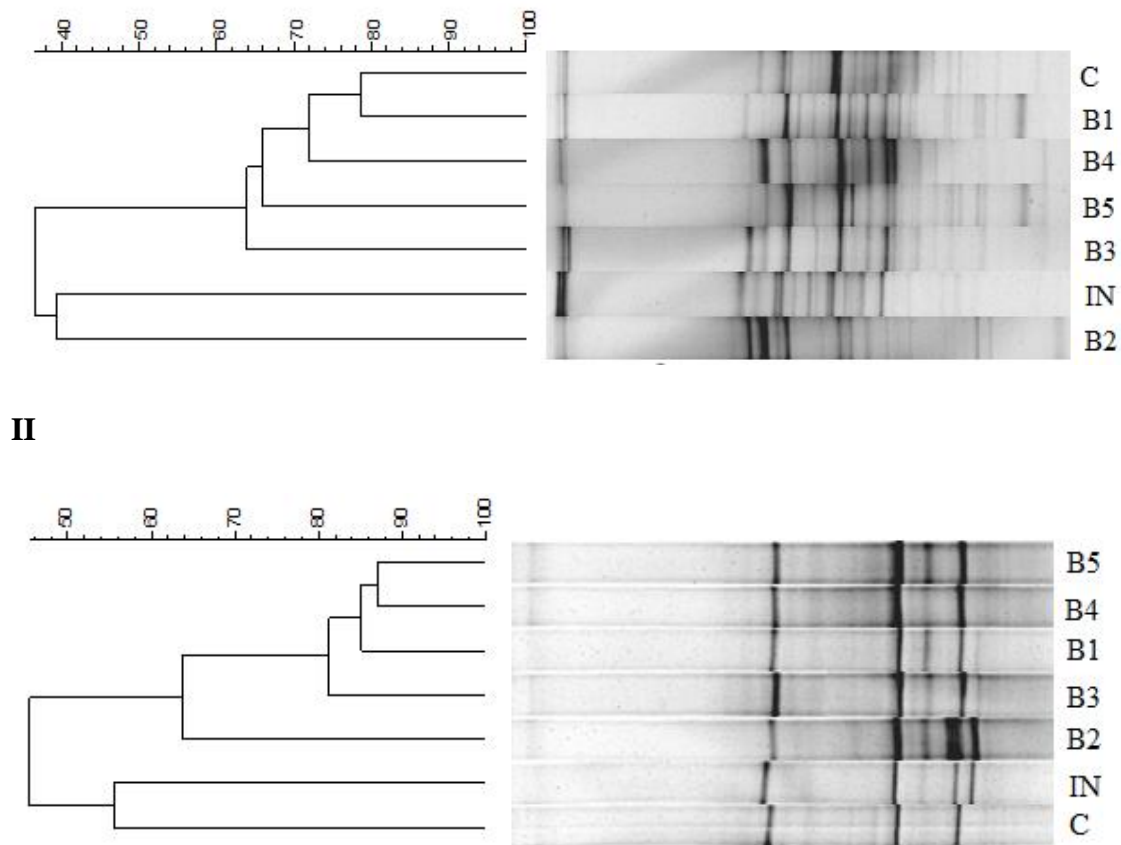
Por meio de PCR/DGGE foi realizada a comparação das populações de bactérias e arqueias metanogênicas dos reatores em batelada com BM *in natura* (IN), BM pré-tratado em sistema hidrotérmico a 150 °C por 10 minutos (B1), a 210 °C por 20 minutos (B2), a 150°C por 20 minutos (B3), a 210°C por 10 minutos (B4), a 180°C por 15 minutos (B5) e reatores em batelada controle, apenas com o inóculo (C) (Figura 5.19).

Em relação ao Domínio Bacteria, pode-se observar que quando o pré-tratamento foi aplicado à temperatura de 150 °C, o aumento do tempo de 10 minutos para 20 minutos alterou as populações, sendo observado 64% de similaridade entre as populações do ensaio B1 e B3. Considerando os ensaios à temperatura de 210 °C (B2 e B4), também quando houve aumento do tempo de pré-tratamento de 10 para 20 minutos verificou-se alteração das populações de modo mais acentuado. Sob tais condições a similaridade foi de 36% .

Em ensaios cujo BM foi pré-tratado a 150 °C constatou-se redução do número de populações de bactérias quando o tempo reacional variou de 10 para 20 minutos, haja vista os índices de diversidade (Shannon-Wiener) de B1 e B3, de 2,80 e 2,55, respectivamente. De forma semelhante, a temperatura de 210°C, quando o período de pré-tratamento foi de 10 para 20 minutos, também verificou-se redução da diversidade de bactérias de 2,70 (B4) para 2,55 (B2).

A dominância nesses ensaios foi de 0,074; 0,095; 0,098 e 0,080 para B1, B3, B2 e B4, respectivamente, e a riqueza relativa de 22; 18; 18 e 24, respectivamente (Tabela 5.18). Os efeitos da temperatura do pré-tratamento do BM na população de bactérias é reiterado quando comparadas as remoções de carboidratos de B1 (67,85 %) e B3 (75,4 %) e também de B2 (63,70 %) e B4 (90,45%). Assim, as eficiências no consumo de carboidratos foram mais discrepantes a 210°C, entre B2 e B4, do que em B1 e B3, a 150°C. O pré-tratamento do BM por 20 minutos, ou seja, em maior severidade, provavelmente promoveu maior solubilização de monômeros e outros derivados da degradação lignocelulósica, como ácido fórmico, levulínico, furfural, 5-HMF, bem como de compostos fenólicos, conforme verificado (Tabela 5-11 e Figura 5.20 e 5.21). Portanto, é provável que a maior severidade do pré-tratamento do BM tenha contribuído com a seleção de populações que se adaptaram a esses ambientes. Entretanto, evidenciou-se que no ensaio com maior severidade, quando o BM foi pré-tratado a 210°C por 20 minutos, houve predomínio de populações de bactérias que realizaram a conversão menos eficiente de carboidratos (63,70%).

Figura 5.19 Perfil de bandas do DGGE para os domínios Bacteria (I) e Archaea (II) para os ensaios do DCC.

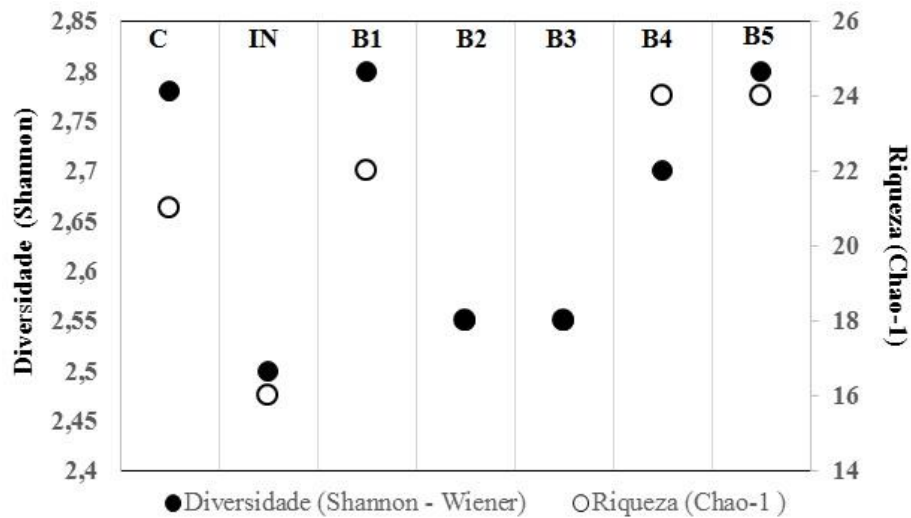


Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3: 150 °C- 10 min; B4: 210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7: 180 °C- 15 min (III).

Tabela 5-11 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Bacteria.

	C	IN	150°C - 10 min (B1)	210°C- 20 min (B2)	150°C - 20 min (B3)	210°C- 10 min (B4)	180°C- 15 min (B5)
Dominância	0,075	0,098	0,074	0,098	0,095	0,080	0,073
Shannon-Wiener	2,78	2,50	2,80	2,55	2,55	2,70	2,80
Chao-1	21	16	22	18	18	24	24

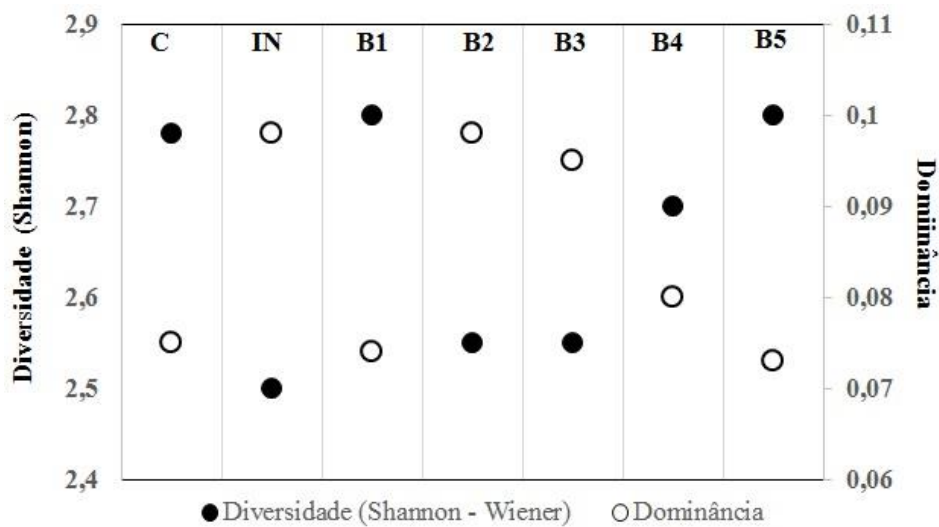
Figura 5.20 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para domínio Bacteria dos ensaios do DCC.



Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3: 150 °C- 10 min; B4: 210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7: 180 °C- 15 min (III).

Fonte: o autor.

Figura 5.21 Índices de Shannon -Wiener e Dominância para domínio Bacteria dos ensaios do DCC.



Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3: 150 °C- 10 min; B4: 210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7: 180 °C- 15 min (III).

Fonte: o autor.

Quanto ao Domínio Archaea verificou-se entre os ensaios com BM submetidos a 150 °C no sistema hidrotérmico (B1 e B3) similaridade de 81%, ao passo que para os ensaios com BM pré-tratado a 210 °C (B2 e B4), a similaridade foi de 64%. Sob tais condições, pode-se

inferir que a temperatura mais elevada do pré-tratamento promoveu alteração mais expressiva das populações de arqueias, em relação a 150°C.

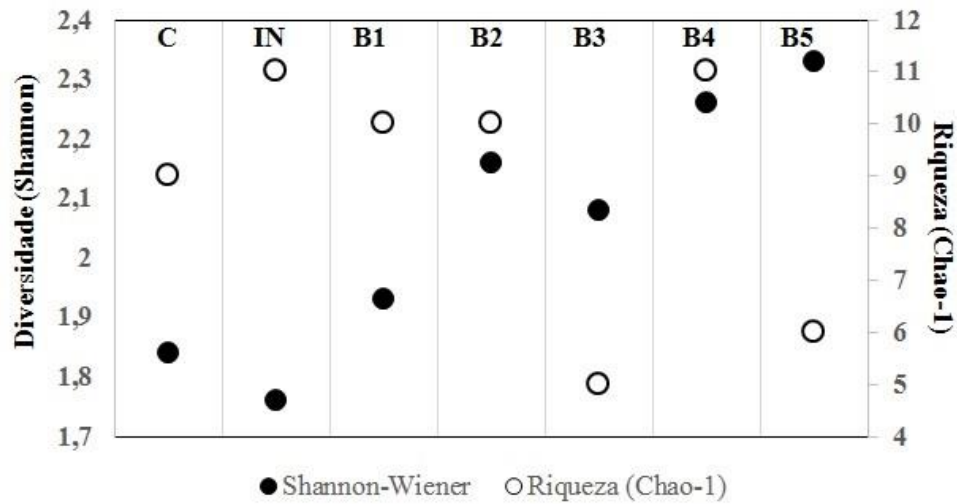
Os índices de diversidade para a comunidade de arqueias de (B1), (B2), (B3), (B4) e (B5) foi de 1,93; 2,16; 2,08; 2,26 e 2,33, respectivamente, com dominância de 0,176; 0,130; 0,166; 0,105; 0,116, respectivamente. Os maiores índices de diversidade foram observados para B4 (2,26) e B5 (2,33), condições com maior produção de metano, de  $411,64 \pm 7,19$  e  $326,37 \pm 7,01$  mL.g<sup>-1</sup>STV, respectivamente. Provavelmente, a elevada disponibilização de substratos para a metanogênese, comprovada pelas eficiências de remoção de carboidratos (Tabela 5.9) e produção de ácidos orgânicos (Figura 5.18) favoreceu a diversidade populacional de arqueias e a melhor produção de metano a partir do BM pré-tratado em severidades de 3,5 (B5) e 4,2 (B4) do sistema hidrotérmico.

Em (B2), apesar do BM ter sido submetido a severidade mais elevada 4,5, o índice de diversidade foi menor do que em (B4) e (B5), de 2,16. A menor diversidade da comunidade de arqueias pode estar relacionada à seleção de algumas populações ao meio com pH mais ácido devido a maior concentração final de ácidos orgânicos verificado (Tabela 5-12 e Figura 5.22 e 5.23). No entanto, a atividade metanogênica resultou em produção de  $335,02 \pm 11,28$  mL.g<sup>-1</sup>STV.

Tabela 5-12 Índices de diversidade, dominância e riqueza para o domínio Archaea.

	C	IN	150°C- 10 min (B1)	210°C- 20 min (B2)	150°C - 20 min (B3)	210°C-10 min (B4)	180°C- 15 min (B5)
Dominância	0,210	0,203	0,176	0,130	0,166	0,105	0,116
Shannon-Wiener	1,84	1,76	1,93	2,16	2,08	2,26	2,33
Chao-1	11	9	10	12	13	14	11

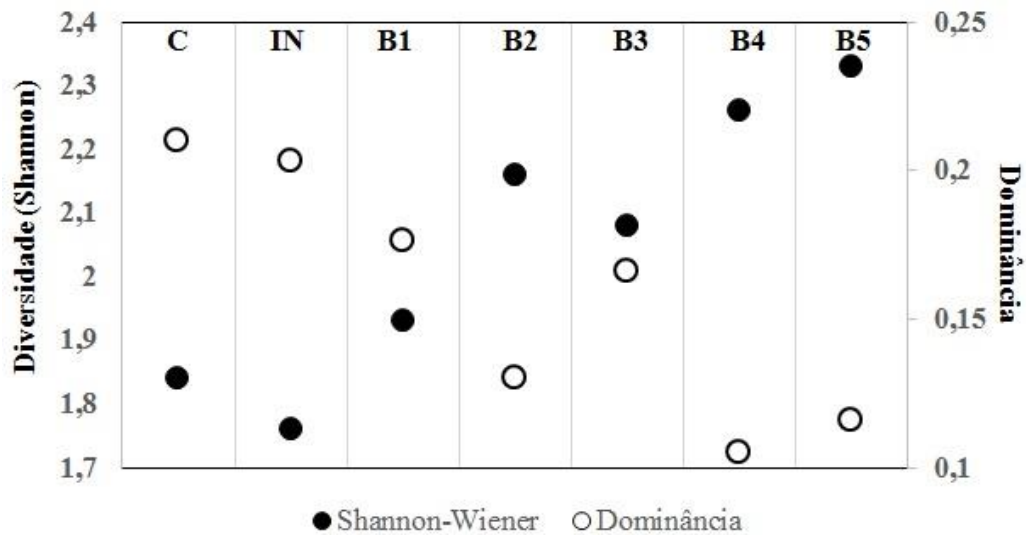
Figura 5.22 Índices de Shannon-Wiener e Chao-1 para domínio Archaea dos ensaios do DCC.



Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3: 150 °C- 10 min; B4: 210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7: 180 °C- 15 min (III).

Fonte: o autor.

Figura 5.23 Índices de Shannon-Wiener e Dominância para domínio Archaea dos ensaios do DCC.



Condições do pré-tratamento hidrotérmico para o BM -B1: 150 °C-10 min; B2: 210 °C - 20 min; B3: 150 °C- 10 min; B4: 210 °C -10 min; B5: 180 °C- 15 min (I); B6: 180 °C- 15 min (II) e B7: 180 °C- 15 min (III).

Fonte: o autor.

#### 5.2.4 Planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional para bagaço de malte em reator hidrotérmico

Constatou-se para a fração líquida (hidrolisado) resultante do pré-tratamento do BM em sistema hidrotérmico (210 °C por 10 minutos) pH 4,3 e  $17,56 \pm 1,41 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $4.240,0 \pm 16,97 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $767,0 \text{ mg} \pm 10,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de DQO, carboidratos totais e fenóis, respectivamente. Na amostra foi verificada  $93,0 \pm 14,14 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido acético.

Com o intuito de utilizar o hidrolisado, com potencial para digestão anaeróbia devido às altas concentrações de açúcares solubilizados, optou-se por diluir o volume para adição nos reatores. Logo, para valores do DCCR de -1,68; -1; 0 ; 1; 1,68 da variável  $x_3$  (volume de hidrolisado) foram utilizados, respectivamente, 0,61; 3,0; 6,5; 10 e 12,4 mL.

Nessa fase da pesquisa foram investigados os efeitos das variáveis ( $x_1$ ) temperatura de incubação, ( $x_2$ ) concentração de BM e ( $x_3$ ) volume de hidrolisado na digestão anaeróbia do BM pré-tratado em sistema hidrotérmico a 210 °C por 10 minutos. Para tanto, foi delineada a matriz do DCCR (Tabela 5-13).

A significância estatística do modelo foi determinada pelo teste de variância ANOVA (Tabela 5-14). O coeficiente de correlação calculado ( $R^2$ ) foi igual a 89,95%, indicando a variabilidade das respostas, considerando intervalo de confiança de 90%.

A equação polinomial de 2ª ordem (Equação 5) representa a produção de metano em função das variáveis significativas ( $p > 0,10$ ):

$$Y = 222,70 - 20,79 x_1 - 29,94 x_1^2 + 15,57 x_2 - 23,89 x_3 - 16,46 x_1 x_2 + 14,76 x_1 x_3 - 18,19 x_2 x_3 \quad (5)$$

Sendo:

Y= produção de metano ( $\text{mL.g}^{-1}$  STV);

$x_1$ = temperatura de incubação (°C);

$x_2$ = concentração de bagaço de malte ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$x_3$ = volume do hidrolisado (mL).



Tabela 5-13 Matriz do DCCR para as variáveis (x1) temperatura, (x2) concentração de BM e (x3) volume de hidrolisado.

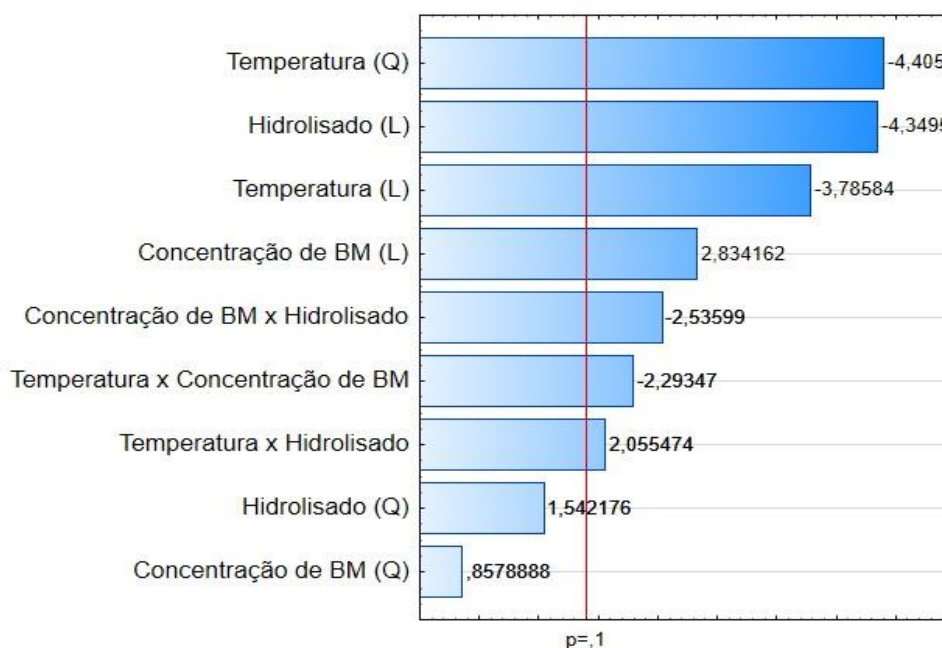
	Valores codificados			Valores reais			Valor Experimental de <i>P</i>	Valor predito <i>P</i>
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Temperatura (°C)	BM (g.L <sup>-1</sup> )	Hidrolisado (mL)	Metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)	Metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
C-1	-1	-1	-1	36	10	3	189,95	202,0
C-2	1	-1	-1	54	10	3	155,01	163,55
C-3	-1	1	-1	36	18	3	286,65	302,42
C-4	1	1	-1	54	18	3	182,93	198,41
C-5	-1	-1	1	36	10	10	165,91	161,01
C-6	1	-1	1	54	10	10	187,04	181,92
C-7	-1	1	1	36	18	10	186,89	188,74
C-8	1	1	1	54	18	10	145,15	145,75
C-9	-1,68	0	0	29,86	14	6,5	182,63	173,20
C-10	1,68	0	0	60,14	14	6,5	108,49	103,03
C-11	0	-1,68	0	45	7,27	6,5	203,17	196,52
C-12	0	1,68	0	45	20,73	6,5	267,90	248,88
C-13	0	0	-1,68	45	14	0,61	305,76	292,89
C-14	0	0	1,68	45	14	12,39	188,76	182,52
C-15	0	0	0	45	14	6,5	206,83	222,70
C-16	0	0	0	45	14	6,5	203,77	222,70
C-17	0	0	0	45	14	6,5	210,26	222,70

Por meio do diagrama de Pareto (Figura 5.24) ilustra-se os efeitos padronizados (t) em valor absoluto das variáveis (x<sub>1</sub>) temperatura de incubação, (x<sub>2</sub>) concentração de bagaço de malte e (x<sub>3</sub>) volume de hidrolisado, exibidos em ordem decrescente. Para (x<sub>1</sub>) temperatura, observou-se efeito significativo negativo (quadrático e linear). A variável (x<sub>2</sub>) concentração de BM teve efeito significativo positivo (linear) e a variável (x<sub>3</sub>) hidrolisado, efeito significativo negativo (linear). Para as interações entre os fatores (x<sub>1</sub>.x<sub>2</sub>, x<sub>2</sub>.x<sub>3</sub> e x<sub>1</sub>.x<sub>3</sub>) também observou-se efeitos significativo.

Tabela 5-14 ANOVA para o efeito da temperatura, concentração de BM e volume de hidrolisado.

Variável	SQ	GL	MQ	F-valor	P-valor	Fatores
Temperatura (L)	5903,84	1	5903,84	14,33705	0,006835	Significante
Temperatura (Q)	8013,53	1	8013,53	19,46027	0,003114	Significante
BM (L)	3308,05	1	3308,05	8,03337	0,025249	Significante
BM (Q)	301,74	1	301,74	0,73274	0,0420329	
Hidrolisado (L)	7794,01	1	7794,01	18,92719	0,003353	Significante
Hidrolisado (Q)	979,67	1	979,67	2,37905	0,166878	
Temperatura x BM	2166,47	1	2166,47	5,26110	0,055503	Significante
Temperatura x hidrolisado	1741,98	1	1741,98	4,23026	0,078741	Significante
BM x hidrolisado	2647,37	1	2647,37	6,42895	0,038917	Significante
Erro puro	21,2	7	411,780			
Total	39178,2	16				

Figura 5.24 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis (x1) temperatura, (x2) concentração de BM e (x3) hidrolisado.

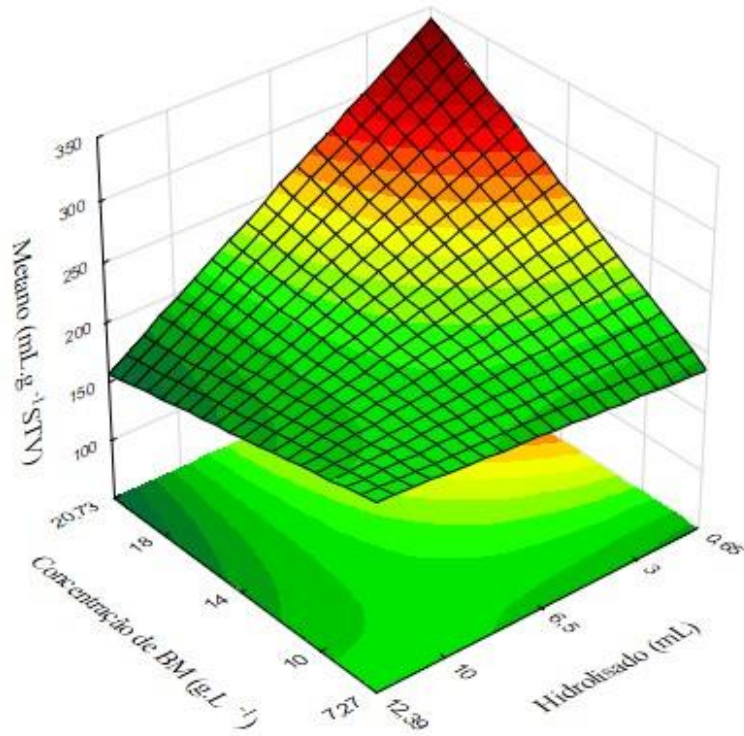


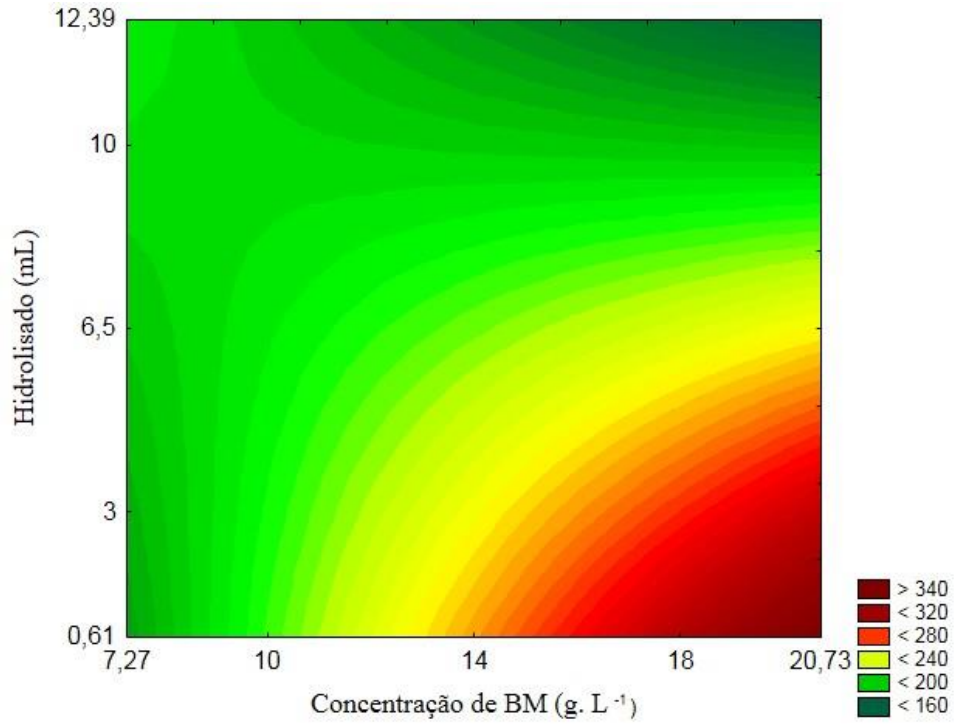
Fonte: o autor.

Observou-se que a temperatura de incubação (efeito quadrático negativo) representou a maior magnitude de impacto na produção de metano, seguida pelo volume de hidrolisado (efeito linear negativo), seguida pelo efeito linear da temperatura e concentração do BM (efeito linear).

A partir dos fatores significativos foram elaboradas as superfícies resposta e as curvas de contorno para a produção de metano ( $P$ ). Os pontos ótimos resultantes da interação entre o volume hidrolisado e temperatura (Figura 5.25), o volume de hidrolisado e concentração de BM (Figura 5.26), além da temperatura de incubação e concentração de BM (Figura 5.27).

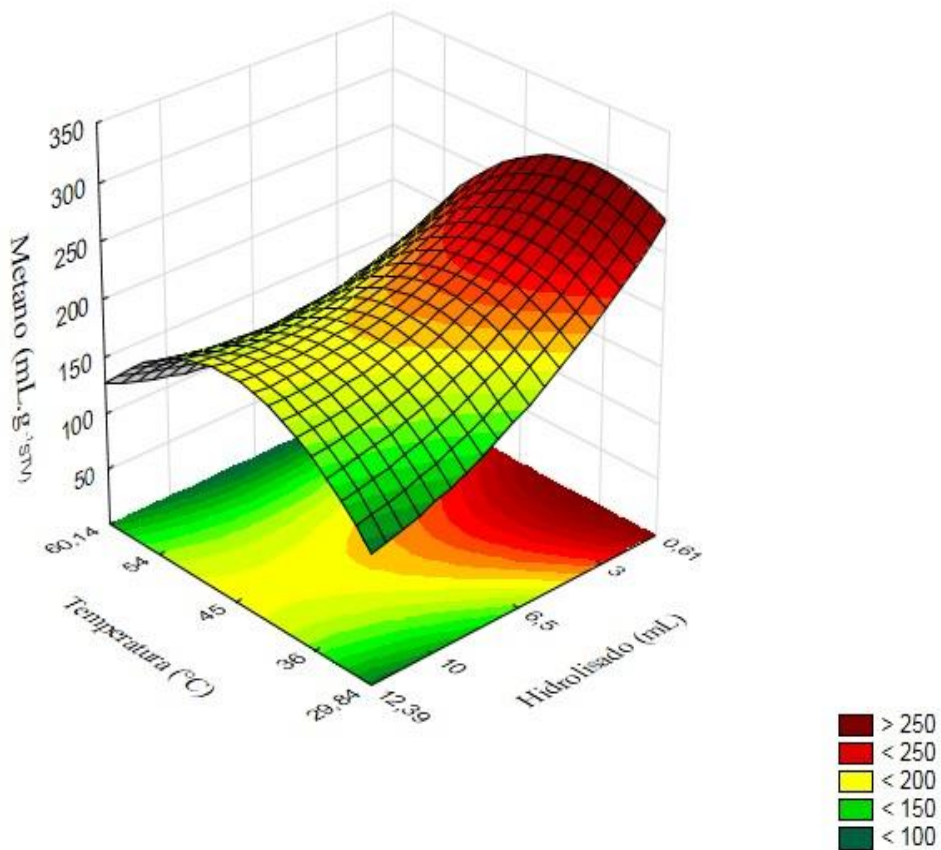
Figura 5.25 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis (x1) temperatura e (x2) volume de hidrolisado.

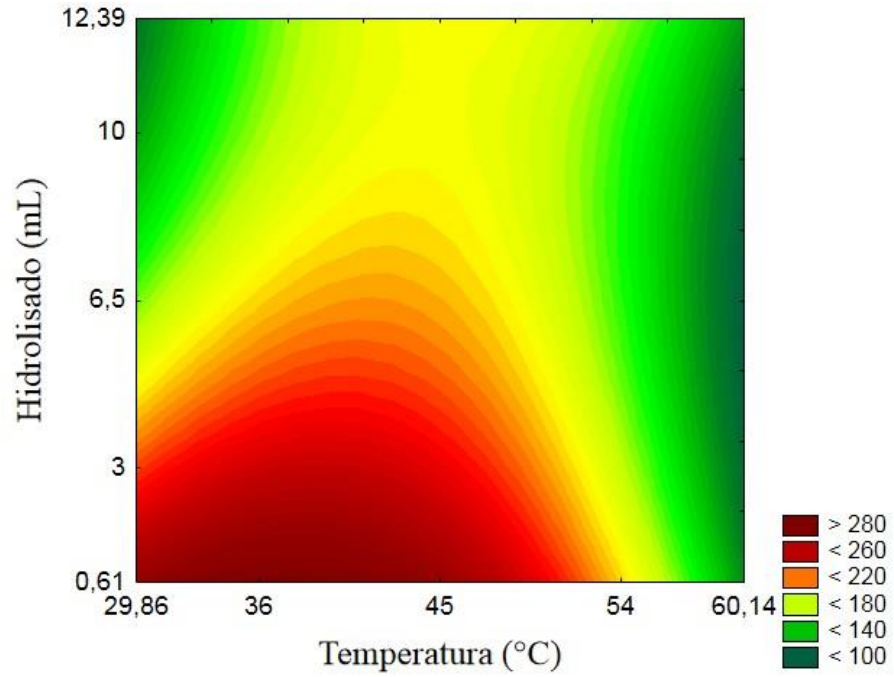




Fonte: o autor.

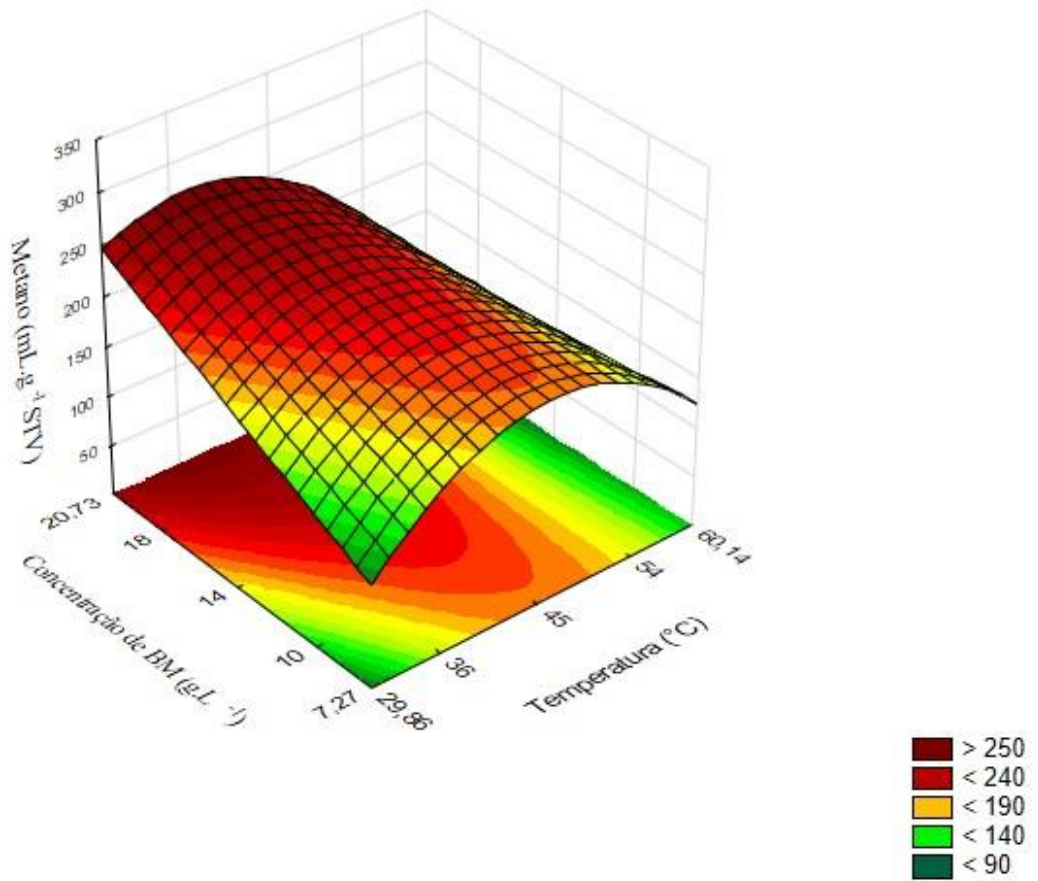
Figura 5.26 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis (x2) concentração de BM e (x3) volume de hidrolisado.

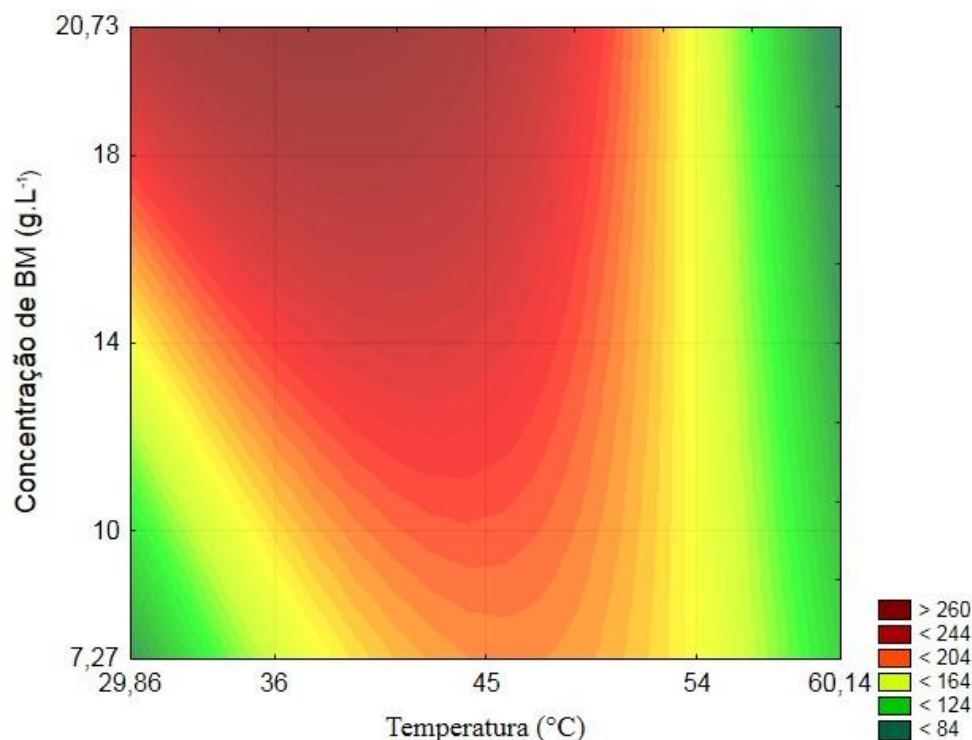




Fonte: o autor.

Figura 5.27 Superfície de resposta e curvas de contorno para variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM.





Fonte: o autor.

De acordo com o ajuste do modelo, a temperatura ótima de operação foi de 36°C com volumes reduzidos do hidrolisado (3,0 mL) e 18 g.L<sup>-1</sup> de BM. Nessas condições,  $P$  predito foi de 302,42 mL.g<sup>-1</sup>STV e  $P$  observado foi de 286,65 mL.g<sup>-1</sup>STV.

A concentração de substrato é uma variável que pode interferir no crescimento de bactérias celulolíticas e alterar, portanto, a taxa de solubilização de açúcares. A limitação do substrato tem efeito direto na eficiência da hidrólise em virtude de haver menor área superficial para aderência de bactérias e, por conseguinte, redução da conversão de polissacarídeos em monômeros. Em contrapartida, grande quantidade de substrato implica em maior acessibilidade pelas bactérias celulolíticas, o que favorece a hidrólise e pode disponibilizar excesso de açúcares solúveis no ambiente. Desse modo, é possível que aconteça inibição pelo excesso de produto ocasionando inibição de celulase, do crescimento microbiano e comprometendo a digestão anaeróbia (DESVAUX, 2005; LEVIN et al.,2009). Nessa etapa da pesquisa, a máxima concentração de BM (20,73 g.L<sup>-1</sup>) no ensaio (C-12) não implicou em inibição microbiana, indicando a tendência de maior produção de metano conforme o acréscimo da concentração do substrato. Em relação à interação entre temperatura e concentração de BM, conclui-se que o maior  $P$  foi obtido quando aliou-se maior concentração de BM a temperaturas entre 30 ± 1 e 45 ± 1 °C.

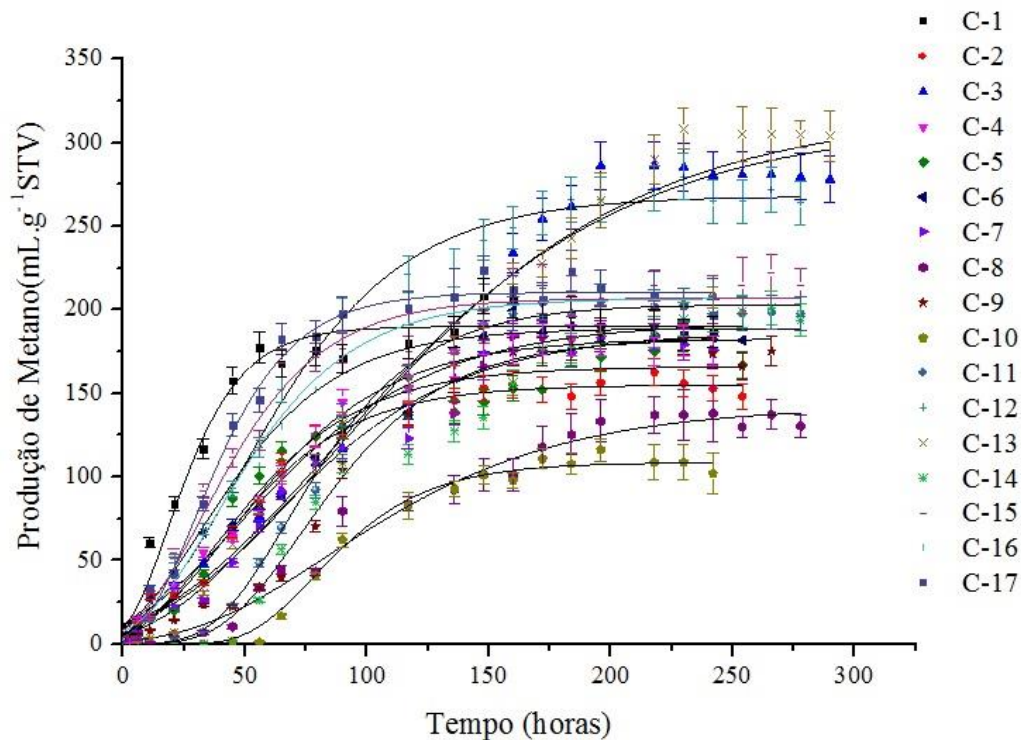
A partir do ajuste por meio do modelo Gompertz observou-se que a introdução do hidrolisado aos reatores em batelada proporcionou menor período para o início da produção de metano (variando de 1,70 a 51,78 horas) quando comparado aos ensaios sem o hidrolisado e com BM pré-tratado nas mesmas condições (80,20 horas). A presença de açúcares solúveis no hidrolisado pode ter contribuído com o crescimento microbiano e viabilizado a síntese de enzimas essenciais para reações complexas, tais quais, hidrólise e acidogênese e, em consequência, a detecção de metano em menor período de operação.

Os perfis temporais de produção de metano e parâmetros cinéticos estão delineados na Figura 5.28 e exibidos na Tabela 5-15. O período de operação dos reatores variou de 240 a 504 horas, de acordo com a estabilização da produção de metano.

Em relação a *P*, melhores resultados foram obtidos em (C-13); (C-3) e (C-12), com  $305,76 \pm 7,79$ ;  $286,65 \pm 3,47$  e  $267,90 \pm 3,18$  mL.g<sup>-1</sup>STV, respectivamente. Em C-13 e C-3, o período para início de detecção de metano ( $\lambda$ ) foi similar, de  $14,34 \pm 7,83$  e  $16,54 \pm 7,42$  horas, com rendimentos (Rm) de  $1,69 \pm 0,15$  e  $1,71 \pm 0,17$  mL.gSTV.h<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesses ensaios foram adicionados os menores volumes de hidrolisado, 0,61 e 3,0 mL, respectivamente, corroborando com o efeito negativo dessa variável em *P*. Em (C-12), operado a 45°C com adição de 20,73 g.L<sup>-1</sup> de BM e 6,5 mL de hidrolisado,  $\lambda$  foi de  $8,77 \pm 2,49$  horas e Rm de  $2,26 \pm 0,13$  mL.gSTV.h<sup>-1</sup>. Portanto, pode-se inferir que maiores concentrações de carboidratos disponíveis exigiu menor período para adaptação da comunidade de bactérias hidrolíticas e fermentativas.



Figura 5.28 Variação temporal da produção de metano a partir de ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.



Fonte: o autor.

O menor  $P$  ( $108,49 \pm 1,99 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) esteve relacionado a (C-10), no qual aplicou-se concentração de  $14 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $6,5 \text{ mL}$  de hidrolisado a  $60^\circ\text{C}$ , de modo a confirmar o efeito negativo da elevada temperatura associada sob o consórcio microbiano. Foi verificado o  $\lambda$  mais elevado dentre os ensaios, de  $51,78 \pm 2,89$  horas e  $R_m$   $1,50 \pm 0,13 \text{ mL.gSTV.h}^{-1}$ , evidenciando a laboriosa adaptação da microbiota.

Em (C-1), (C-4), (C-6), (C-7), (C-9) e (C-14), observou-se  $P$  aproximados, variando de  $182,63 \pm 3,54$  a  $189,95 \pm 3,24 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , com  $\lambda$  de  $1,21 \pm 4,58$  a  $48,82 \pm 3,58$  horas e  $R_m$  de  $1,51 \pm 0,12$  a  $4,14 \pm 0,43 \text{ mL.gSTVh}^{-1}$ . Para as condições do ensaio (C-14) obteve-se  $\lambda$  de  $48,82 \pm 3,58$  horas, superior aos demais, o que provavelmente decorreu da necessidade de adaptação microbiana aos compostos presentes no hidrolisado, já que nessa condição foi utilizado  $12,39 \text{ mL}$ . Na presença de compostos inibidores, como furfural e 5-HMF, a comunidade microbiana requer maior período de adaptação (MONLAU et al., 2014).

Valores muito semelhantes de  $P$  também foram verificados para (C-2), (C-5) e (C-8), com variação de  $155,01 \pm 2,19$  a  $165,91 \pm 4,03$ ,  $\lambda$  de  $6,23 \pm 4,54$  a  $22,52 \pm 5,21$  horas e  $R_m$  de  $0,834 \pm 0,05$  a  $1,86 \pm 0,20 \text{ mL.gSTVh}^{-1}$ . Os valores de  $P$  em (C-11), (C-15), (C-16) e (C-17) foram de  $203,17 \pm 1,85 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  a  $210,26 \pm 2,62 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , com  $\lambda$  de  $2,75 \pm 3,17$  a  $37,39 \pm 1,89$  e  $R_m$  de  $2,44 \pm 0,15$  a  $2,75 \pm 0,23 \text{ mLgSTVh}^{-1}$ . Em (C-11), provavelmente



ocorreu o prolongamento da adaptação microbiana ( $\lambda$  de  $37,39 \pm 1,89$  horas) devido a menor disponibilidade de substrato ( $7,23 \text{ g.L}^{-1}$ ) aliada a presença de compostos inibitórios no hidrolisado (6,5 mL). Apesar disso, após a adaptação da microbiota, foi verificado  $R_m$  de  $2,15 \pm 0,12 \text{ mL g STV h}^{-1}$ .

Tabela 5-15 Parâmetros cinéticos referentes às curvas de produção de metano para ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.

Ensaio	$P$ ( $\text{mL.g}^{-1} \text{ STV}$ )	$R_m$ ( $\text{mL.gSTV.h}^{-1}$ )	$\lambda$ (h)	$R^2$
C-1	$189,95 \pm 3,24$	$4,14 \pm 0,43$	$1,70 \pm 2,23$	0,97
C-2	$155,01 \pm 2,19$	$1,82 \pm 0,12$	$7,07 \pm 2,65$	0,99
C-3	$286,65 \pm 3,47$	$1,71 \pm 0,17$	$14,34 \pm 7,42$	0,98
C-4	$182,93 \pm 2,44$	$1,85 \pm 0,09$	$7,71 \pm 2,31$	0,99
C-5	$165,91 \pm 4,03$	$1,86 \pm 0,20$	$6,23 \pm 4,54$	0,99
C-6	$187,04 \pm 5,07$	$1,55 \pm 0,13$	$1,21 \pm 4,58$	0,97
C-7	$186,89 \pm 5,41$	$1,51 \pm 0,12$	$11,58 \pm 4,38$	0,98
C-8	$145,15 \pm 5,18$	$0,834 \pm 0,05$	$22,52 \pm 5,21$	0,98
C-9	$182,63 \pm 3,54$	$2,05 \pm 0,18$	$40,82 \pm 3,58$	0,98
C-10	$108,49 \pm 1,99$	$1,50 \pm 0,13$	$51,78 \pm 2,89$	0,99
C-11	$203,17 \pm 1,85$	$2,15 \pm 0,12$	$37,39 \pm 1,89$	0,99
C-12	$267,90 \pm 3,18$	$2,26 \pm 0,13$	$8,77 \pm 2,49$	0,99
C-13	$305,76 \pm 17,79$	$1,69 \pm 0,15$	$16,54 \pm 7,83$	0,99
C-14	$188,76 \pm 3,29$	$2,25 \pm 0,19$	$48,82 \pm 3,50$	0,97
C-15	$206,83 \pm 3,34$	$2,75 \pm 0,23$	$4,75 \pm 3,17$	0,98
C-16	$203,77 \pm 3,06$	$2,44 \pm 0,15$	$6,68 \pm 2,59$	0,99
C-17	$210,26 \pm 2,62$	$3,53 \pm 0,23$	$8,24 \pm 2,04$	0,99

Ahmad et al. (2018) relataram que em DCCR desenvolvido com o pré-tratamento químico somado ao hidrotérmico do bagaço de cana de açúcar, foram obtidos valores para  $\lambda$  de 37,32 - 86,60 horas. Os valores de  $\lambda$  para essa pesquisa foram bastante inferiores, variando de  $1,21 \pm 4,58$  a  $51,78 \pm 2,89$  horas em razão da utilização de hidrolisado como variável, o qual foi caracterizado com  $17,56 \pm 1,41 \text{ g.L}^{-1}$  de carboidratos totais.

Comparação deste estudo com a literatura não foi possível uma vez que quando a matéria - prima é diferente, resulta em composição de hidrolisado distinta após o pré-tratamento. Somado a isso, a cada severidade de pré-tratamento é gerado hidrolisado com características discrepantes. Por exemplo, Fernandez- Cegri et al. (2012) estudaram o pré-

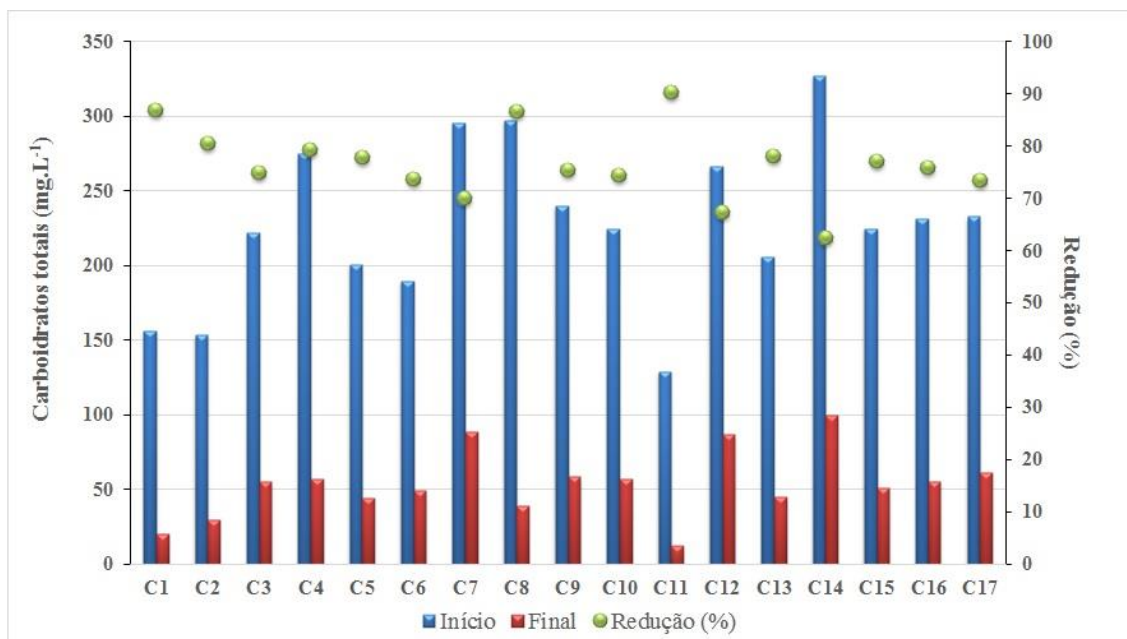
tratamento do bagaço de cana de açúcar e relataram maior produção de metano a partir do hidrolisado ( $310 \pm 4 \text{ mL.g}^{-1}\text{DQO}$ ) do que da fração sólida ( $105 \pm 7 \text{ mL.g}^{-1}\text{DQO}$ ). No entanto, com o aumento da severidade de pré-tratamento houve declínio da produção a partir do hidrolisado e também da fração sólida. Ressalta-se que devem ser consideradas as interações entre as três variáveis para a produção de metano na discussão de dados e não analisá-las individualmente.

Em todos os ensaios foi confirmado (BM) consumo de carboidratos totais solúveis (Figura 5.31). Para os ensaios com maior atividade metanogênica, (C-13), (C-3) e (C-12), as concentrações iniciais de carboidratos eram de  $206 \pm 2,80$ ;  $222 \pm 2,12$ ;  $267 \pm 7,07 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente, com eficiência de redução de 78,2, 75 e 67,4 % 75% e concentrações finais de  $45,5 \pm 1,4$ ;  $75 \pm 2,1$ ;  $87 \pm 2,1 \text{ mg.L}^{-1}$ . Logo, a menor redução de carboidratos foi associada aos ensaios com maior volume de hidrolisado, bem como  $\lambda$  superior com relação a (C-13) e (C-2). Infere-se que houve alteração na estrutura das comunidades de bactérias, de modo a afetar a atividade fermentativa, prolongando o período de adaptação microbiano. A concentração de carboidratos totais em (C-10), com atividade metanogênica inferior aos demais ensaios, foi de  $224,5 \pm 3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , no qual foi constatada redução de 74,4%, com  $57,5 \pm 4,2 \text{ mg.L}^{-1}$  ao final da operação. Nesse ensaio destacou-se a elevada temperatura de incubação ( $60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), sugerindo que essa variável não impactou diretamente a comunidade de bactérias de modo severo, diante da eficiência de consumo de carboidratos similar a (C-13) e (C-3).

Nas condições dos ensaios (C-1), (C-4), (C-6), (C-7), (C-9) e (C-14), cujos  $P$  variou de  $182,63 \pm 3,54$  a  $189,95 \pm 3,24 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , obtive-se concentrações iniciais de  $156,5 \pm 4,2$ ;  $275,3 \pm 1,4$ ;  $190,6 \pm 2,1$ ;  $296,6 \pm 3,5$ ;  $240,5 \pm 3,5$  e  $327,5 \pm 5,7 \text{ mg.L}^{-1}$  de carboidratos e eficiências de redução de (62,5 - 86,9%). A conversão menos favorecida foi em (C-14), cujo volume de hidrolisado foi superior, de 12,39 mL, corroborando com os efeitos negativos causados na atividade fermentativa por compostos presentes no líquido.

Em (C-2), (C-5) e (C-8), com  $P$  de  $155,01 \pm 2,19$  a  $165,91 \pm 4,03$  e concentrações iniciais de carboidratos de  $153,5 \pm 5,7$ ;  $201,4 \pm 2,8$  e  $297,3 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , verificou-se consumo de carboidratos de 77,9 - 86,7%. Para (C-11), (C-15), (C-16) e (C-17) com  $P$  de  $203,17 \pm 1,85 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  a  $210,26 \pm 2,62 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , para concentração inicial de  $129,5 \pm 3,5$ ;  $225,2 \pm 4,2$ ;  $231,5 \pm 2,1$  e  $233,1 \pm 2,8 \text{ mg.L}^{-1}$ , obtendo-se redução de 73,4–90,3% (Figura 5.29). Diante disso, as interações entre as três variáveis condicionaram à eficiências de redução de carboidratos superior a 62,5%.

Figura 5.29 Eficiência de consumo de carboidratos totais para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.



Fonte: o autor.

Observou-se solubilização de matéria orgânica no decorrer do período experimental com máximas concentrações verificadas na fase exponencial de produção de metano, conforme exposto na Figura 5.28. A comparação entre os valores máximos e finais teve o intuito de analisar a capacidade de metabolização do consórcio microbiano submetidos às condições do DCCR.

Em (C-13), (C-3) e (C-12), grupo de ensaios com melhores resultados em *P*, as máximas de matéria orgânica solúvel foram de  $2.595 \pm 26,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $5.526 \pm 21,92$  e  $6.241,5 \pm 29,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , havendo remoção de 85,54%; 76,57% e 78,08%, respectivamente. Pode-se inferir que em (C-13) as comunidades de bactérias e arqueias metanogênicas atuaram em melhor sinergia, uma vez que a remoção de 85,54% sugere menor acúmulo de subprodutos da anaerobiose. Em C-10 foi verificada remoção de apenas 19,2% de matéria orgânica a partir de  $5.979 \text{ mg.L}^{-1}$ , o que comprova que a comunidade de arqueias não se adaptou a elevadas temperaturas ( $60^{\circ}\text{C}$ ), entre outros fatores. É provável que a taxa de crescimento dessas populações tenha se reduzido implicando em excesso de metabólitos no meio reacional, diminuição de pH e inibição da atividade metanogênica.

Nos ensaios (C-2), (C-5) e (C-8), foram verificados consumos de 46,5%; 78,86% e 62,9% a partir de máximas de  $2.673 \pm 17,7$ ;  $4.329 \pm 21,2$  e  $6.006 \pm 20,6 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em (C-2), apesar do volume de hidrolisado aplicado estar dentro da faixa considerada ótima (3 mL),

verificou-se que a temperatura de operação (54 °C) foi superior ao intervalo considerado ótimo enquanto a concentração de BM (10 g.L<sup>-1</sup>) foi inferior. Portanto, ambas as variáveis, nessa condição, exerceram impacto negativo na conversão de metabólitos a metano.

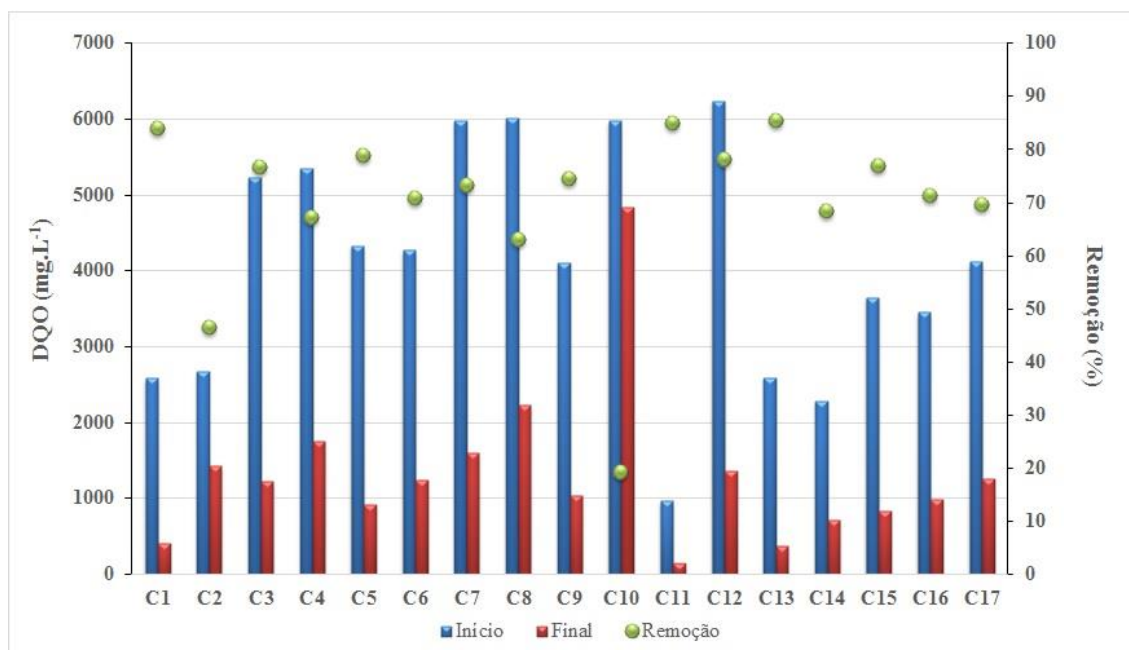
Em (C-1), (C-4), (C-6), (C-7), (C-9) e (C-14), as máximas de matéria orgânica solúvel variou de 2.585 ± 26,57 a 5.973 ± 21,2 mg.L<sup>-1</sup>, obtendo-se remoção de 83,95%; 67,94%; 70,95%; 73,21%; 74,5% e 68,4%. O ensaio (C-14) foi operado na faixa ótima de temperatura (45°C) e com concentração de substrato ideal (14 g.L<sup>-1</sup>). É provável que o volume de hidrolisado de 12,39 mL, muito superior ao valor considerado ótimo, tenha impactado no consumo de carboidratos (62,5%) e, por consequência, a disponibilidade de substrato para a metanogênese.

Quanto ao grupo de ensaios com *P* entre 203,17 ± 1,8 e 206,83 ± 3,34 mL.g<sup>-1</sup>STV, correspondente aos ensaios (C-11), (C-15), (C-16) e (C-17), foram observadas concentrações máximas de compostos orgânicos de 966 ± 17,7 a 4.122 ± 21,2 mg.L<sup>-1</sup> e eficiências de remoção de 84,99%; 76,9%; 71,26 e 69,61%.

Concentrações de ácido acético foram verificadas nas amostras iniciais de todos os ensaios, de 61,5 a 316,71 mg.L<sup>-1</sup>, dependendo das condições (Figura 5.30). O rompimento da estrutura lignocelulósica pelo sistema hidrotérmico contribuiu com o teor de ácido acético nas amostras iniciais, haja vista que o ácido é produto da degradação da hemicelulose e lignina. Além disso, foi constatado que no hidrolisado resultante de pré-tratamento do BM 210°C por 10 minutos havia 93,0 ± 14,14 mg.L<sup>-1</sup> de ácido acético. Nesse sentido, os ensaios com maior concentração de ácido acético na amostra inicial foi o (C-7), operado com 18 g.L<sup>-1</sup> de BM e 10 mL de hidrolisado e o (C-14) com 14 g.L<sup>-1</sup> de BM e 12,39 mL, nos quais foi constatado 279 mg.L<sup>-1</sup> e 301 mg.L<sup>-1</sup>.

Nas amostras iniciais também foram observadas concentrações reduzidas de ácido butírico (5,3 - 56,4 mg.L<sup>-1</sup>), propiônico (4,5 - 45,8 mg.L<sup>-1</sup>), valérico (6,5- 22,0 mg.L<sup>-1</sup>) e isovalérico (10,0 -26,7 mg.L<sup>-1</sup>), isobutírico (11,3- 21,8 mg.L<sup>-1</sup>) que podem ser provenientes da fonte de inóculo.

Figura 5.30 Concentração máxima e final de matéria orgânica para cada ensaio do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.

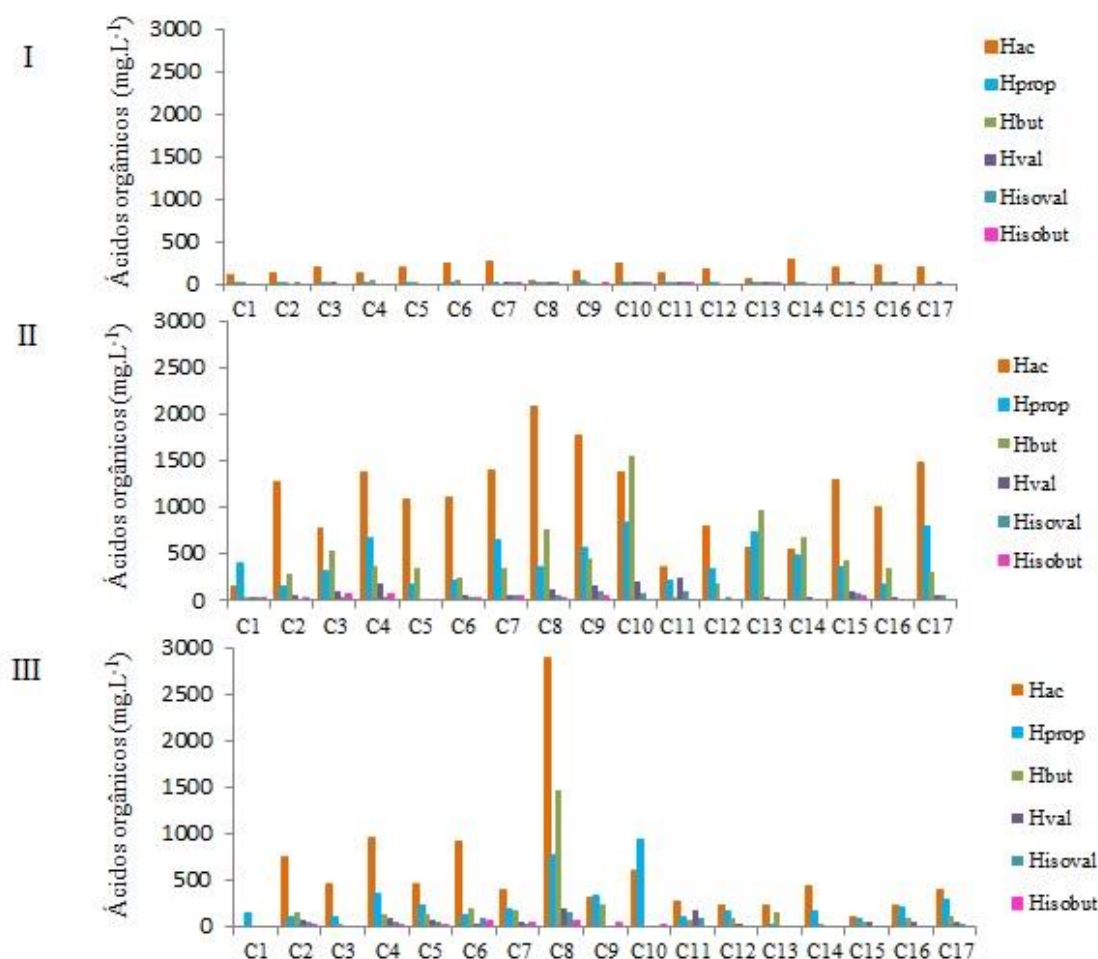


Fonte: o autor.

Dentre os ácidos analisados verificou-se que para os ensaios (C-8) e (C-10) maior concentração de ácidos orgânicos totais, de 3.406,95 mg.L<sup>-1</sup> e 4.068,57 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, para *P* de (145,15 ± 5,18 e 108,49 ± 1,99 mL.g<sup>-1</sup> STV, respectivamente). As menores concentrações foram associadas a (C-1) e (C-12), com 705,4 mg.L<sup>-1</sup> e 1.375 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na fase exponencial de produção de metano (Figura 5.31) observou-se expressivas concentrações de ácido propiônico (165,4 – 847,3 mg.L<sup>-1</sup>), butírico (175,8 – 966,62 mg.L<sup>-1</sup>), valérico (43,0 – 255,8 mg.L<sup>-1</sup>), isovalérico (12,3– 105,4 mg.L<sup>-1</sup>), isobutírico (13,2 – 53,3 mg.L<sup>-1</sup>) e, sobretudo, de ácido acético (158,2– 2.075,3 mg.L<sup>-1</sup>). Elevadas concentrações de ácido acético é indício da redução da atividade de arqueias metanogênicas acetoclásticas, as quais deveriam atuar em conjunto com as bactérias acidogênicas para controle do pH da fermentação e do teor de ácido acético no meio.

Figura 5.31 Ácidos orgânicos na amostra inicial (I), intermediária (II) e final (III) dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.



Hac= ácido acético; Hprop= ácido propiônico; Hbut= ácido butírico; Hval= ácido valérico; Hisoval= ácido isovalérico; Hisobut= ácido isobutírico.  
Fonte: o autor.

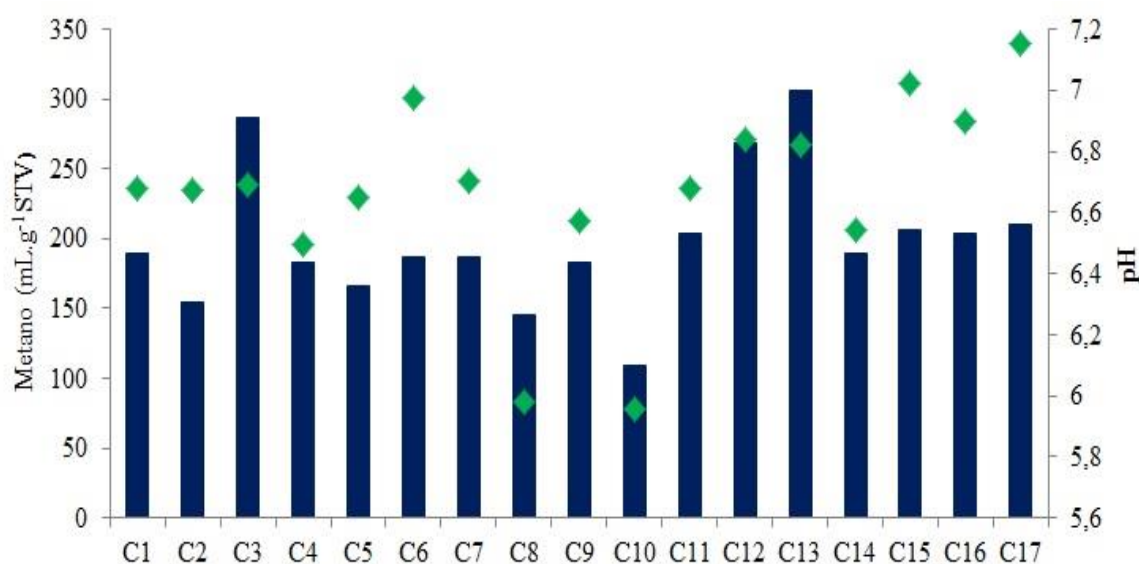
A maior concentração de ácido propiônico ( $836,15 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em fase intermediária foi verificada para (C-10), ensaio com menor produção de metano ( $108,49 \pm 1,99 \text{ mL.g}^{-1} \text{ STV}$ ). O acúmulo desse ácido sinaliza distúrbio do reator, uma vez que a sobrecarga é consequência da elevada pressão parcial de hidrogênio que, por sua vez, implica em condição desfavorável para a acetogênese (MOSEY, 1983). A concentração é considerada tóxica ao processo entre  $1\text{-}2 \text{ g.L}^{-1}$  segundo Wijekoon et al. (2001) e, para Wang et al.(2009), a partir de  $900 \text{ mg.L}^{-1}$ . Nesse sentido, ao término dos ensaios (Figura 5.31), verificou-se que para (C-10) houve acréscimo de ácido propiônico ( $947,45 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e diminuição da concentração de ácido acético ( $599,18 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O pH final do ensaio foi de 5,9.

Ao final dos ensaios observou-se diminuição da concentração total de ácidos orgânicos de  $336$  a  $5.614 \text{ mg.L}^{-1}$ , sendo que o maior valor correspondeu ao ensaio (C-8). Esse ensaio foi o único no qual foi constatado aumento de ácido acético no final, com  $2.909,82$

mg.L<sup>-1</sup>. Essa sobrecarga provavelmente se deveu a inibição da atividade metanogênica acetoclástica em função da condição com elevada temperatura (54°C) e volume de hidrolisado (10 mL).

Observou-se pH final dos ensaio de  $5,7 \pm 0,07$  a  $7,15 \pm 0,07$ , dependendo da condição. Os menores valores foram relacionados a (C-8), (C-10), com  $5,7 \pm 0,07$  e  $5,9 \pm 0,10$ , respectivamente, para os quais foi comprovado elevadas concentrações finais de ácidos orgânicos o que certamente influenciou em menor recuperação de metano. A operação dos ensaios (C-3), (C-12) e (C-13), com maiores valores de *P* observados, encerrou-se com pH de  $6,7 \pm 0,07$ ;  $6,8 \pm 0,10$  e  $6,8 \pm 0,10$ , respectivamente (Figura 5.32).

Figura 5.32 Produção máxima de metano associada ao pH final dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em reator hidrotérmico.



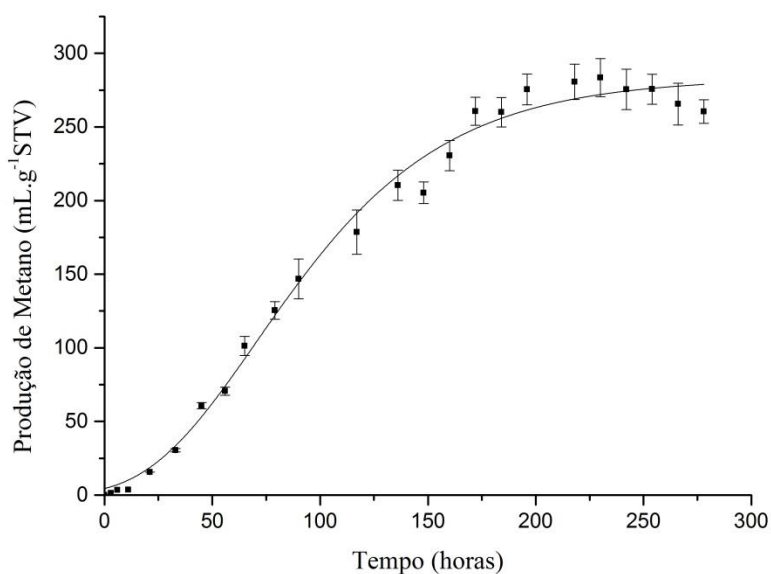
Fonte: o autor.

Portanto, com exceção de (C-8) e (C-10), as condições dos demais ensaios favoreceram a assimilação da carga de ácidos orgânicos e conversão a metano pelo consórcio microbiano. Nas condições mais favoráveis a metanogênese, em (C-3), foi verificada concentração total de ácidos orgânicos na fase intermediária de 1.856 mg.L<sup>-1</sup> e concentração final de 617 mg.L<sup>-1</sup> e, em (C-13), a concentração total de ácidos na fase intermediária foi de 2.327,84 mg.L<sup>-1</sup> e a final de 433,39 mg.L<sup>-1</sup>, evidenciando a eficiente utilização de metabólitos gerados nas etapas anteriores à metanogênese.

#### 5.2.4.1 Validação do modelo de produção de metano

A validação do modelo foi realizada com o objetivo de atestar a resposta predita na forma de produção máxima de metano para a condição ótima. Para tanto, foram reproduzidas triplicatas de reatores operados a 36°C, com 18 g.L<sup>-1</sup> de bagaço de malte e 3 mL de hidrolisado. Obteve-se 279,24 ± 5,58 mL.g<sup>-1</sup>STV de produção máxima de metano, R<sub>m</sub> de 1,91 ± 0,10 mL.g<sup>-1</sup>STV, λ de 18,62 ± 3,93 horas e R<sup>2</sup> de 0,99. Portanto, houve 92,33% de precisão em relação ao predito em (C-3), com 302,42 mL.g<sup>-1</sup>STV. Assim, o ajuste do modelo foi considerado eficiente (Figura 5.33).

Figura 5.33 Variação temporal da produção de metano para o ensaio de validação do DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.



Fonte: o autor.

#### 5.2.5 Delineamento Composto Central Rotacional para o bagaço de malte em autoclave

Nessa etapa da pesquisa, foi realizado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com o objetivo de verificar os efeitos das variáveis ( $x_1$ ) temperatura de incubação e ( $x_2$ ) concentração do BM pré-tratado em autoclave a 121°C e 1 atm por 30 minutos e pressão. Cada variável independente foi estudada em cinco níveis codificados (-1,42; -1; 0; 1; 1,42).



Foram considerados significativos os fatores com nível de significância acima de 90%. Na matriz do DCCR estão os valores codificados e os valores reais (ajustados ao modelo Gompertz) para as variáveis analisadas e as respostas obtidas, bem como os valores preditos pelo modelo (Tabela 5-16).

Tabela 5-16 Matriz do DCCR para as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Valor experimental	Valor predito
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Temperatura (°C)	Concentração de BM (g.L <sup>-1</sup> )	Metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)	Metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
D-1	-1	-1	35	10	290,09	257,43
D-2	1	-1	55	10	115,71	107,29
D-3	-1	1	35	18	283,50	289,10
D-4	1	1	55	18	128,42	138,97
D-5	-1,41	0	30,86	14	272,68	288,93
D-6	1,41	0	59,14	14	81,09	76,39
D-7	0	-1,41	45	8,34	165,16	191,19
D-8	0	1,41	45	19,66	250,20	235,99
D-9	0	0	45	14	252,60	262,16
D-10	0	0	45	14	272,94	262,16
D-11	0	0	45	14	260,93	262,16

Por meio da análise da variância (ANOVA) observou-se bom ajuste dos dados, com R<sup>2</sup> de 95,57% (Tabela 5.15) e t<sub>tabelado</sub> igual a 2,12. A variação da resposta em função das variáveis independentes significativas é descrita pela equação polinomial de 2<sup>a</sup> ordem (Equação 6):

$$Y = 262,16 - 75,07 x_1 - 39,68 x_1^2 - 24,29 x_2^2 \quad (6)$$

Em que:

Y= produção predita de metano (mL.g<sup>-1</sup>STV)

x<sub>1</sub>= temperatura de incubação (°C);

x<sub>2</sub>= concentração de BM (g.L<sup>-1</sup>).

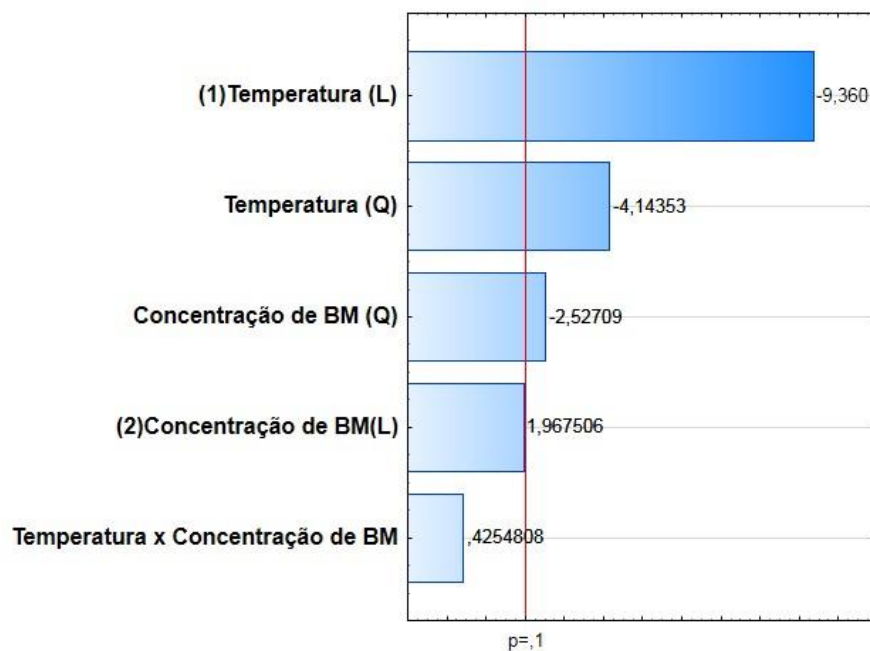
Diante do diagrama de Pareto (Figura 5.34 e Tabela 5-17) pode-se verificar a significância estatística dos efeitos padronizados em ordem decrescente de seus valores

absolutos. Foram constatados os efeitos significativos da temperatura de incubação (quadrático e linear) sobre a produção de metano e da concentração de BM (efeito quadrático negativo). A temperatura representou maior magnitude de impacto na produção de metano. A interação entre temperatura e concentração de BM não foi significativa, isso significa que as variações de temperatura afeta a produção de metano independentemente dos valores de concentração de BM.

Tabela 5-17 ANOVA para o efeitos da temperatura de operação e da concentração de BM pré-tratado em autoclave na produção máxima de metano.

Variável	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F-valor	P-valor	Fatores
Temperatura (L)	45074,40	1	45074,40	87,62646	0,000234	Significante
Temperatura (Q)	8831,51	1	8831,51	17,16881	0,008966	Significante
Concentração de BM (L)	1991,26	1	1991,26	3,87108	0,106262	Não significativa
Concentração de BM (Q)	3285,02	1	3285,02	6,38620	0,052716	Significante
Temperatura x Concentração de BM	93,12	1	93,12	0,18103	0,688178	Não significativa
Erro puro	2571,96	5	514,39			
Total	59541,37	10				

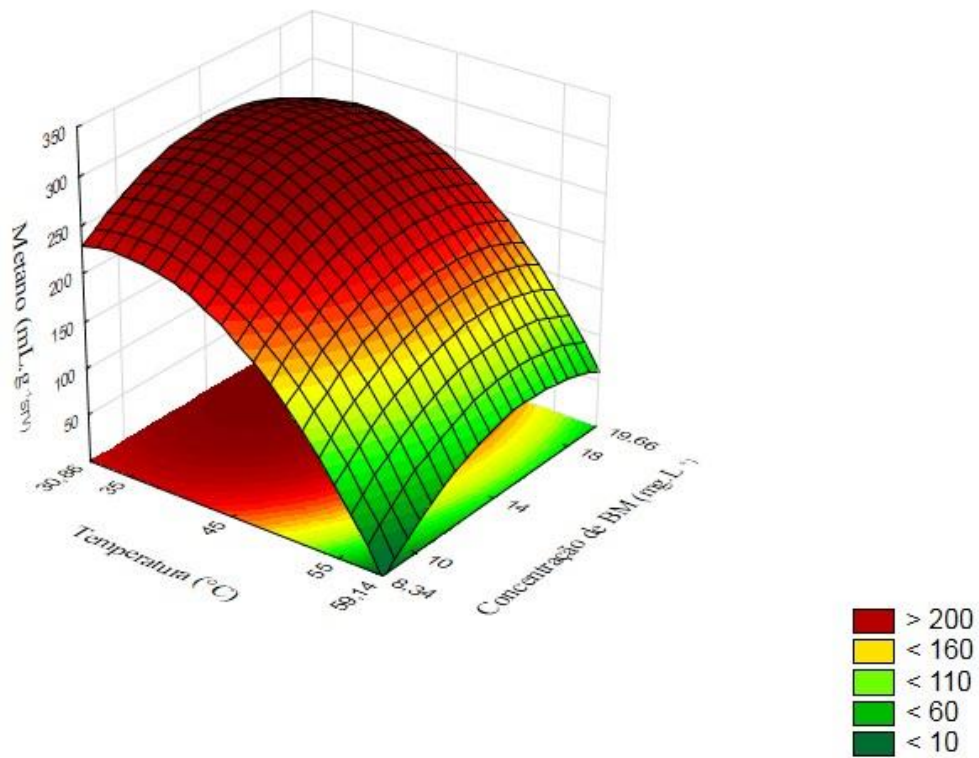
Figura 5.34 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM.



Fonte: o autor.

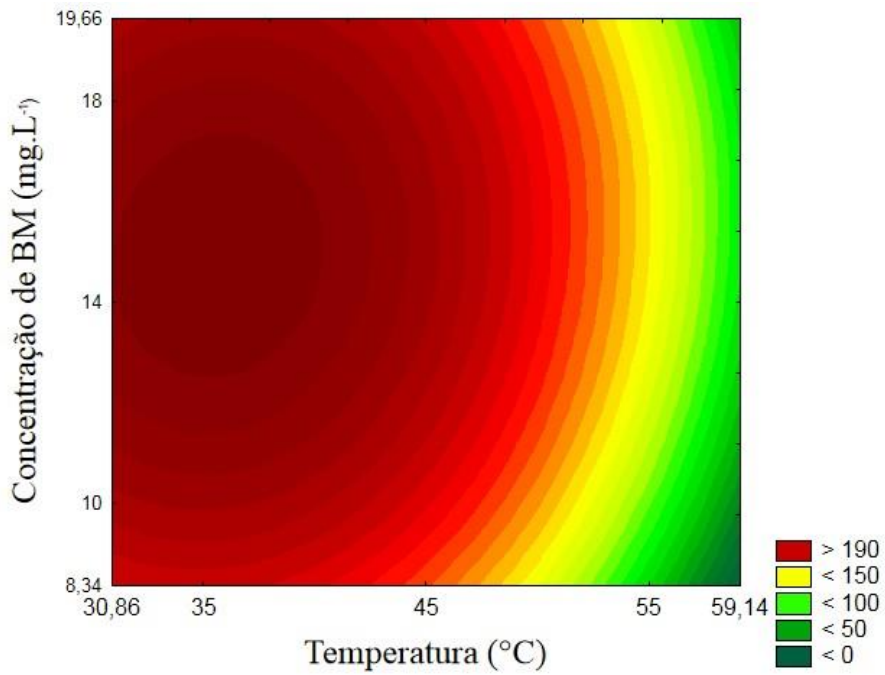
A superfície de resposta e curvas de contorno para produção de metano representam o intervalo ótimo para cada variável independente (Figuras 5.35 e 5.36).

Figura 5.35 Superfície de resposta dos efeitos da interação entre as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM na produção de metano.



Fonte: o autor.

Figura 5.36 Curvas de contorno para efeitos da interação entre as variáveis (x1) temperatura e (x2) concentração de BM na produção de metano.



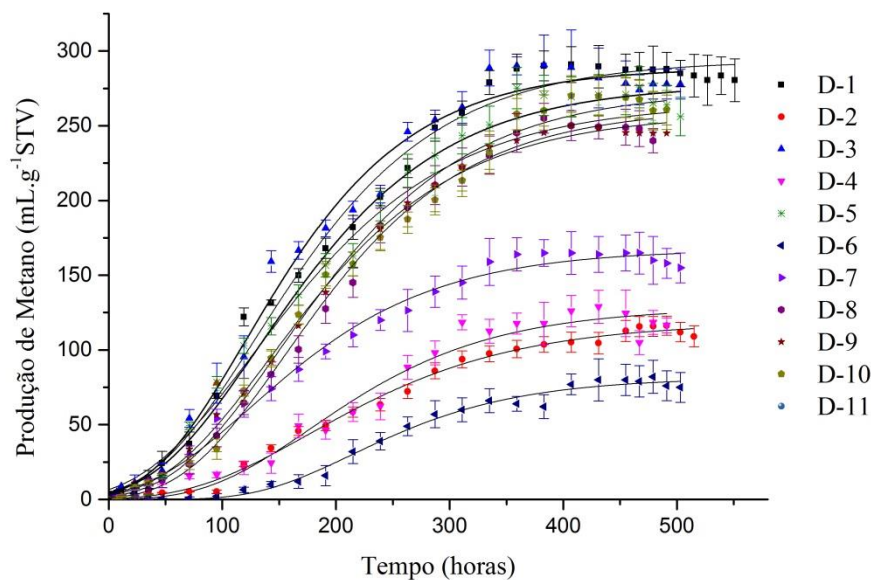
Fonte: o autor.

Em relação à produção máxima de metano ( $P$ ) obtida no ensaio com BM moído e sem pré-tratamento (M), realizado na primeira fase dessa pesquisa ( $171,58 \pm 4,87 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) para todos os ensaios do DCCR operados em temperatura de  $30,86 - 45^\circ\text{C}$  obteve-se resultados superiores, entre  $203,16 - 290,09 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ . Pagliaccia et al. (2019) verificaram com pré-tratamento em autoclave ( $134^\circ\text{C}$  por 20 minutos e 3,2 bar) de resíduos orgânicos municipal (alimentos, resíduos de jardinagem e papéis),  $386,0 \text{ mL CH}_4 \text{ g}^{-1}\text{STV}$  diante de  $343,0 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  sem o pré-tratamento.

Veluchamy e Kalamdhad (2017) constataram  $303,0 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  de metano, volume 73% superior, após pré-tratamento de polpa de papel a temperatura de  $80^\circ\text{C}$  por 90 minutos. Os autores também relataram remoção de celulose de 47% para 60,2% após o processo. De modo semelhante, Bolado e Rodriguez (2016) observaram acréscimo de 29% da produção de metano após pré-tratamento térmico de  $121^\circ\text{C}$  por 60 minutos da palha de trigo. Nesta pesquisa, a aplicação deste pré-tratamento ao BM também favoreceu a obtenção de metano em temperatura mesofílica.

A produção máxima de metano ( $290,09 \pm 7,91 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ) foi observada em (D-1), a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de BM. Valor aproximado foi obtido para a condição (D-3), de  $283,50 \pm 4,58 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ . As velocidades máximas de produção de metano ( $R_m$ ) foram de  $2,08 \pm 0,05$  e de  $2,15 \pm 0,11 \text{ mL.g STV.h}^{-1}$  e os períodos de fase lag ( $\lambda$ ) foram  $38,38 \pm 5,52$  e  $37,74 \pm 6,38$  horas respectivamente, para D-1 e D-3. Observou-se que, apesar do aumento da concentração de substrato de 10 para  $18 \text{ g.L}^{-1}$ , não houve acréscimo da produção de metano, o que reitera a menor magnitude de impacto da variável concentração (Figura 5.37 e Tabela 5-18).

Figura 5.37 Variação temporal para a produção de metano dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.



Fonte: o autor.

Tabela 5-18 Parâmetros cinéticos referentes às curvas de produção de metano do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.

Ensaio	$P$ (mL.g <sup>-1</sup> STV)	$R_m$ (mL.g STV.h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$R^2$
D-1	290,09 ± 3,5	2,08 ± 0,05	38,38 ± 5,52	0,99
D-2	115,71 ± 2,10	0,42 ± 0,03	73,01 ± 5,78	0,98
D-3	283,50 ± 4,58	2,15 ± 0,11	37,74 ± 6,38	0,99
D-4	128,42 ± 5,12	0,51 ± 0,53	86,10 ± 12,52	0,97
D-5	272,68 ± 4,78	1,10 ± 0,08	39,81 ± 6,10	0,99
D-6	81,048 ± 2,02	0,36 ± 0,030	131,03 ± 7,33	0,99
D-7	165,16 ± 2,64	0,66 ± 0,03	32,61 ± 5,67	0,99
D-8	250,20 ± 3,87	1,07 ± 0,04	65,06 ± 4,51	0,99
D-9	252,60 ± 2,63	1,01 ± 0,02	48,70 ± 6,42	0,99
D-10	272,94 ± 3,66	0,93 ± 0,04	57,50 ± 4,26	0,99
D-11	260,93 ± 5,55	1,01 ± 0,05	50,57 ± 6,91	0,98

Por outro lado, elevadas temperaturas foram desfavoráveis à digestão anaeróbia do BM, haja vista que nas condições dos ensaios (C-2), (C-4) e (C-6), mantidos  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $59,14 \pm 1^\circ\text{C}$  com  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $18,0 \text{ g.L}^{-1}$  e  $14 \text{ g.L}^{-1}$  de BM, foram obtidos menores valores de  $P$ , respectivamente,  $115,71 \pm 4,75$ ;  $128,42 \pm 5,35$  e  $81,09 \pm 2,05 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ . Além

disso, essas condições estão relacionadas aos maiores  $\lambda$ , de  $73,01 \pm 5,78$ ;  $86,10 \pm 12,52$  e  $131,03 \pm 7,33$  horas, respectivamente, e menores  $R_m$ , de  $0,42 \pm 0,03$ ;  $0,51 \pm 0,53$  e  $0,36 \pm 0,030$ , respectivamente, para (D-2), (D-4) e (D-6).

O processo de crescimento microbiano é dependente de reações químicas cujas taxas de velocidade são influenciadas pela temperatura. Nessa pesquisa, o ponto ótimo de temperatura predito pelo modelo foi de  $35^\circ\text{C}$ . Temperaturas superiores a  $45^\circ\text{C}$  provavelmente implicaram em alterações no metabolismo microbiano, uma vez que em elevadas temperaturas ocorre à desnaturação de proteínas, sobretudo de enzimas, afetando a permeabilidade da membrana celular (BITTON, 1994).

Desse modo, a velocidade de produção de metano ( $R_m$ ) reduzida aliada ao maior período para início da produção metano ( $\lambda$ ) em (D-2), (D-4) e (D-6) pode ter ocorrido em decorrência a alterações bioquímicas da microbiota. Em estudo sobre a influência da temperatura na digestão anaeróbia da casca de arroz, Yan et al. (2015) realizaram testes a  $30$ ,  $35$  e  $45^\circ\text{C}$ , constatando que a temperatura ótima também foi de  $35^\circ\text{C}$ . Zamanzadeh et al. (2016) verificaram que a digestão anaeróbia de resíduos alimentares a temperatura mesofílica ( $37^\circ\text{C}$ ) teve melhor produção de metano ( $480 \text{ mL.g}^{-1}\text{SV}$ ) se comparado temperatura mesofílica ( $55^\circ\text{C}$ ), com  $448 \text{ mL.g}^{-1}\text{SV}$ . Ren et al. (2018) também relataram melhor desempenho metanogênico em reatores mesofílicos ( $32^\circ\text{C}$ ) quando comparado aos termofílicos ( $55^\circ\text{C}$ ).

Corroborando a isso, em (D-5) e (D-6), ambos com  $14 \text{ g.L}^{-1}$ , os efeitos do acréscimo da temperatura de  $30^\circ\text{C}$  (D-5) para (D-6) foram evidenciados haja vista que  $P$ ,  $R_m$  e  $\lambda$  foram de  $272,68 \pm 4,78 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ;  $1,10 \pm 0,08 \text{ mLgSTV.h}^{-1}$ ;  $39,81$  horas na primeira condição e,  $81,048 \pm 2,02 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ;  $0,36 \pm 0,03 \text{ mL.g STV.h}^{-1}$  e  $131,03 \pm 7,33$  horas na segunda.

Foi verificado aumento de  $P$  com o incremento da carga de substrato em (D-7) e (D-8), operados a mesma temperatura de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , uma vez que para concentração de  $8,34 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $P$  foi de  $165,16 \pm 2,64 \text{ mL.g}^{-1} \text{STV}$  e para concentração de  $19,66 \text{ g.L}^{-1}$ , foi de  $250,20 \pm 3,87 \text{ mL.g}^{-1} \text{STV}$ . Em (D-7) verificou-se  $R_m$  de  $0,66 \pm 0,03 \text{ mL.g STV.h}^{-1}$  e  $32,61 \pm 5,67$  horas e para (D-8)  $1,07 \pm 0,04 \text{ mL.g STV.h}^{-1}$  e  $65,06 \pm 4,51$  horas. Logo, a produção de metano foi inferior em (D-7) devido à escassez de substrato, o que impactou diretamente na atividade das bactérias celulolíticas, prejudicando o rendimento das demais etapas da digestão anaeróbia. Isso ocorre porque em baixas concentrações do substrato, a ocupação dos sítios ativos das enzimas catalisadoras da hidrólise é reduzida e a velocidade de reação está diretamente relacionada ao número de sítios ocupados. Por outro lado, em concentrações elevadas de substrato, como em (D-7), provavelmente todos os sítios ativos estão ocupados e a reação se

tornou independente da concentração de substrato, já que não é possível a formação de mais interações enzima-substrato (WILSON e WALKER, 2010). Além disso, a correlação entre aumento de substrato e acréscimo de  $P$  provavelmente se deve a maiores concentrações de ácidos orgânicos liberados, os quais são substrato para a metanogênese (KUMAR e LIN, 2013; WANG et al., 2015).

A inibição da atividade microbiana por excesso de substrato pode ocorrer, uma vez que a hidrólise é facilitada de modo a elevar o teor de açúcares no meio (FERNÁNDEZ et al., 2008; LEVIN et al., 2009; RABELO et al., 2018). Nessa pesquisa, em (D-8) foi constatado  $P$  de 250,20 mL.g<sup>-1</sup>STV e, em (D-9), (D-10) e (D-11), obteve-se, respectivamente, 252,60; 272,94 e 260,93 mL.g<sup>-1</sup>STV. Os citados ensaios foram conduzidos a 45°C e, apesar do acréscimo da concentração de BM em (D-8), os valores de  $P$  foram aproximados. Infere-se, portanto, que concentrações superiores a 19,66 g.L<sup>-1</sup> podem implicar redução da atividade metanogênica. Os valores  $R_m$  e  $\lambda$  também foram similares, de  $1,07 \pm 0,04$ ;  $1,01 \pm 0,02$ ;  $0,93 \pm 0,04$  e  $1,01 \pm 0,05$  mL.gSTV.h<sup>-1</sup> e de  $65,06 \pm 4,51$ ;  $48,70 \pm 6,42$ ;  $57,50 \pm 4,26$  e  $50,57 \pm 6,91$  horas em (D-8), (D-9), (D-10) e (D-11), respectivamente.

De modo similar, Rabelo et al. (2018) constataram os efeitos da concentração de substrato na atividade da comunidade de bactérias quando aumentaram a concentração de 0,8 g.L<sup>-1</sup> para 5,0 g.L<sup>-1</sup>, havendo acréscimo da produção de hidrogênio. No entanto, quando os autores alteraram a concentração de substrato para 9,2 g.L<sup>-1</sup>, a produção de hidrogênio reduziu de 18,78 a 13,64 mmol.L<sup>-1</sup>.

Fernández et al.(2008) comprovaram a influência da concentração de substrato na digestão anaeróbia de resíduos orgânicos quando aplicou 931,1 mgDQO.L<sup>-1</sup> e 1.423,4 mgDQO.L<sup>-1</sup>. Os autores relataram que na condição com menor carga orgânica, houve produção de metano de 411 mLg<sup>-1</sup>DQO e, quando a carga orgânica foi aumentada, foi 17% inferior. É provável que em (D-8), houve substrato excedente a capacidade enzimática de interação impactando negativamente em reações bioquímicas anteriores à metanogênese e, por consequência, nos produtos finais da digestão anaeróbia.

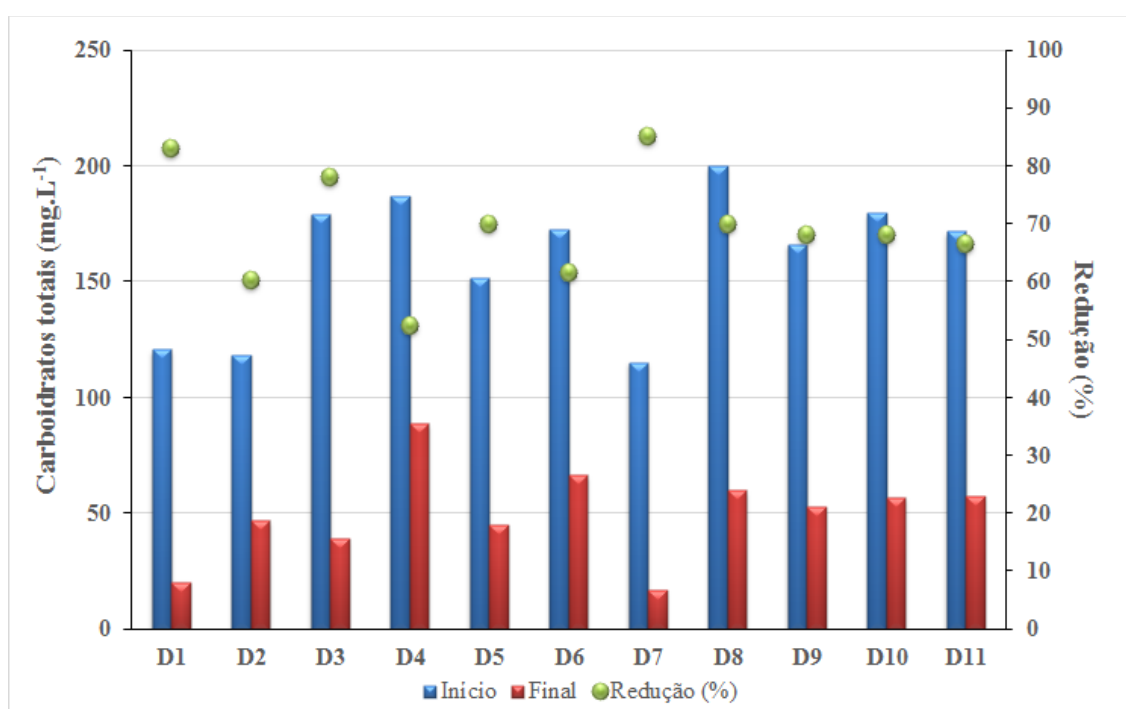
As concentrações iniciais de carboidratos totais foram de (D-1)  $121,8 \pm 2,82$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-2)  $118,5 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-3)  $179,5 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-4)  $187,5 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-5)  $152,3 \pm 4,24$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-6)  $173,6 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-7)  $115,6 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-8)  $201,7 \pm 2,82$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-9)  $166,8 \pm 0,70$  mg.L<sup>-1</sup>; (D-10)  $180,3 \pm 1,41$  mg.L<sup>-1</sup> e (D-11)  $172,9 \pm 2,12$  mg.L<sup>-1</sup>. Portanto, para (D-8), com maior concentração de substrato (19,66 mg.L<sup>-1</sup>), verificou-se solubilização inicial mais expressiva de carboidratos. Seguido por (D-3) e (D-4), ambos com 18 g.L<sup>-1</sup> e, o menor teor de carboidratos solúveis está relacionado a (D-7), com 8,34 g.L<sup>-1</sup>.



No encerramento dos ensaios foram observadas concentrações de: (D-1)  $20,5 \pm 0,70$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-2)  $47,0 \pm 1,41$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-3)  $39,1 \pm 3,53$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-4)  $89,4 \pm 0,70$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-5)  $45,5 \pm 2,82$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-6)  $66,5 \pm 0,70$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-7)  $17,4 \pm 2,12$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-8)  $60,3 \pm 3,53$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-9)  $53,6 \pm 2,82$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; (D-10)  $57,2 \pm 1,41$   $\text{mg.L}^{-1}$  e (D-11)  $57,5 \pm 2,82$   $\text{mg.L}^{-1}$ . A eficiência de remoção foi de: (D-1) 83,05%; (D-2) 60,33%; (D-3) 78,27%; (D-4) 45,6%; (D-5) 70,06%; (D-6) 61,56%; (D-7) 85,28%; (D-8) 70,0%; (D-9) 70,16%; (D-10) 65,0% e (D-11) 68,33% (Figura 5.38).

A maior remoção (85,28%) foi relacionada ao ensaio (D-7), com concentração reduzida de substrato ( $8,34$   $\text{mg.L}^{-1}$ ), comprovando eficiência da hidrólise e fermentação nessa condição. Já em (D-8), com  $19,66$   $\text{g.L}^{-1}$  a eficiência de remoção foi de 70,0%, o que reitera possibilidade de inibição da atividade celulolítica e fermentativa pelo substrato excedente uma vez que ambos foram conduzidos a  $45^\circ\text{C}$  e neste último houve menor consumo de carboidratos.

Figura 5.38 Eficiência de consumo de carboidratos totais para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.



Fonte: o autor.

Além disso, em elevadas temperaturas, de  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $59,14 \pm 1^\circ\text{C}$  foram obtidas as menores remoções de carboidratos, de 60% (D-2), 52,53% (D-4) e 61,56% (D-6), respectivamente, corroborando com a possível alteração da comunidade de bactérias em decorrência da desnaturação de proteínas, tornando a atividade enzimática menos eficiente.

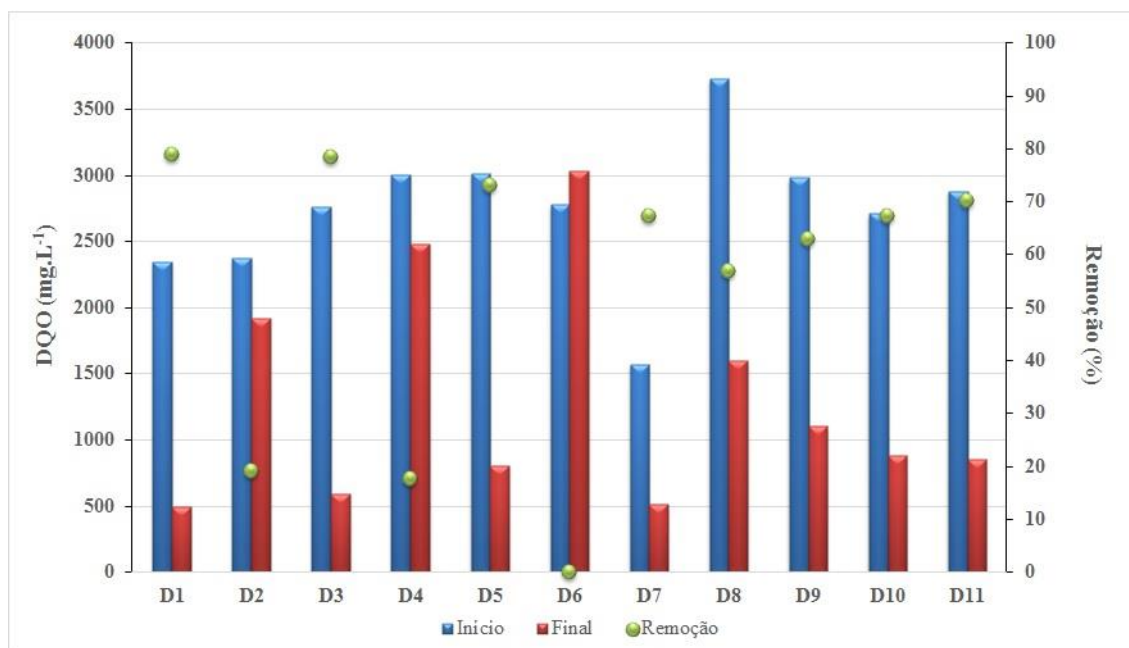
Ressalta-se o eficiente consumo de carboidratos em (C-1), de 83,05%, com 10 g.L<sup>-1</sup> de BM e também em (C-3), com 78,27%, ambos operados em temperatura considerada ótima (35°C).

Concentrações máximas de matéria orgânica foram verificadas na fase exponencial de produção de metano: (D-1) 2.348 ± 10,6 mg.L<sup>-1</sup>; (D-2) 2.373 ± 8,40 mg.L<sup>-1</sup>; (D-3) 2.763 ± 7,77 mg.L<sup>-1</sup>; (D-4) 3.006 ± 15,6 mg.L<sup>-1</sup>; (D-5) 3.011 ± 10,6 mg.L<sup>-1</sup>; (D-6) 2.780 ± 5,3 mg.L<sup>-1</sup>; (D-7) 1.571 ± 8,48 mg.L<sup>-1</sup>; (D-8) 3.727 ± 4,94 mg.L<sup>-1</sup>; (D-9) 2.982 ± 3,53 mg.L<sup>-1</sup>; (D-10) 2.708 ± 4,94 mg.L<sup>-1</sup> e (D-11) 2.879 ± 2,82 mg.L<sup>-1</sup>. Ao término dos ensaios, as concentrações de matéria orgânica foram de: (D-1) 490 ± 7,07 mg.L<sup>-1</sup>; (D-2) 1.917 ± 4,24 mg.L<sup>-1</sup>; (D-3) 591 ± 10,60 ; (D-4) 2.475 ± 7,07 mg.L<sup>-1</sup>; (D-5) 804 ± 13,44 mg.L<sup>-1</sup>; (D-6) 3.036 ± 7,78 mg.L<sup>-1</sup>; (D-7) 511,5 ± 4,95 mg.L<sup>-1</sup>; (D-8) 1.600 ± mg.L<sup>-1</sup>; (D-9) 1.100 ± 4,24 mg.L<sup>-1</sup>; (D-10) 882,3 ± 3,54 mg.L<sup>-1</sup> e (D-11) 855,2 ± 10,60 mg.L<sup>-1</sup>.

A partir das máximas concentrações observadas em cada ensaio foram calculadas as eficiências de remoção de matéria orgânica carbonácea a fim de atestar a atividade de metabolização do consórcio microbiano. A remoção de matéria orgânica está correlacionada à produção de metano e atua como indicador da eficiência do processo em termos de utilização de carbono (KUMAR; LIN, 2013). As melhores eficiências de remoção de matéria orgânica se referem a (D-1) e (D-3), com 79,13% e 78,61%, respectivamente, o que condiz com máximos valores de *P* para operação em 35 ± 1°C, com concentrações de 10 e 18 g.L<sup>-1</sup>, o que é indicativo de eficaz conversão de metabólitos intermediários a metano.

Os ensaios cujas temperaturas de operação foram 45 ± 1°C obtiveram eficiência de remoção da ordem de 63,11- 70,30%, enquanto no ensaio a 30,86 ± 1°C (D-5) constatou-se 73,29%. Para temperatura termofílica (55 - 59,14 ± 1 °C), o consumo de matéria orgânica foi bastante reduzido, de 19,22% (D-2) e 17,66% (D-4), havendo liberação de matéria orgânica carbonácea em (D-6), com concentração final de 3.036 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 5.39).

Figura 5.39 Concentração máxima e final de matéria orgânica nos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.



Fonte: o autor.

De forma semelhante, Kumar e Lin (2013) relataram que a 45°C, a remoção de matéria orgânica também foi superior quando comparada à verificada em 55°C em processo anaeróbio visando a degradação de resíduos vegetais. Esses resultados sugerem que a elevação da temperatura afetou em maior magnitude a comunidade de arqueias metanogênicas, tendo em vista que grupos de bactérias fermentativas atuaram na liberação de elevadas concentrações de matéria orgânica, as quais foram consumidas em taxas reduzidas por arqueias metanogênicas quando em temperatura termofílica, gerando acúmulo de ácidos e queda de pH.

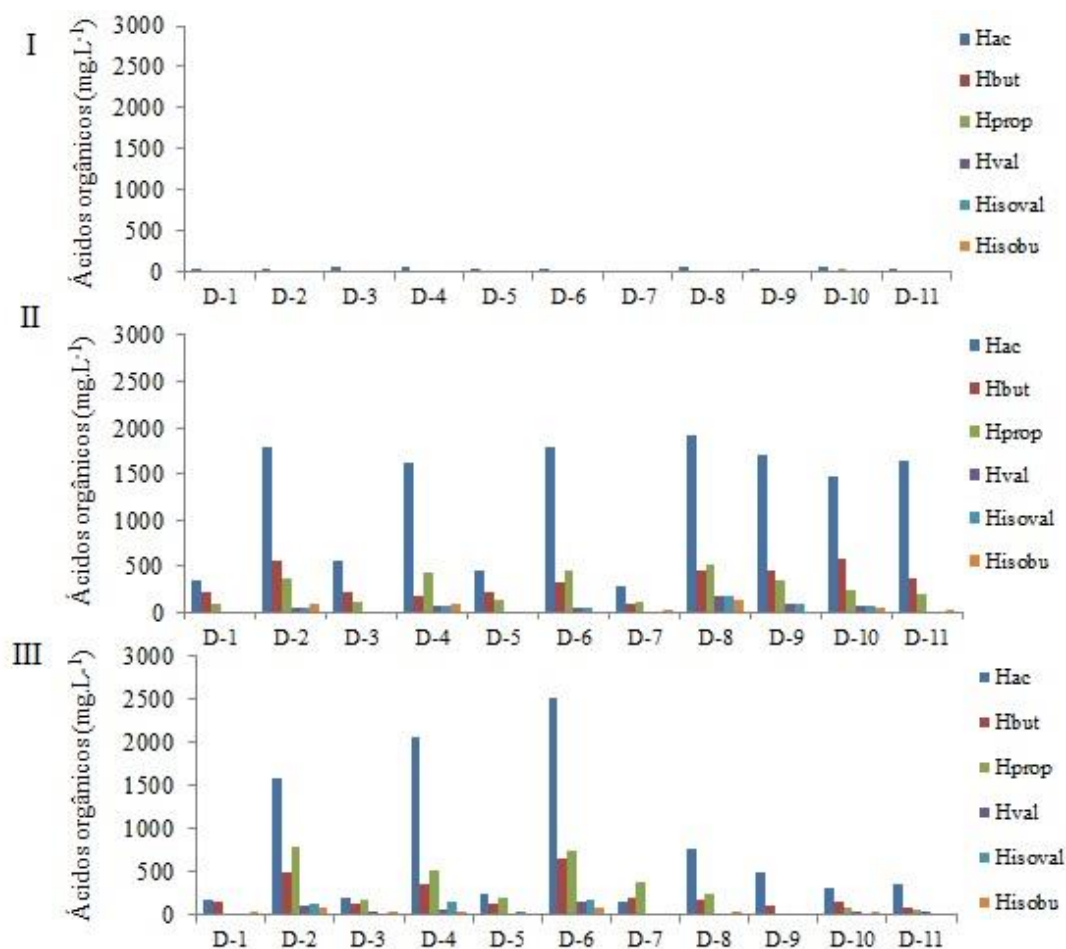
Os ácidos orgânicos são produtos intermediários da acidogênese e acetogênese, portanto suas concentrações, juntamente ao pH, são bons indicadores do metabolismo da digestão anaeróbia (HABIBA et al., 2009). Nas amostras iniciais dos ensaios, foram detectadas concentrações reduzidas de ácidos propiônico (7,2 - 35,2 mg.L<sup>-1</sup>), butírico (14,5 - 22,89 mg.L<sup>-1</sup>), valérico (11,4 - 13,2 mg.L<sup>-1</sup>), isovalérico (4,0 - 8,3 mg.L<sup>-1</sup>) e mais expressivas de ácido acético (20,0- 76,5 mg.L<sup>-1</sup>). É provável que a degradação da hemicelulose devido ao pré-tratamento do BM em autoclave tenha contribuído com essas concentrações de ácido acético (Figura 5.41).

Amostras para análise em fase intermediária dos experimentos correspondem ao período de exponencial de produção de metano. Observou-se acréscimo das concentrações de

ácidos, sobretudo de ácidos acético (289,3 – 1.909,0 mg.L<sup>-1</sup>), butírico (100,0 – 576,8 mg.L<sup>-1</sup>) e propiônico (99,8 – 456,9 mg.L<sup>-1</sup>). As concentrações totais de ácidos em amostras da fase intermediária foram de (738,2 – 3.343,3 mg.L<sup>-1</sup>). A elevação da concentração desses ácidos foi decorrente atividade fermentativa por pela comunidade de bactérias acidogênicas. A ausência acúmulo de ácidos é indício de que a fermentação ocorreu de forma cooperativa com a metanogênese, já que os ácidos foram continuamente consumidos (REN et al, 2018). O mesmo provavelmente ocorreu em (D-1), (D-5) e (D-7), ensaios com menores concentrações, de 738,6; 857,2 e 569,1 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Por outro lado, as concentrações mais elevadas foram observadas em (D-2), (D-4), (D-6), (D-8), (D-9), (D-10) e (D-11), com respectivamente, 2.962; 2.667,3; 2.662,7; 3.343,3; 2.719,4; 2.467,0 e 2.395,7 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 5.40). Esses ensaios foram conduzidos a temperaturas de 45 °C, 55°C e 59°C. Portanto, as concentrações elevadas para essas condições reiteram que a temperatura termofílica contribuiu com a redução do metabolismo de arqueias metanogênicas, afetando o crescimento dessa comunidade e, por consequência, a conversão de metabólitos a metano. Ren et al. (2018) também relataram a redução da atividade metanogênica e acidificação do meio em temperatura termofílica. Segundo os autores, grupos de bactérias são capazes de manter a velocidade de degradação de substrato mesmo a temperaturas elevadas, de modo a produzir metabólitos excedentes liberados na fermentação.

Figura 5.40 Ácidos orgânicos na amostra inicial (I), intermediária (II) e final (III) dos ensaios do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.

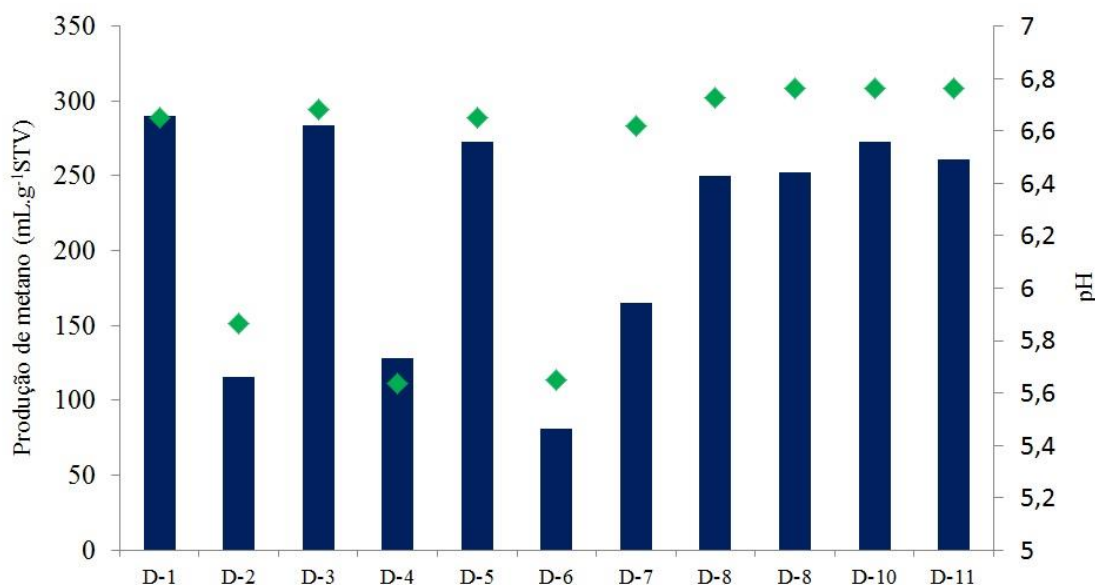


Hac= ácido acético; Hprop= ácido propiônico; Hbut= ácido butírico; Hval= ácido valérico; Hisoval= ácido isovalérico; Hisobu= ácido isobutírico.

Fonte: o autor.

Nas amostras de encerramento dos ensaios foram constatadas concentrações de ácidos orgânicos totais de 533,2 – 4.322,4 mg.L<sup>-1</sup>. Os ensaios com concentrações mais elevadas foram (D-2), (D-4) e (D-6), com 3.199,4; 3.208,43 e 4.322,4, respectivamente (Figura 5.41). Logo, foi confirmado acúmulo de ácidos desses reatores, e, a liberação de matéria carbonácea verificada no encerramento de (D-6), provavelmente está relacionada ao teor de ácidos elevado. Para os demais ensaios houve redução das concentrações de ácidos orgânicos.

Figura 5.41 Produção máxima de metano associada ao pH final para cada ensaio do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.



Fonte: o autor.

O ácido acético foi observado em concentrações mais expressivas no final dos ensaios conduzidos em temperatura termofílica (1.586 – 2.513,4 mg.L<sup>-1</sup>) diante daqueles em temperatura mesofílica ( 201,2 – 488,4 mg.L<sup>-1</sup>). De forma semelhante, Lianhua et al. (2010) relataram inibição da produção de metano a partir de casca de arroz em temperatura termofílica, o que foi atribuído a elevada concentração de ácido acético detectada. De acordo com os autores, comparado a outros grupos de bactérias, o metabolismo e crescimento de arqueias metanogênicas acetoclásticas é muito lento, limitando a metanogênese, o que torna a taxa de produção de ácidos superior ao de consumo na digestão anaeróbia termofílica.

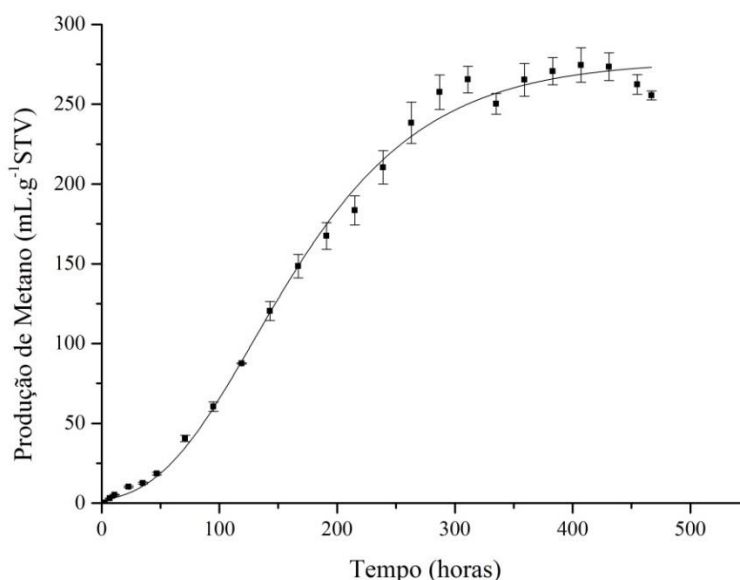
Os valores de pH nas amostras de encerramento dos ensaios eram: (D-1) 6,6 ± 0,08 mg.L<sup>-1</sup>; (D-2) 5,8 ± 0,02 mg.L<sup>-1</sup>; (D-3) 6,7 ± 0,06 ; (D-4) 5,6 ± 0,05 mg.L<sup>-1</sup>; (D-5) 6,6 ± 0,03 mg.L<sup>-1</sup>; (D-6) 5,6 ± 0,14 mg.L<sup>-1</sup>; (D-7) 6,62 ± 0,11 mg.L<sup>-1</sup>; (D-8) 6,7 ± 0,02 mg.L<sup>-1</sup>; (D-9) 6,7 ± 0,02 mg.L<sup>-1</sup>; (D-10) 6,7 ± 0,02 mg.L<sup>-1</sup> e (D-11) 6,7 ± 0,01 mg.L<sup>-1</sup>.

Diante disso, para as condições delimitadas como ótimas pelo ajuste do modelo (35°C e 18 mg.L<sup>-1</sup> de BM), com *P* predito de 289,10 mL.g<sup>-1</sup>STV e valor obtido de 283,50 mL.g<sup>-1</sup>STV, além de eficiente redução de carboidratos (78,27%) , verificou-se também remoção adequada de matéria orgânica (78,61%), reiterada pelas reduzidas concentrações de ácidos orgânicos ao término do experimento (579 mg.L<sup>-1</sup>).

### 5.2.5.1 Validação do modelo de produção de metano

As condições ótimas previstas foram empregadas nos reatores para validação do modelo (35°C e 18 g.L<sup>-1</sup> de BM). Sob essas condições, foi verificado  $P$  de  $273,34 \pm 4,32$  mL.g<sup>-1</sup>STV,  $R_m$  de  $1,80 \pm 0,06$  mL.g<sup>-1</sup>STV,  $\lambda$  de  $45,12 \pm 5,26$  horas e  $R^2$  de 0,99. Dessa forma, a partir do ensaio de validação, obteve-se 94,50 % de precisão em relação ao predito em (D-3), com 289,10 mL.g<sup>-1</sup>STV. Portanto, o modelo foi considerado eficiente (Figura 5.42).

Figura 5.42 Variação temporal da produção de metano para ensaio de validação do DCCR com BM pré-tratado em autoclave.



Fonte: o autor.

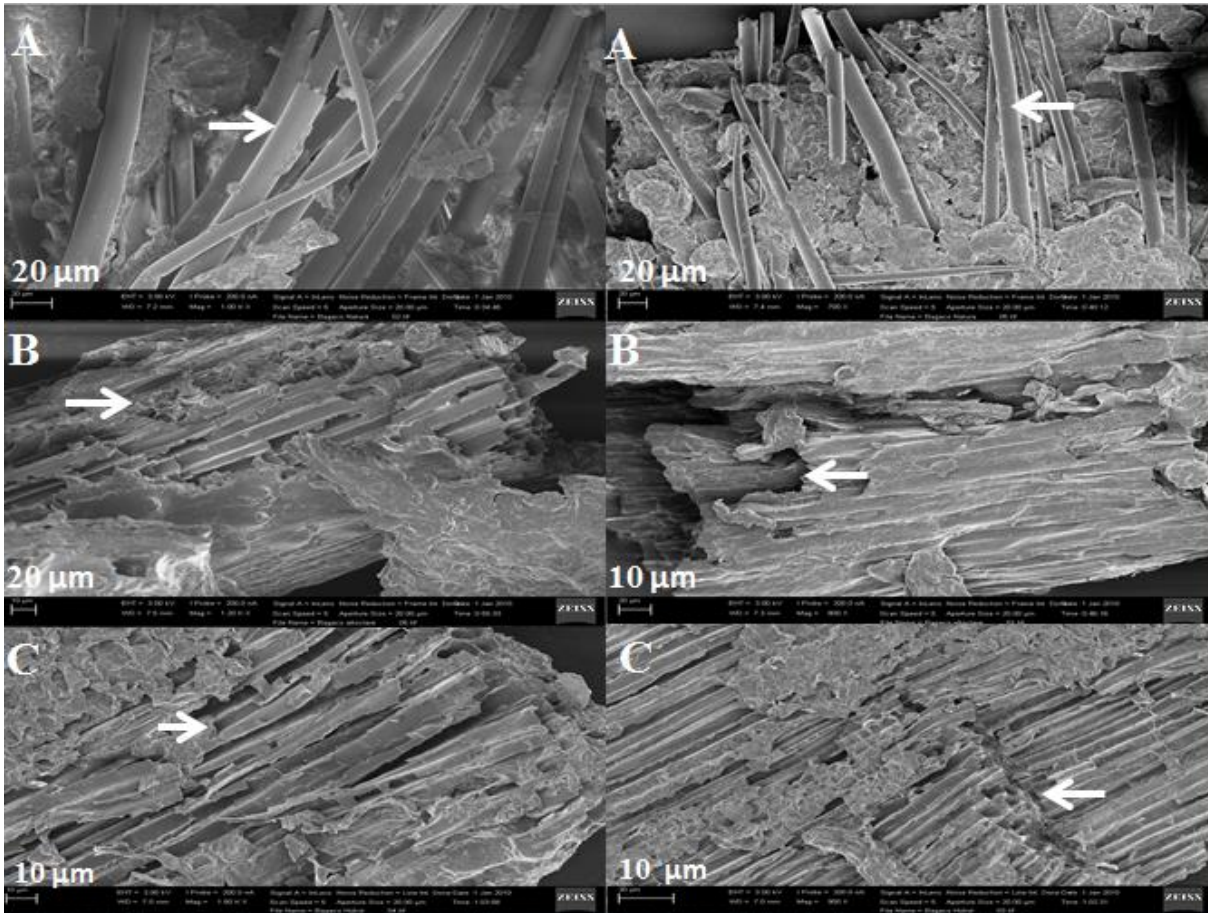
## 5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar alterações na estrutura do bagaço de malte *in natura* e pré-tratado em autoclave (121 °C, 1 atm por 30 minutos) e em reator hidrotérmico (210 °C por 10 minutos). Altas temperaturas e pressão contribuíram para o rompimento de fibras do material, aumentando a superfície de contato para a adesão de microrganismos.

Verificou-se que para o BM *in natura* fibras planas e com poucas ranhuras, enquanto para aquelas submetidas ao pré-tratamento em autoclave observou-se fibras irregulares e com

sinais de desgaste e rompimento. Para o BM submetido ao reator hidrotérmico observou-se fibras com sinais de rompimentos mais intensos (Figura 5.43).

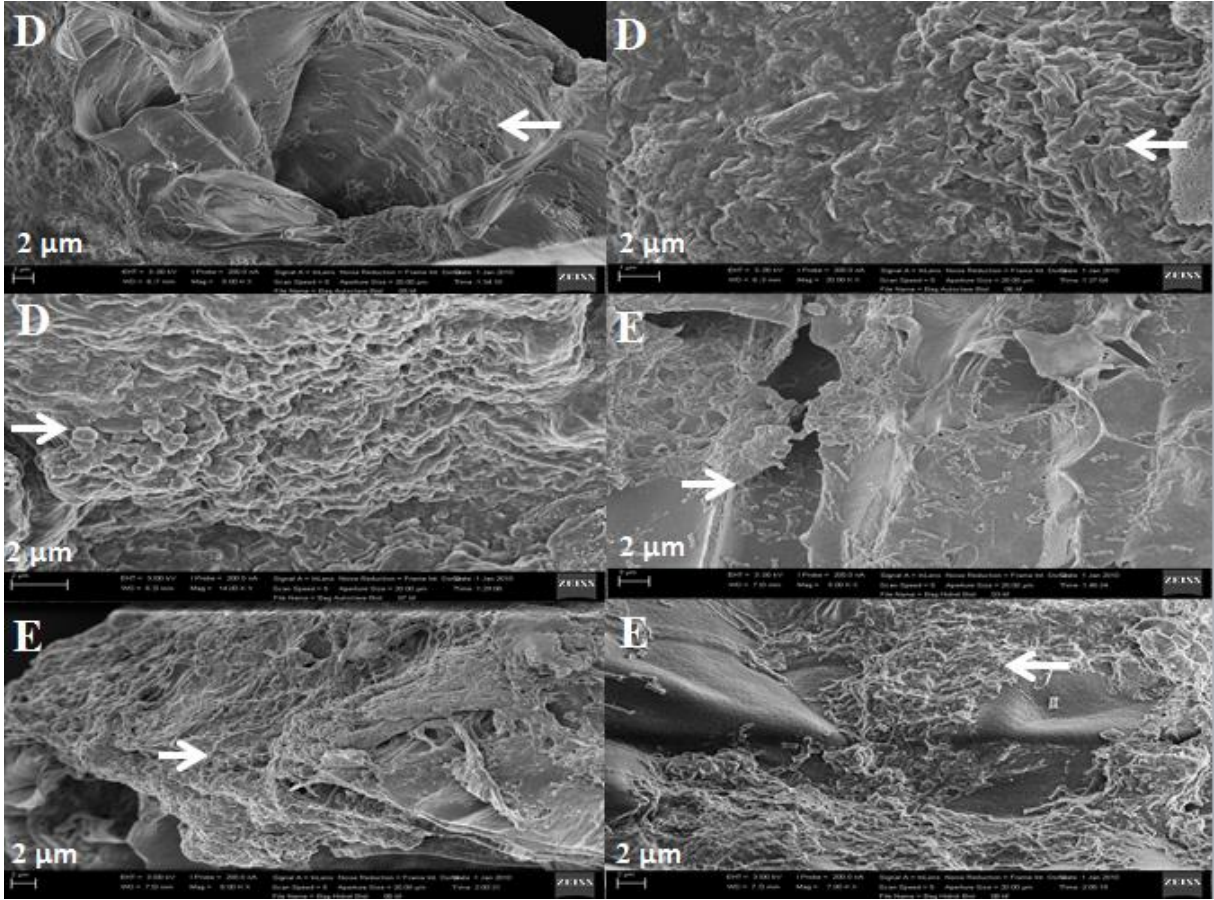
Figura 5.43 Estruturas do bagaço de malte in natura (A), pré-tratado em autoclave (B) e pré-tratado em reator hidrotérmico (C).



Estruturas semelhantes a microrganismos foram observadas aderidas às reentrâncias das fibras, tanto em (D) (bagaço de malte pré-tratado em autoclave) quanto em (E) (bagaço de malte pré-tratado em reator hidrotérmico). No entanto, em (E) a colonização se manifestou de forma mais intensa (Figura 5.44).



Figura 5.44 Microrganismos aderidos ao bagaço de malte pré-tratado em autoclave (D) e pré-tratado em reator hidrotérmico (E).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos ensaios com o BM isento de qualquer pré-tratamento (*in natura*) observou-se produção máxima de metano de  $164,18 \pm 4,94 \text{ mL.g}^{-1} \text{ STV}$  e velocidade de produção de metano (Rm) de  $1,23 \pm 0,14 \text{ mL.g STV h}^{-1}$ . Após a moagem e pré-tratamento do BM em sistema hidrotérmico a  $210^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, na ausência de hidrolisado, foi observada produção máxima de metano de  $411,64 \pm 7,19 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  e velocidade de produção de  $2,12 \pm 0,16$  (Tabela 6-2). Em relação ao pré-tratamento do BM em autoclave, a máxima produção de metano obtida foi de  $290,09 \pm 3,5 \text{ mL. g}^{-1}\text{STV}$  e velocidade de produção de  $2,08 \pm 0,05 \text{ mL. g}^{-1}\text{STV}$  (Tabela 6.4). A partir disso pode-se inferir sobre a dificuldade de degradação do BM *in natura* em relação ao pré-tratada em autoclave e em sistema hidrotérmico (Tabela 6-1).

A redução da granulometria do BM *in natura* (2,83 a 5,6 mm), por trituração (0,42 a 1,41 mm) e moagem (0,42 a 0,84 mm) para uso como substrato na digestão anaeróbia resultou em produção de metano similares de  $164,18 \pm 4,94$  (IN),  $175,76 \pm 2,66$  (T) e  $171,58 \pm 4,87 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$  (M). No entanto, em função da moagem do BM observou-se maior liberação de ácidos orgânicos, sobretudo ácido acético ( $447,92 \text{ mg.L}^{-1}$ ), propiônico ( $466,14 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e butírico ( $741,73 \text{ mg.L}^{-1}$ );

Altas temperaturas e pressão implicaram em maiores alterações da estrutura lignocelulósica do BM quando este material foi submetido a moagem, uma vez que após a aplicação do pré-tratamento hidrotérmico ( $180^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos e 9,6 bar), verificou-se significativo aumento da produção de metano para o BM moído, de  $171,58 \pm 4,87$  para  $320,64 \pm 7,72 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ , respectivamente. Por outro lado, para os ensaios com o BM triturado e *in natura*, após a aplicação do sistema hidrotérmico, foi verificado acréscimo da produção de metano menos expressiva, de  $175,76 \pm 2,66$  a  $230,93 \pm 2,87 \text{ mL. g}^{-1} \text{ STV}$  e  $164,18 \pm 4,94$  a  $226,73 \pm 5,13 \text{ mL. g}^{-1} \text{ STV}$ , respectivamente (Tabela 6-1).

Por meio do Delineamento Composto Central, verificou-se maior magnitude de impacto para a temperatura ( $x_1$ ) do que para o tempo de pré-tratamento ( $x_2$ ) sobre a variável resposta de produção máxima de metano (Tabela 6-2).

Maior severidade do pré-tratamento ( $210^{\circ}\text{C}$  a 12 bar por 20 minutos) não implicou em produção de metano superior. Somado a isso, nessa condição, foi observado prolongamento do período para início da produção de metano e reduzida velocidade de produção. Quando comparado aos demais ensaios verificou-se elevadas concentrações de ácido propiônico ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ), butírico ( $114,63 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e acético ( $49,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Dentre todos os pré-tratamentos estudados nessa pesquisa, as condições dos reatores com BM submetidos a moagem mais sistema hidrotérmico com severidade de 4,2 foram as mais adequadas para produção de metano ( $411,64 \pm 7,19 \text{ mL.g}^{-1}\text{STV}$ ), haja vista que houve elevada solubilização de matéria orgânica ( $3.900 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e assimilação pela comunidade de arqueias metanogênicas, com remoção de 81,12%.

Para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico foi verificado que o acréscimo da temperatura e volume de hidrolisado exerceram efeitos negativos na produção de metano. Por outro lado, para o aumento da concentração de BM foi observado efeito positivo (Tabela 6-3). Quanto ao DCCR com BM pré-tratado em autoclave, tanto o aumento da temperatura como o da concentração de BM atuaram de forma negativa na metanogênese (Tabela 6-4).

Tabela 6-1 Produção máxima de metano para os ensaios de avaliação da biodegradabilidade do BM.

1ª Etapa: Avaliação da biodegradabilidade do BM (Operação a 37 °C com 10 g.L <sup>-1</sup> de BM)	
Pré-tratamento	Produção máxima de metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
<i>In natura</i>	164,18 ± 4,94
<i>In natura</i> + hidrotérmico	226,73 ± 5,13
Trituração	175,76 ± 2,66
Trituração + hidrotérmico	230,93 ± 2,87
Moagem	171,58 ± 4,87
Moagem + hidrotérmico	320,64 ± 7,72

Tabela 6-2 Produção máxima de metano para os ensaios com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.

2ª Etapa: DCC com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico (Operação a 37°C com 10 g.L <sup>-1</sup> de BM)		
Temperatura (°C)	Tempo (min)	Produção máxima de metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
150	10	250,05 ± 9,93
210	20	333,02 ± 11,28
150	20	235,01 ± 10,14
210	10	411,64 ± 7,19
180	15	302,33 ± 3,85
180	15	318,15 ± 6,12
180	15	326,37 ± 7,01

Tabela 6-3 Produção máxima de metano para os ensaios do DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.

3ª Etapa: DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico			
a 210°C , 12 bar por 10 minutos			
Temperatura (°C)	Concentração de BM (g.L <sup>-1</sup> )	Hidrolisado (mL)	Produção máxima de metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
36	10	3	189,95 ± 3,24
54	10	3	155,01 ± 2,19
36	18	3	286,65 ± 3,47
54	18	3	182,93 ± 2,44
36	10	10	165,91 ± 4,03
54	10	10	187,04 ± 5,07
36	18	10	186,89 ± 5,41
54	18	10	145,15 ± 5,18
29,86	14	6,5	182,63 ± 3,54
60,14	14	6,5	108,49 ± 1,99
45	7,27	6,5	203,17 ± 1,85
45	20,73	6,5	267,90 ± 3,18
45	14	0,61	305,76 ± 17,79
45	14	12,39	188,76 ± 3,29
45	14	6,5	206,83 ± 3,34
45	14	6,5	203,77 ± 3,06
45	14	6,5	210,26 ± 2,62

Tabela 6-4 Produção máxima de metano para os ensaios com BM pré-tratado em autoclave.

4ª Etapa: DCCR com BM pré-tratado em autoclave a 121°C, 1 atm por 30 minutos		
Temperatura (°C)	Concentração de BM (g.L <sup>-1</sup> )	Produção máxima de metano (mL.g <sup>-1</sup> STV)
35	10	290,09 ± 3,5
55	10	115,71 ± 2,10
35	18	283,50 ± 4,58
55	18	128,42 ± 5,12
30,86	14	272,68 ± 4,78
59,14	14	81,048 ± 2,02
45	8,34	165,16 ± 2,64
45	19,66	250,20 ± 3,87
45	14	252,60 ± 2,63
45	14	272,94 ± 3,66
45	14	260,93 ± 5,55

## 7 CONCLUSÕES

- Por meio de MEV, observou-se que o pré-tratamento do BM em autoclave (120°C, 1 atm por 30 minutos) e em sistema hidrotérmico (210°C, 12 bar por 10 minutos) alteraram a morfologia do material. Modificação mais expressiva foi verificada para o BM pré-tratado em sistema hidrotérmico.
- Comprovou-se a aplicabilidade do inóculo (lodo anaeróbio de reator UASB do tratamento de águas residuárias de avícola) para obtenção de metano a partir do BM *in natura* ou pré-tratado, seja em autoclave ou em sistema hidrotérmico;
- A metanogênese foi favorecida após o emprego da biomassa aos pré-tratamentos de redução de partículas, em autoclave e em sistema hidrotérmico;
- O pré-tratamento de redução das partículas do BM não implicou em alteração da produção máxima de metano obtida. Contudo, houve acréscimo da velocidade de produção e redução do período para início da produção de metano após trituração e moagem.
- A redução da granulometria do BM alterou as estruturas das populações de bactérias e arqueias metanogênicas.
- De acordo com o modelo gerado pelo DCC do BM pré-tratado em sistema hidrotérmico, as condições ótimas de pré-tratamento foram de 210°C, 10 minutos e 12 bar.
- As populações de bactéria e arqueias metanogênicas foram afetadas pela severidade do pré-tratamento em sistema hidrotérmico aplicado ao substrato;
- Por meio do DCCR para o BM pré-tratado a 210°C por 10 minutos em sistema hidrotérmico, com as variáveis ( $x_1$ ) temperatura de incubação ( $x_2$ ) concentração de BM e ( $x_3$ ) volume de hidrolisado obteve-se ponto ótimo predito de 36°C, 18 g.L<sup>-1</sup> de BM e 3 mL de volume de hidrolisado.
- Observou-se magnitude de impacto na produção de metano, em ordem decrescente: ( $x_1$ ) temperatura de operação; ( $x_3$ ) volume de hidrolisado e ( $x_2$ ) concentração de BM.
- Por meio do DCCR com BM autoclavado por 30 minutos, com variáveis ( $x_1$ ) temperatura de operação e ( $x_2$ ) concentração de BM, o ponto ótimo predito foi de 35 °C e 18 g.L<sup>-1</sup> de BM.

- Foi verificada maior magnitude de impacto para a ( $x_1$ ) temperatura de operação do que para a ( $x_2$ ) concentração de BM sobre a variável produção de metano.

## 8 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Caracterizar a comunidade microbiana dos ensaios validados no DCCR com BM pré-tratado em sistema hidrotérmico e no DCCR com BM pré-tratado em autoclave por meio de tecnologias ômicas (metagenômica, metabolômica, metatranscriptômica e metaproteômica).

Quantificar e caracterizar os açúcares, furfural e 5-HMF gerados pelo rompimento da estrutura lignocelulósica do BM e liberados no hidrolisado após aplicação do sistema hidrotérmico. Desse modo, será possível correlacionar a inibição da comunidade microbiana à composição do hidrolisado, bem como estudar alternativas para esse resíduo.

Avaliar a produção de biogás e metabólitos solúveis em reator anaeróbio contínuo a partir de BM e de levedura excedente da etapa de fermentação. Dessa forma, será possível investigar parâmetros operacionais do reator, além da influência do acréscimo de outros resíduos gerados pela fabricação da cerveja na obtenção de metano e de produtos de valor biotecnológico.

Realizar balanço energético e estudo de viabilidade econômica para a aplicação dos pré-tratamentos em BM visando à utilização da energia gerada para o abastecimento de máquinas térmicas em uma cervejaria.



## REFERÊNCIAS

- A cerveja no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo, 2018, 5 p. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/view>>.
- ADORNO, M.A.T.; MIRANDOLA, C.A.S.; PIMENTA, D.F.N.; TOMITA, I.N. Development and validation of a method (GC/TCD) to determine N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S in biogas. *In: XI Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion*, 2014. Palacio de Convenciones de La Habana. *Resumos...Cuba: Comité Organizador*. p. 1972,2014.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v.55, p.309-318, 2002.
- AHMAD, F; SAKAMOTO, I.K.; ADORNO, M.A.T.; MOTTERAN, F.; SILVA, E.L.; VARESCHE.; M.B.A. Methane production from hydrogen peroxide assisted hydrothermal pretreatment of solid fraction sugarcane bagasse. *Waste and Biomass Valorization*,v.1, p.1-20, 2018.
- AHMAD, F; SILVA, E.L.; VARESCHE.; M.B.A. Hydrothermal processing of biomass for anaerobic digestion- A review. *Renewable Sustainable & Energy Reviews*,v.98, p.108-124, 2018.
- AHMAD, F. Produção de metano em resposta ao pré-tratamento hidrotérmico com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio do bagaço de cana-de- açúcar. 2017.195 f. Programa de Pós-graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- AHRING, B.K. Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment . *Bioresource Technology*, v. 175, p. 182188, 2015. ISSN 0960-8524.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4.851-4.861, 2010.
- American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation (APHA/AWWA/WEF), 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington.

- ANGELIDAKI, I., SANDERS, W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Environmental Science and Biotechnology*. v. 3, p.117, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>.
- ATLAS, R.M. Handbook of Media for Environmental Microbiology, 2005. BALK, M. et al. (Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 88, n.2., p.595-603., 2010.
- BAËTA, B. E.L.; CORDEIRO, P.H.M.; PASSOS, F.; GURGEL, L.V.A.; AQUINO, S.F.; POLANCO, F.F. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. *Biotechnology Resource*, v. 245, p.66-72, 2017.
- BARAKAT, A.; MONLAU, F.; STEYER J-P.; CARRERE, H. Effect of lignin derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource Technology* .p.104:90–9, 2012.
- BAUER, A.; BOSCH, P.; FRIEDL, A. AMON, T. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of Biotechnology*, v. 142, p 50-55, 2009.
- BITTON, G. Wastewater microbiology. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 478 f.
- BENBELKACEM, H. et al. Effect of leachate injection modes on municipal solid waste degradation in anaerobic bioreactor. *Bioresource Technology*, v.101, p. 5206–5212, 2010.
- BOCHMANN, G.; DROSG, B.; FUCHS, W. Anaerobic digestion of thermal Brewer's spent grains. *Environmental & Sustainable Energy*, v.34, n6, p. 1092-1096, 2015.
- BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; TOQUERO, C.. MARTÍN-JUÁREZ, J.; TRAVANI, R. GÁRCIA-ENCINA, P.; A. Effect of thermal acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresour Technology*, v. 201, p. 182–190, 2016.
- BOUGRIER, C.; DOGNIN D.; LAROCHE, C.; GONZALEZ, V.; BENALI-RACLOT, D.; CACHO RIVERO, J.A. Anaerobic digestion of Brewery Spent Grains: Trace elements addition requirement. *Bioresource Technology*, v.247, p.1193-1196, 2018.
- CAPORASO, J.G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, v. 7, p. 335-336, 2010.
- CAPORASO, J.G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, v.6, 1621-1624, 2012.
- CARRERE, H.; ANTONOPOULOU, G.; AFFES, R.; PASSOS, F.; BATTIMELLI, A.; LYBERATOS, G.; FERRER, I. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: from lab-scale research to full-scale application. *Bioresource. Technology*, v.199, p. 386–397., 2016.

- CATER, M.; FANEDL, L.; MALOVRH, S.; LOGAR, R.M. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Biosource Technology*, v. 186, p 261-269, 2015.
- CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J.A. Effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of cereal science*, v. 44, p 203-211, 2006.
- CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. *Applied Energy*, v.94, p.129-140, 2012.
- CORDEIRO, L.G. Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte e oriundos de cervejarias para fins energéticos. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal da Paraíba, 2011.
- COSTA, A.G.; PINHEIRO, G.C.; PINHEIRO, F.G.C; SANTOS, A.B.D; SANTAELLA, S.T.; LAITAO, R.C. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*. 2014; 248:363372. 2014.
- CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*, v.37, p.937-941, 2002.
- DE CAPRARIIS, B.; DE FILIPPIS, P.; PETRULLO, A.; SCARSELLA, M. Hydrothermal liquefaction of biomass: influence of temperature and biomass composition on the bio-oil production. *Fuel*, v.208, p.618 - 625, 2017.
- DE LA RUBIA, M.A.; FERNANDÉZ-CÉGRI, V.; RAPOSO, F.; BORJA, R. Influence of particles size and chemical composition on the performance and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode. *Biochemical Engineering Journal* v. 58, p 162-167, 2011.
- DE MORI, C.; MINELLA, E. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 28 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 139). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do139.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139.htm)
- DESVAUX, M.; GUEDON, E.; PETITDEMANGE, H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p. 2461-2470, 2000.
- DESVAUX, M. *Clostridium cellulolyticum*: model organismo of mesophilic cellulolyticum growing in batch culture on defined medium. *Applied Environmental Microbiology*, v.66, p.2461-2470, 2005.
- DRAGONE, S.I.M. Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos. Tese (doutorado). 2007. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena. 2007.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956. ISSN 0003-2700. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>>.

- DUBOUGUIER, H. C.; BUISSON, M. N.; TISSIER, J. P.; PRENSIER, G.; ALBAGNAC G. Structural characteristics and metabolic activities of granular anaerobic sludge on a mixed defined substrate. In: Granular anaerobic sludge, Microbiology and technology, Proceedings of the GASTMAT- workshop. Pudoc, Netherlands 78-86.
- DRAPCHO, C. M.; NHUAN, P. N.; WALKER, H. T. Biofuels engineering process technology. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.
- EZEONU, F. C.; OKAKA, N. C. Process kinetics and digestion efficiency of anaerobic batch fermentation of brewer's spent grains (BSG). Process Biochemistry, v.31, n.1, p.7-12, 1996.
- FANG, H. H. P.; LIANG, D. W.; ZHANG, T.; LIU, Y. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. Water Research, v.40, p.427-434, 2006.
- FERNÁNDEZ, J. PÉREZ, M. ROMERO, L. I. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Bioresource Technology, v.99, p. 6075-6080, 2008.
- FERNANDEZ- CEGRI, V.; DE LA RUBIA, M. A.; RAPOSO, F.; BORJA R. Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition. Bioresource Technology, v.123, p. 424-429, 2012.
- FERREIRA, L. C.; NILSEN, P. J.; POLANCO-FDZ, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Biomethane potential of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolysis. Chemical Engineering Journal, v.242, p 254-259, 2014.
- FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. Journal of Cleaner Production, v. 14, n. 5, p.463-471, 2006.
- FANG, H. H. P.; LIANG, D. W.; ZHANG, T.; LIU, Y. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. Water Research, v.40, p.427-434, 2006.
- FORESTI, E. et al. Fundamentos do tratamento anaeróbico. In: CAMPOS, R. (coord.) Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: PROSAB. Cap. 2, p. 29 – 52, 1999.
- FORSSELL, P.; KONTKANEN, H.; SHOLS, H. A.; HINZ, S.; EIJSIN, V. G. H.; TREIMO, J.; ROBERTSON, J. A.; WALDRON, K. W.; FAULDS, C. B.; BUCHERT, J. Hydrolysis of brewers' spent grain by carbohydrate degrading enzymes. J. Inst. Brew. 114, p. 306-314., 2008.
- GALINSKY, C.; MARTIN, N.; WORELL, E.; LEHMAN, B. Energy Efficiency Improvement and Cost Saving Opportunities in Breweries. An Energy Star Guide for Energy and Plant Managers, Ernest Orlando Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley CA, 2003.

- GARIA-GEN, S.; RODRÍGUEZ, J.; LEMA, J.M. Optimisation of substrate blends in anaerobic co-digestion using adaptive linear programming. *Bioresource Technology*, v.173, p.159-167, 2014.
- GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, CJ.; Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh-und Werkstoff*,1999.
- GARROTE, G.; FALQUÉ,E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts. *Bioresource Technology*. v 98, 2007.
- GHOSH, P.; GHOSE, T. K. Em *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*; Scheper, T., ed.; Springer: New York, v. 85, 2003.
- GIAJ-LEVRA,L.A. Estudo de metodologia de contagem para bactérias anaeróbias celulolíticas.1991. 140 F. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,1991.
- GIROLAMO, G.D.; GRIGATTI, M.; BARBANTI, L. ANGELIDAKI, I. Effects of hydrothermal pre-treatment on Giant reed (*Arundo donax*) methane yield. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 152- 159, 2013.
- GOBERNA, M.; CAMACHO, M.M.; LOPEZ-ABADIA, J.A. GARCIA, C. Co-digestion, biostimulation and bioaugmentation to enhance methanation of brewer's spent grain. *Waste Management Resources*, v. 8, p. 805-810, 2013.
- GRIFFITHS,R.I. et al. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA-and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*,v.66,n.12,p.5488-5491,2000. Disponível em: <[http:// aem.asm.org/content/66/12/5488.abstract](http://aem.asm.org/content/66/12/5488.abstract) >.
- GULLÓN, P.; ROMANI,A.; VILA,C.; GARROTE,G.;PARAJÓ, J.C. Potential of hydrothermal treatments in lignocellulose biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.2012;6(2):219–32.2012.
- HABIBA, L.; HASSIB B.; MOKTAR, H. Improvement of activated sludge stabilisation and filterability during anaerobic digestion by fruit and vegetable waste addition. *Bioresource Techonology*, v.100, p. 1.555-1.560,2009.
- HASSONA, H.Z. High fibre bread containing brewer's spent grains and its effect on lipid metabolism in rats. *Die Nahrung*, v. 37, p. 576–582,1993.
- HARUTA, S. et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 4–5, p. 529–534, 2002.
- HARUTA, S. et al. Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 4–5, p. 529–534, 2002.

- HAY, J.X.W.; WU, T.Y.; JUAN, J.C.; JAHIM, J. M. Effect of adding brewery wastewater to pulp and paper mill effluent to enhance the photofermentation process: wastewater characteristics, biohydrogen production, overall performance and kinetic modeling. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, p. 10354–10363, 2017.
- HEIDER, J.; FUCHS, G. Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*. Vol. 3, p.1-22, 1997.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 10-18, 2009.
- HERNANDEZ, J.E.; EDYVEAN, R.G.J. Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials*, v. 160, p.20-28, 2008.
- JAIN, S; WOLF, I.T.; LEE, J.; TONG Y.W. A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v, 52, p.142–154.
- JATUNARACHCHI, T.S.S; SENARATNE,A.U.; & DE ALWIS. Study of anaerobic digestion of brewery spent grains. *International Energy Journal*, v.7, n.4, 279-287,2006.
- JAY, A.J.;PARKER,M.L.;FAULKS,R.; HUSBAND,F.;WILDE,P;SMITH,A.C; CRAIG,B.;WALDRON,K.W. A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, v.47,p.357-364,2008.
- JÖNSSON,L.J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. v. 199, p. 103–112,2016.
- KABEL, M.A.; CARVALHEIRO,F.; GARROTE, G.; AVGERINOS,E. KOUKIOS,E.;PARAJO,J.C.; SCHOLS,H.A.; VORAGEN, A.G.J. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p.47–56,2002.
- KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K., ARAKI, Y., 2001. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v.59, p. 59–62,2001.
- KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; THOMSEN A.B.; KONGJAN P., ANGELIDAKI, I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2009;100(9):2562–8,2009.
- KAUR, V.I., SAXENA, P.K. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. *Bioresource Technology*, v. 91, p.101–104,2004.

- KUDO, Y. et al. Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, n.1, p.39-48, 1997. ISSN 1574-6941. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00354.x>>.
- KAYHANIAN, M.; RICH, D. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrients requirements. *Biomass and Bioenergy*, v.8, n. 6, p. 433-444, 1995.
- KHANAL, S.N. *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Iowa: Wiley-Blackwell, 301 f., 2008.
- KIRIN HOLDINGS. *Global Beer Production by Country in 2017*. Kirin Beer University Report.
- KOBAYASHI, F.; HARUMI, T.; CHIKAKO A.; YOSHITOSHI, N. Methane production from steam exploded bamboo. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97(6):426428, 2004.
- KUMAR, G.; LIN, C.Y. Bioconversion of de-oiled *Jatropha* Waste (DJW) to hydrogen and methane gas by anaerobic fermentation : Influence of substrate concentration, temperature and pH. *Hydrogen Energy*, v. 38, p. 63-72, 2013.
- KTENIOUDAKI, A.; CROFTON, E.; SCANNELL, A. G.M.; HANNON, J.A.; KILCAWLEY, K.N.; GALLAGHER, E. Sensory properties and aromatic composition of baked snacks containing brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science*, v. 57(3), p. 384–390, 2013.
- KTENIOUDAKI, A.; ALVAREZ-JUBETE, L.; SMYTH, T.J.; KILCAWLEY, K.; RAI, D.; GALLAGHER, E. Application of bioprocessing techniques (sourdough fermentation and technological aids) for brewer's spent grain breads. *Food Research International*, v. 73, p. 107-116, 2015.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J., ANTAL, M.J. LYND, L.R. 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.
- LEI, H.; CYBULSKA, I.; JULSON, J. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass and Kinetics. p.250-259. doi : 10.1002/bit.1118.
- LETTINGA, G., in *Anaerobic Reactor Technology*, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, p. 88–95, 1982.
- LETTINGA, G.; HULSHOF, P. L. W.; ZEEMAN, G. Biological wastewater treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment. *Lecture Notes*. Wageningen Agricultural University, 1996.
- LEVIN, D.B. CARERE, C.R. CICEK, N., SPARLING, R. 2009. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulosic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p.7390-7403, 2009.

- LIANHUA,L.; DONG, L.; YONGMING,S.; LONGLONG,M.; ZHENHONG,Y.; XIAOYING, K. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *Hydrogen Energy*, v.35, p. 7261-7266, 2010.
- LIU, C.; CHARLES, E.W. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. p. 78–85, 2005.
- LUFT, L. Hidrólise enzimática do bagaço de malte usando tecnologias alternativas visando à obtenção de açúcares fermentescíveis. 2016. 133 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.
- MACLEOD, A.M. The physiology of malting. *Brewing Science*, vol. 1. Academic Press, New York, v. 1, p. 145–232,1979.
- MALAKHOVA,D.V.; EGOROVA, M.A.; LJUBA, I.P.; NETRUSOV, A.I.; TSAVKELOVA, E.A. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 31, p.515-523,2015.
- MANTINGUIER, S.I.; SAKAMOTO, I. K.; DUARTE, I.C.S.; SILVA, E.L.;MACIEL, C.D.; VARESCHE, M.B.A. Degradação anaeróbia de fenol em reatores em batelada sob condições fermentativas. *Tech-Lógica*, v.12, p.47-55, 2008.
- MARTIN, M.; PARSAPOUR, A. Upcycling wastes with biogas production: An energy and economic analysis. In: Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice, Italy, p. 12–15 November, 2012.
- MATHIAS, T.R.S.; ALEXANDRE, V.M.F.; CAMMAROTA, M.C.; DE MELLO, P.P.M.; SÉRVULO, E.F.C. Characterization and determination of brewer's solid wastes compostion. *Journal of The Institute of Brewing*, v.121, p.400-404., 2015.
- MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Conversion of hemicellulose hydrolyzatesto ethanol.Washington: American Chemical Society Symposium; p. 292–324.
- MENESES, N.G.T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATO, S.I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation Purification Technology*, v. 108, p. 152-158, 2013.
- MONLAU, F., SAMBUSTI,C., BARAKAT, A., QUÉMÉNEUR, M., TRABLY.E., STEYER, J.P., CARRÉRE,H. Do furanic and fenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed culture? A comprehensive review. *Biotechnonology Advances*, v. 32, p. 934-951,2014.
- MONTOYA, A.C.V; VARESCHE,M.B.A. Produção de hidrogênio a partir de resíduos do processamento de café bruto e pré-tratados em reator hidrotérmico. *In: Seminário do Projeto Temático,1,2017, São Carlos. Anais...São Carlos,2017.*



- MOSEY, F.E. Mathematical modeling of the anaerobic process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology*, v.15, p.209-232,1983.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.
- MUSSATO, S.I; DRAGONE,G.;ROBERTO,I.C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of Food and Agriculture*, v.85,n.14,p.2453-2460, 2005.
- MUSSATO, S.I; DRAGONE,G.;ROBERTO,I.C. Brewer's spent grain: Generation, characteristics and potencial applications. *Journal of Cereal Science*,v.43,n.1.p.1-14,2006.
- MUSSATO, S.I.; FERNANDES,M., MILAGRES,A.M.F., ROBERTO,I.C. Effect of hemicellulose and lignina on enzymatic hydrolysis of celulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Techonology*, v.43, n2, p.124-129,2008.
- MUSSATO, S.I Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.94, n.7,p. 1264-1275,2014.
- NANDI, R.; SENGUPTA, S. Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 24, p. 61–84, 1998.
- NIELSEN,J.; VILLADSEN,J.; LIDEN,G. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer, 2011. ISBN 978-1-4419-9688-6.
- NIETO, P. P.; HIDALGO, D.; IRUSTA, R.; KRAUT, D. Biochemical methane potential (BMP) of agro-food wastes from the Cider Region (Spain). *Water Science Technology*, v. 66 (9), 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2012.372>
- NITSOS, C.K.; MATIS K.A., TRIANTAFYLLIDIS, K.S. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *Chemsuschem*. v. 6, p 110–122.2013.
- NOGUEIRA, J.B. *Mecânica dos Solos- Ensaio de laboratório*. Apostila do Departamento de Geotecnia da EESC-USP, São Carlos, 1995.
- NOIKE,T.; NIIGATA, E. Micromolecularization of undegradable organic substances in methane fermentation. In: *Development of the Waste Treatment System for Recycling Society*. Waste Research Foundation, 2002. Tokyo.
- OGEDA,T.L. ; PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova*, v.33, n.7, 2010.
- OLIVEIRA, J.V.; ALVES, M.M.; COSTA, J.C. Biochemical methane potencial of Brewery by-products. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 20, p. 435-440, 2018.

- PAGLIACCIA, P.; GALLIPOLI, A.; GIANICO, A.; GIRONI, F.; MONTECCHIO, D.; PASTORE, C.; DI BITONTO, L.; BRAGUGLIA, M. Variability of food waste chemical composition: impact of thermal pre-treatment on lignocellulosic matrix and anaerobic biodegradability. *Journal of Environmental Management*, v. 236, p.100-107, 2019.
- PALMOWSKI, L.M. MULLER, J.A. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, v. 41, p. 155-162, 2000.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism inhibitors of pretreated soft wood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121/124, p.1069-1079, 2005.
- PANAGIOTOPOULOUS, I.A., BAKKER, R.R., VRIJE, T.D. KOUKIOS, E.G. 2011. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 11204-11211.
- PANJIČKO, M.; ZUPANČIČ, G.D.; ZELIČ, B. Anaerobic biodegradation of raw and pre-treated brewery spent grain utilizing solid state anaerobic digestion. *Acta Chimica Slovenica*, v 62, n.4, p.818-827, 2015.
- PIERRE, G.; SANNIER, F.; GOUDE, R.; NOUVIAIRE, A.; MAACHE-REZZOUG, Z.; REZZOUG, S.A.; MAUGARD, T. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, v.54, n3, p.303-310, 2011.
- PÉREZ, J.A.; DORADO, J.M.; RUBIA, T.D.; MARTINEZ, J. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n.10, p.929-938, 2007.
- RABELO, C.A.B.S.; SOARES, L.A.; SAKAMOTO, I.K.; SILVA, E.L.; VARESCHE, M.B.A. Optimization of hydrogen and organic acids productions with autochthonous and allochthonous bacteria from sugarcane bagasse in batch reactors. *Journal of Environmental Management*, v. 223, p. 952-963, 2018.
- RAJPUT, A.A.; ZESHAN; VISVANATHAN, C. Effect of thermal pretreatment on chemical composition, physical structure and biogas production kinetics of wheat straw. *Journal of Environmental Management*, v. 221, p. 45-52, 2018.
- RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H.R.; MEYER, A.S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: Sugar reaction mechanisms. *Carbohydrate Research*.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 199, p.92-102., 2016 c.

- RAVINDRAN, R.; JAISWAL,S.; ABU-GHANNAM,N.; JAISWAL, A.K. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewer's spent grain. *Bioresource Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>. 2017.
- REN, H.; MEI, Z.; FAN, W.;WANG, Y.; LIU, F.; LUO, F.; LI, D.;LI,Z.; FENG,R. Effects of temperature on the pretreatments of anaerobic co-digestion of vegetable waste and swine manure. *Internacional Journal of Agriculture & Biology Energy*,v.11,2018.
- REINOLD, M.R. *Manual Prático de Cervejaria*, 1. ed. São Paulo: ADEN Editora e Comunicações,1997.
- RIEKER,C.; MOELLER M.; SOMMER, K. C. Rieker, M. Moeller, K. Sommer, Anaerobic degradation of beer spent grains for biogas production. *Brauwelt*132, 16–17, p. 716–721, 1992.
- ROBERTSON, J.A.; IÁSSON, K.J.A.; TREIMO, J.; FAULDS, C.B.; BROCKLEHURST, T.F.; EIJSINK, V.G.H.; WALDRON, K.W. Profiling brewer's spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT-Food Science and Technology*, v.43, p. 860-896.
- ROCHA, G.J.; NASCIMENTO,V.M.; ROSELL, C.E.V. Caracterização Físico-química do Bagaço de Cana-de-Açúcar, Memorando técnico, Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Campinas, 2014.
- ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; NAKANISHI, S.C.; NASCIMENTO, V.M.; SILVA, V.F.N. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* v 74, p. 810–816, 2015.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos*. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor, 3 ed,358 p.
- RUIZ, H.A., ROCDRIGUEZ-JASSO, R.M., FERNANDES, B.D., VICENTE, A.A., TEIXEIRA, J.A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable Sustainable Energy*, v. 21, p. 35–51, 2013.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 185–194, 2009.
- SANTIAGO, B.L.S. Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a bioconversão das frações açucaradas em etanol. Dissertação (mestrado). 2013.110 f. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

- SANTOS, M. S.; Ribeiro F. M. Cervejas e refrigerantes. São Paulo : CETESB, p. 58 (Série P + L). 2005.
- SAXENA, A., GARG, S.K., VERMA, J. Simultaneous saccharification and fermentation of waste newspaper to ethanol. *Bioresource Technology*, v.42, p. 13-15, 1992.
- SCHINK, B.; PHILIPP, J. M. Anaerobic degradation of phenolic compounds, *Naturwissenschaften*, v. 87, p. 12–23, 2000.
- SCHNURER, A; JARVIS A. Microbiological handbook for biogas plants. Estocolmo, Suécia: Swedish waste management. Swedish Gas Centre, p.119, 2009.
- SEADI, T. A. Biogas handbook. Esbjerg, Dinamarca: University of Southern Denmark Esbjerg, p.126 ,2008.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure*, p.1-9 ,2008.
- SLUITER, A. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure*, v. 20, n.11, p. 1-14, 2004.
- SOARES, L.A.; KAWANISHI, J.B.; MOTTERAN, F.; SAKAMOTO, I. K.; MONTEIRO, P.A.S.; SELEGHIM, P.; VARESCHE, M.B.A. Bioconversion of Sugarcane Bagasse into Value-Added Products by Bioaugmentation of Endogenous Cellulolytic and Fermentative Communities. *Waste and Biomass Valorization*, v.1, p. 1-14, 2018.
- SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, Tennessee: Archae Press, 1996.
- STURM, B.; BUTCHER, M.; WANG Y.; HUANG Y.; ROSKILLY, T. The feasibility of the sustainable energy supply from biowastes for a small scale brewery - a case study. *Applied Thermal Engineering*, v.39, p.45–52, 2012.
- TAMPIO, E.; ERVASTI, S. PAAVOLA, T.; HEAVEN, S.; BANKS, C. RINTALA, J. Anaerobic digestion of autoclaved and untreated food waste. *Waste Management*. v.34, p.370-377, 2014.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v.9, p. 1621-1651, 2008.
- TIAN, H.; DUAN, N.; LIN, C.; LI, X.; ZHONG, M. Anaerobic co-digestion of kitchen waste and pig manure with different mixing ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.120, p.51-57, 2015.
- TOWNSLEY, P.M. Preparation of commercial products from brewer's waste grain and trub. *MBAA Technical Quarterly* 16, 130–134. 1979.

- TSAPEKOS, P.; KOUGIAS, P.G.; EGELUND, H.; LARSEN, U.; PEDERSEN, J.; TRÉNEL, P.; ANGELIDAKI, I. Mechanical pretreatment at harvesting increases the bioenergy output from marginal land grasses. *Renew Energy*, v.111, p. 914- 921, 2017a.
- TSAPEKOS, P.; KOUGIAS, P.G.; ANGELIDAKI, I. Mechanical pretreatment for increased biogas production from lignocellulosic biomass: predicting the methane yield from structural plant components. *Waste Management*, v.78, p. 903-910, 2018.
- TSCHOPE, E.C. *Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia*, 1. ed. São Paulo: Aden Editora e Comunicações Ltda, p.223 , 2001.
- VELUCHAMY,C.; KALAMDHAD, A.S. Enhanced methane production and its kinetics model thermally pretreated lignocellulosic waste material. *Bioresource Technology*,v.241,p.1-9,2017.
- VITANZA, R. CORTESI,A., GALLO, I.; COLUSSI, I.; ARANA-SARABIA, M.E. Biovalorization of brewery waste by applying anaerobic digestion. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v.30, p. 351-357, 2016.
- WANG, Y. et al. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, v.33, p. 848-853, 2009.
- WANG; B. STROMBERG, S. LI, C. NGES, I.A. NISTOR, M. DENG, L. LIU, J. Effects of substrate concentration on methane potential and degradation kinetics in batch anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v.194, p.240-246, 2015.
- WANG, D.; AI,J.; SHEN,F.;YANG,G. ZHANG, Y.;DENG,S.; ZHANG,J.; ZENG,Y.; SONG,C. Improving anaerobic digestion of easy-acidification substrates by promoting buffering capacity using biochar derived from vermicompost. *Bioresource Technology*, v.222, p. 286-296, 2017a.
- WANG, M. ZHANG, Y.; YAN,S.; YI,B.; NIU,W.;YUAN,Q. Enhanced biogas yield of Chinese herbal medicine extraction residue by hydrothermal pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 12, p. 4627-4638, 2017 b.
- WANG, D. SHEN, F.; YANG, G. ZHANG, Y.;DENG, S.; ZHANG, J.; ZENG, Y.; LUO,T.; MEI, Z. Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomass? *Bioresource Technology*, v. 249, p. 117-124, 2018.
- WATERS, D.M.; JACOB, F.; TITZE,J.; ARENDT, E.; ZANINI, E. Fibre, protein, and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *European Food Research Technology*, v.235, p. 767-778, 2012.
- WILKINSON, S.SMART, K.A.;COOK, .J. Optimization of alkaline reagent based chemical pre-treatment of Brewer's spent grains for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*.v.62, p.219-227,2014.

- WILSON & WALKER. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7. ed. New Yourk: Cambridge Univesity Press. 2010, 744 f.
- WIJEKOON, K. C.; VISVANATHAN,C.; ABEYNAYAKA,A. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of two-stage thermoffilic anaerobic membrane reactor. *Bioresource Techonology*, v.102,n.9, p.5353-5360,2001.
- WYMAN, C. E.; DECER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Em Polysaccharides: Strutral Diversity and Functional Versatility; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, 2005, cap. 43.
- YADVIKA et al. Enhacement of biogas production from solid substrates using different techniques: a review. *Bioresource Technology*, v.95, p. 1-10, 2004.
- YAN, Z., SONG, Z., LI, D., YUAN, Y. LIU, X., ZHENG, T. The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. *Bioresource Techonology*, v. 177, p.266-273, 2015.
- XIROS,C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS,P.; CHRISTAKOPOULOS, C. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*v.99,p. 5427–5435, 2008.
- ZAMANZADEH, M.;HAGEN, L.H.; SVENSSON, K.; LINJORFET, R.; HORN,S.J. Anaerobic digestion of food waste – Effect of recirculation and temperature performance and microbiology. *Water Resource*, v. 96 p.246-254, 2016.
- ZINDER, S.H. et al. Methanogenesis in a Thermophilic (58°C) Anaerobic Digestor: *Methanotherix* sp. as an Important Aceticlastic Methanogen. *Applied and Enviromental Microbiology*, v.47,n.4,p.796-807,1984. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/47/4/796.abstract>.>
- ZUPANČIČ, G.D.; ŠRJANEC,I.; MARINŠEK,R. *Bioresource Technology*, v. 124, p.328–337,2012.