



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* ERECHIM**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

BRUNO VENTURIN

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE CAULE DE
MILHO VISANDO SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

ERECHIM, RS
2018

BRUNO VENTURIN

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE CAULE DE
MILHO VISANDO SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Helen Treichel e do Prof^o. Dr. Airton Kunz.

ERECHIM, RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia ERS 135, km 72, n° 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal

764 Erechim -

RS Brasil

VENTURIN, BRUNO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS SOBRE CAULE
DE MILHO VISANDO SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS/
BRUNO VENTURIN. -- 2018.

53 f.:il.

Orientadora: HELEN TREICHEL.

Co-orientador: AIRTON KUNZ.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em
Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA, , 2018.

1. Caule de milho. 2. Pré-tratamento de
lignocelulósico. 3. Co-digestão com dejetos suínos. 4.
Biogás. I. TREICHEL, HELEN, orient. II. KUNZ, AIRTON,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

À Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel e ao Prof^º. Dr. Airton Kunz, meus orientadores, por todo aprendizado, incentivo, dedicação, pela valiosa orientação durante o mestrado, e por todas as oportunidades que pude vivenciar na pesquisa ao longo de vários anos. Em especial a Prof^ª. Dr^ª. Helen Treichel que me conduziu a mais de 5 anos na vida acadêmica.

À minha mãe que sempre me incentivou e cobrou o melhor de mim. Sem ela nada disso seria possível.

À Flávia, meu amor, por me aturar, apoiar, escutar as reclamações, nos momentos de frustração e sempre me alegrar.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) pela oportunidade de cursar o Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA).

Aos meus amigos e ex-colegas de graduação Jéssica e Rueliton, pela ajuda mútua ao longo do mestrado. As minhas amigas e colegas de laboratório, Thamarys, Charline, Simone, Frumi, Tati, Duda e Karina. Muito obrigado pela ajuda e pelas risadas. Este trabalho deve muito a todas vocês.

Aos técnicos de laboratório da UFFS - *campus* Erechim que não mediram esforços para proporcionar as melhores condições de trabalho possíveis. Auxiliando na realização das análises muitas vezes em horários alternativos. Muito obrigado, Suzana, Diego, Isabeli, Ângela e Flávia.

À Embrapa – Suínos e Aves, pela estrutura disponibilizada para a realização de parte deste trabalho. A todos os funcionários do Laboratório de Estudos e Análises Ambientais (LEAA) em especial ao Ricardo e a Fabiane. E aos colegas da Embrapa, Angélica, Camila, Santiago e Deise que me acolheram de forma espetacular.

À todas as pessoas, que de uma forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho de dissertação.

“Nós somos feitos de poeira das estrelas.”

Carl Edward Sagan

RESUMO

A necessidade de fontes energéticas renováveis é evidente nos dias de hoje, visto que os combustíveis derivados do petróleo são fontes esgotáveis. A biomassa lignocelulósica é uma fonte promissora de energia, pois possui alto teor de celulose, a qual pode ser convertida a biogás. Atualmente, a produção de biogás está associada ao tratamento de um dos grandes problemas da suinocultura no Brasil, o gerenciamento da elevada concentração de efluente gerado pelos sistemas de produção de animais confinados. Neste trabalho, primeiramente avaliou-se diferentes tipos de pré-tratamentos sobre uma matéria prima lignocelulósica, o caule de milho (*Zea mays*), utilizando metodologia de planejamento de experimentos e posteriormente investigou-se o potencial de produção de biogás através da co-digestão com dejetos suínos. O pré-tratamento com H_2SO_4 teve uma remoção significativa da fração de hemicelulose usando baixas concentrações de ácido ($0,75\% v.v^{-1}$). Porém, por também aumentar a fração de lignina na biomassa, esta técnica não é adequada para posterior produção de biogás, pois acaba inibindo o processo de co-digestão. Já o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino (pH 11,5) conseguiu um aumento da fração de celulose de 73,4% e uma redução de 71,6% no teor de lignina. Utilizando $12\% (v.v^{-1})$ de H_2O_2 , $58\text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura do agitador orbital, agitação de 130 rpm e concentração de sólidos de 3% (3 g de massa seca em 100 mL de solução) por 58 min. Este pré-tratamento é recomendado para produção de biogás, pois conseguiu-se aumentar o volume final de biogás em 22%, bem como reduzir em um terço o tempo de digestão, em comparação com a biomassa não tratada. Não houve diferença significativa entre a utilização do material contendo todos os tamanhos de partículas e o material com apenas o tamanho de partícula mais abundante ($0,890\text{ mm}$). O sistema de ultrassom com potência máxima de irradiação de 132 W, não é indicado para realização de pré-tratamentos, pois não promove alterações na composição estrutural do caule de milho. Ao final deste estudo obteve-se uma alternativa promissora para que os carboidratos presentes nesta biomassa estivessem mais acessíveis para a digestão anaeróbia e como consequência o aumento da produção de biogás.

Palavras-Chave: caule de milho; pré-tratamento de lignocelulósico; co-digestão com dejetos suínos; biogás.

ABSTRACT

The need for renewable energy sources is evident today since oil-derived fuels are depleting sources. Lignocellulosic biomass is a promising energy source because it has a high content of cellulose, which can be converted to biogas. Currently, biogas production is associated with the treatment of one of the greatest swine problems in Brazil, the management of the high effluent load generated by the confined animal production systems. In this work, different types of pre-treatments of a lignocellulosic raw material, the corn stalk (*Zea mays*), were investigated using experimental design methodology, as well as the potential of biogas production through co-digestion with swine waste. Pretreatment with H₂SO₄ showed a significant removal of the hemicellulose fraction using low acid concentrations (0.75%). However, because it also increased the lignin fraction in the biomass, this technique is not suitable for the subsequent production of biogas, since it ends up inhibiting the co-digestion process. On the other hand, pretreatment with alkaline H₂O₂ (pH 11.5) achieved an increase in the cellulose fraction of 73.4% and a reduction of 71.6% in lignin content using 12% (v.v⁻¹) of H₂O₂, 58 °C of orbital agitator temperature, 130.0 rpm stirring and 3.0% of solids content (3 g of dry mass at 100 mL of solution) for 58.0 min. This pretreatment is recommended for biogas production as it provided a 22% increase in the final volume of biogas and a one-third reduction in the digestion time in comparison to the untreated biomass. There was no significant difference between the use of the material containing all particle sizes and the material with only the most abundant particle size (0.890 mm). The ultrasound system with maximum irradiation power of 132 W is not indicated for lignocellulosic pre-treatments as it does not promote changes in the structural composition of the corn stalk. At the end of this study, a promising alternative was obtained in order to make the carbohydrates present in the corn stalk more accessible for the anaerobic digestion and, as a consequence, to increase the biogas production.

Keywords: corn stalk; lignocellulosic pretreatment; co-digestion with swine waste; biogas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Distribuição granulométrica do caule de milho triturado após peneiramento. 10
- Figura 2** Porcentagem de celulose (A), hemicelulose (B) e lignina (C) presente na biomassa após o pré-tratamento ácido..... 16
- Figura 3** Gráfico de pareto para o efeito das variáveis estudadas sobre o teor de celulose presente na biomassa após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. 21
- Figura 4** Espectros de infravermelho utilizando transformada de Fourier da biomassa não tratada e pré-tratada com H_2SO_4 e H_2O_2 26
- Figura 5** Produção acumulada de biogás por quilograma de sólido volátil adicionado, comparação entre o caule triturado não tratado (não peneirado e peneirado) e após pré-tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio alcalino (H_2O_2). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição estrutural do caule de milho triturado não tratado.	11
Tabela 2 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em autoclave na presença de H ₂ SO ₄ , valores codificados e reais das variáveis.	13
Tabela 3 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em agitador orbital na presença de H ₂ O ₂ , valores codificados e reais das variáveis.	18
Tabela 4 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em sistema de ultrassom, valores codificados e reais das variáveis.	22
Tabela 5 Composição estrutural da biomassa depois de diferentes pré-tratamentos, peneirada e não peneirada.	24
Tabela 6 Comprimentos de onda que correspondem a determinado grupo funcional e respondem a espectroscopia de infravermelho e seus respectivos valores relativos para os dois pré-tratamento estudados*.	27
Tabela 7 Caracterização dos substratos e inóculo, média do potencial bioquímico de biogás (PBB) e concentração de CH ₄ , CO ₂ e H ₂ S das amostras estudadas.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA – Análise de variância
- CL-EM – Cromatografia líquida com espectrômetro de massa
- CMT – Caule de milho triturado
- CMTP – Caule de milho triturado e peneirado
- DAD – Detector de arranjo de diodos
- DCC – Delineamento composto central
- DIR – Detector de índice de refração
- EIV-TF – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- H-AFEX* – Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em autoclave
- HMF – Hidroximetilfurfural
- PBB – Potencial bioquímico de biogás
- PTFE - Politetrafluoretileno
- SF – Sólidos fixos
- SPACs – Sistemas de produção de animais confinados
- ST – Sólidos totais
- SV – Sólidos voláteis
- TRH – Tempo de retenção hidráulica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
2.1 MATÉRIA PRIMA	3
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	3
2.2.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA BIOMASSA	3
2.2.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (EIV-TF)	5
2.3 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	5
2.4 PRÉ-TRATAMENTOS	5
2.4.1 VAPOR ÚMIDO EM AUTOCLAVE NA PRESENÇA DE ÁCIDO SULFÚRICO	6
2.4.2 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO EM AGITADOR ORBITAL.....	7
2.4.3 PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO-SE SISTEMA DE ULTRASSOM.....	7
2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS (PBB)	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA NÃO TRATADA	10
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA PENEIRADA APÓS PRÉ- TRATAMENTO.....	11
3.2.1 PRÉ-TRATAMENTO DE VAPOR ÚMIDO EM AUTOCLAVE COM ÁCIDO SULFÚRICO DILUÍDO	11
3.2.2 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO EM AGITADOR ORBITAL.....	18
3.2.3 PRÉ-TRATAMENTO EM SISTEMA DE ULTRASSOM.....	22
3.3 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA PENEIRADA E NÃO PENEIRADA APÓS OS PRÉ-TRATAMENTOS E CONFIRMAÇÃO EXPERIMENTAL DOS DADOS COLETADOS	23
3.4 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA FIBRA DE CMT	25
3.5 POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS (PBB).....	30
4. CONCLUSÕES.....	36
4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	37

REFERÊNCIAS38

1. INTRODUÇÃO

A questão do desenvolvimento sustentável vem sendo amplamente discutida, tornando assunto de destaque a busca pela ampliação da matriz energética. Torna-se cada vez mais clara a necessidade do uso de biocombustíveis, substituindo a utilização em larga escala das reservas de petróleo. Nesse sentido, os materiais lignocelulósicos, que possuem em sua composição estrutural basicamente celulose, hemicelulose e lignina, apresentam-se como uma alternativa promissora (Dagnino et al., 2013; Lizasoain et al., 2017).

Esse tipo de matéria-prima possui em sua constituição um teor elevado de carboidratos, que se encontram em cadeias poliméricas e podem ser hidrolisados e digeridos. O principal obstáculo para essa conversão é conseguir desmontar a resistente estrutura da biomassa lignocelulósica, liberar os açúcares suscetíveis à co-digestão de forma eficaz e tornar o uso economicamente viável (Paudel et al., 2017; Santos et al., 2012).

A suinocultura brasileira é uma das cadeias de produção de maior expressão na agropecuária brasileira, apresentando grande importância econômica e social. Porém, na busca de maior produtividade, visando redução de custos, tem-se grandes concentrações de animais em pequenas áreas territoriais, caracterizando os sistemas de produção de animais confinados (SPACs) (Miele et al., 2013).

Essa prática gera elevada quantidade de dejetos com alta concentração de nutrientes, tornando-se o grande desafio para manutenção e ampliação desta atividade. A prática comumente adotada pela suinocultura brasileira tem sido a armazenagem desses resíduos em lagoas ou tanques e sua posterior aplicação como fertilizante vegetal e condicionador do solo (Kunz et al., 2009).

Porém, quando a disposição dos efluentes no solo não é possível, em função dos riscos ambientais advindos da sobrecarga de nutrientes e da falta de áreas para dispor a elevada quantidade de dejetos gerados, fica evidente a necessidade de buscar-se alternativas para o tratamento dos mesmos (Seganfredo, 2007).

Dentre as alternativas existentes para o tratamento de efluentes, está a biodigestão, que além de tratar-se o resíduo permite a geração de energia. Poder-se-á obter uma maior quantidade de energia destes resíduos ao adotar-se o processo de digestão anaeróbia

conjunta, a co-digestão. Esse processo consiste na mistura dos dois resíduos agroindustriais, o efluente suíno e materiais lignocelulósicos da cadeia agrícola, de forma a obter um produto final com maior valor agregado (Croce et al., 2016; Dahunsi et al., 2017).

A realização de um pré-tratamento tem papel decisivo na desestruturação da complexa estrutura química que forma os diferentes materiais lignocelulósicos com vistas a facilitação do processo subsequente de hidrólise, uma vez que após tratado, esse material apresentará maior digestibilidade (Dinuccio et al., 2010; Zheng et al., 2014). Existem diversos tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos sendo estudados, que de modo geral, classificam-se em físicos, químicos, biológicos e combinados (Yao et al., 2018).

O pré-tratamento ideal produz um sólido de fácil digestão, não degrada os açúcares, remove significativamente a lignina, não inibe o passo subsequente de digestão. Produz resíduos sem desperdício do material sólido, tem um alto grau de simplicidade e é efetivo (Mosier et al., 2005; Pienkos e Zhang, 2009; Zhao et al., 2018).

A crescente demanda pela produção de combustíveis com elevada eficiência e principalmente que se apresente sustentável, como é o caso do biogás, mostra a real necessidade de aumentar significativamente sua produção (Mancini et al., 2018; Santos et al., 2012).

Neste contexto, objetivou-se avaliar se diferentes tipos de pré-tratamentos afetam a composição estrutural de uma matéria prima lignocelulósica, o caule de milho (*Zea mays*) e investigar o potencial de produção de biogás através da co-digestão com dejetos suíno desta matéria prima pré-tratada.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

O caule de milho foi obtido de uma colheita experimental no *campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Santa Catarina, Brasil no ano de 2016. Realizou-se assepsia do mesmo com posterior secagem e moagem em moinho de facas (SOLAB, SL-31, Brasil). O caule triturado foi peneirado utilizando um conjunto de peneira série Taylor (200 – 4 mesh), a fim de determinar o tamanho de partícula de maior abundância. Esta foi utilizada para o estudo inicial dos pré-tratamentos (Hames et al., 2008). As amostras de caule de milho triturado e peneirado (CMTP) e sem peneiramento (CMT) foram armazenadas em freezer a -4 °C.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

2.2.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ESTRUTURAL DA BIOMASSA

O material não tratado e após cada um dos pré-tratamentos teve sua composição analisada, determinando-se o teor de sólidos fixos, extrativos (não tratado) e compostos estruturais majoritários (celulose, hemicelulose e lignina).

A quantidade de materiais extrativos foi determinado da biomassa não tratada segundo metodologia de Sluiter et al. (2008). Os extraíveis do CMTP e CMT foram extraídos por 6 horas em Soxhlet (MARCONI, Brasil) com água destilada e após por mais 6 horas com etanol 95 % (Vetec, Brasil). Colocou-se 200 mL de cada uma das soluções em cada um dos balões extratores juntamente com pérolas de vidro. Regulou-se a temperatura para um ciclo de 10 sifonações por hora. O processo foi finalizado quando o líquido em torno do cartucho de extração tornava-se incolor, indicando a remoção dos extrativos da biomassa. Ao término da extração, os sólidos foram lavados com 100 mL de etanol, secos a 105 °C até massa constante, determinada em balança analítica.

O teor de sólidos fixos foi determinado após a queima das amostras em uma mufla (JUNG, Brasil) a 800 °C por 20 min e repetidos por mais 15 min, até verificar-se massa constante, determinada em balança analítica (Sluiter et al., 2008).

O teor de celulose, hemicelulose e lignina total foram determinados a partir da hidrólise do material com H₂SO₄ 72% (Sluiter et al., 2012). Cerca de 0,3 g de amostra seca foram tratados com 3 mL de H₂SO₄ 72% (v.v⁻¹) por uma hora a 30 °C em banho termostático (NOVA NI 1281, Brasil). Em seguida o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 250 mL com o auxílio de 84 mL de água. A mistura foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos, resfriada e filtrada em papel filtro, previamente secos a 105 °C e pesados. O material retido foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada e seco até massa constante em estufa a 105 °C. Esse resíduo corresponde à lignina insolúvel em ácido (Klason). O filtrado foi analisado quanto aos teores de carboidratos em um sistema cromatográfico.

A análise cromatográfica para a determinação de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético foi conduzida por cromatografia líquida com espectrômetro de massa (CL-EM) (SHIMADZU, Japão), equipado com detector de índice de refração (DIR-10 A), operado com coluna AMINEX[®] BIORAD HPX87H, utilizando como fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹, modo isocrático, temperatura de 45°C, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 0,6 mL. min⁻¹. As amostras foram devidamente diluídas no eluente e filtradas em filtro de 45 µm de acetato de celulose (Millipore[®]). O eluente foi filtrado a vácuo com membrana de 0,45 µm de politetrafluoretileno (PTFE) (Millipore[®]), e em seguida degaseificado em banho de ultrassom por 15 minutos.

A concentração dos compostos foi determinada por meio de curvas de calibração utilizando-se padrões específicos para CL-EM da marca Sigma-Aldrich (dados não mostrados) (Bazoti et al., 2017).

A quantificação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foi realizada em CL-EM (SHIMADZU, Japão), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), operado com coluna C18 utilizando-se como fase móvel acetonitrila/água 1:8 com adição de 1% de ácido acético (J.T.Barker, Brasil). Temperatura do forno de 30 °C, modo isocrático, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. As amostras foram devidamente diluídas no eluente e filtradas em filtro de seringa de 45 µm de acetato de celulose. O eluente foi filtrado com membrana de 0,45 µm (Millipore[®]) de PTFE, e em seguida degaseificado. A concentração dos compostos foi determinada por meio de curvas de calibração utilizando-se padrões específicos para CL-EM da marca Sigma-Aldrich (dados não mostrados) (Bazoti et al., 2017). O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado

através da leitura em 280 nm de uma diluição 1:100 do hidrolisado, tomando-se como padrão uma absorvidade de 30 L. g⁻¹.cm⁻¹ neste comprimento de onda (Sluiter et al., 2012). O teor lignina foi expresso como a soma das frações insolúveis e solúveis em ácido.

2.2.2 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (EIV-TF)

Para investigar e determinar mudanças químicas no caule de milho, os espectros IV-TF de caule de milho com e sem pré-tratamento, foram obtidos por um espectrômetro de infravermelho (IRTracer-100, SHIMADZU, Japão). As amostras secas foram comprimidas em pastilhas contendo KBr. A proporção em massa de KBr para as amostras foi de 100:1. Os espectros das amostras foram obtidos pela varredura de 4000 a 400 cm⁻¹ com uma resolução espectral de 2 cm⁻¹, sendo a média de 40 varreduras (Zhao et al., 2016). Foram realizadas triplicatas dos experimentos.

2.3 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo dos pré-tratamentos deu-se por meio de planejamento estatístico utilizando delineamento composto central (DCC). O delineamento proposto para o pré-tratamento com H₂SO₄ foi um 2⁴, com pontos axiais, para o pré-tratamento com H₂O₂ o delineamento foi um 2⁵⁻¹ e para o sistema de ultrassom um delineamento 2⁴ (Rodrigues e Iemma, 2014).

A análise estatística das diferentes respostas, obtidas ao longo do estudo, foi feita utilizando-se o software STATISTICA V. 12. O nível de confiança utilizado nos experimentos foi de 95% (p<0,05). Pôde-se realizar análise de variância (ANOVA), de efeitos e teste de comparação de médias (Tukey).

2.4 PRÉ-TRATAMENTOS

Os pré-tratamentos estudados foram vapor úmido em autoclave na presença de ácido sulfúrico (H₂SO₄), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) alcalino em agitador orbital e

sistema de ultrassom. Os pré-tratamentos foram avaliados utilizando-se a metodologia de delineamento composto central, a fim de determinar-se a melhor condição de pré-tratamento para posterior determinação do potencial de produção de biogás.

Os experimentos realizados, tiveram como objetivo verificar, entre os fatores estudados e seus níveis, quais os significativos e com isso otimizar a etapa de pré-tratamento. As respostas avaliadas para os planejamentos foram a composição estrutural do caule de milho triturado após o pré-tratamento, sendo esta composição o teor de celulose, hemicelulose e lignina.

Ao término de cada uma das reações as biomassas foram filtradas em filtro de náilon de 100 μm e o líquido reacional foi descartado. As amostras foram lavadas com água destilada até pH 7. As amostras foram então levadas para a estufa (SOLAB SL-100, Brasil), secas a uma temperatura de 105 °C, até massa constante. Após, as amostras foram pesadas em uma balança analítica e armazenadas em potes plásticos identificados em freezer a -4 °C, estando assim, prontas para etapa posterior de análise.

2.4.1 VAPOR ÚMIDO EM AUTOCLAVE NA PRESENÇA DE ÁCIDO SULFÚRICO

As variáveis estudadas foram, tempo de exposição (5, 17,5, 30, 42,5 e 50 min), temperatura de trabalho da autoclave (100, 108, 116, 124 e 132 °C), concentração de H_2SO_4 (0, 0,75, 1,5, 2,25 e 3% (v.v⁻¹)), e massa seca (1, 5,5, 10, 14,5 e 19 g), (Baadhe et al., 2014; Li et al., 2016). Pesou-se uma quantidade de massa seca de CMT em Erlenmeyers de 250 mL, utilizando-se balança analítica (SHIMADZU AUY220, Filipinas). O teor de umidade do CMT não tratado foi calculado previamente em triplicata e utilizado para correção do valor pesado para obter-se o valor de massa seca. Considerando a água proveniente da umidade intrínseca do CMT e a concentração de H_2SO_4 (Neon, Brasil) requerida no planejamento, preparou-se soluções aquosas ácidas com volume final de 100 mL. Todos os experimentos foram feitos utilizando-se o mesmo volume de solução ácida, portanto pôde-se avaliar a interferência da razão líquido/sólido (m.v⁻¹) para o desempenho do pré-tratamento. Estas soluções, foram então, colocadas em Erlenmeyers, contendo a biomassa e esses tampados e levados a autoclave vertical

(Phoenix Luferco, AV-75, Brasil). Após o tempo de experimento, essas amostras foram retiradas da autoclave, arrefecidas até temperatura ambiente (25 °C) e filtradas.

2.4.2 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO EM AGITADOR ORBITAL

As variáveis estudadas foram, tempo (32,5, 60 e 87,5 min), temperatura de trabalho do agitador orbital (36, 47 e 58 °C), agitação (130, 150 e 170 rpm), massa seca (3, 5 e 7 g) e concentração de H₂O₂ (4, 8 e 12% (v.v⁻¹)). A massa seca de material, obtida de acordo com o teor de umidade da amostra foi calculada e pesada em balança analítica em Erlenmeyers de 250 mL. A concentração de H₂O₂ no frasco era de 30% (Química Moderna, Brasil), utilizou-se esta quantidade de peróxido de hidrogênio como sendo a inicial (Rabelo et al., 2009; Sun et al., 2015). As soluções com volume final de 100 mL, contendo H₂O e determinada concentração de peróxido, tiveram o pH ajustado até 11,5, gotejando-se uma solução de NaOH 2 mol.L⁻¹ (Vetec, Brasil). Atingindo-se o pH desejado, o volume era aferido até 100 mL. Todos os experimentos foram feitos utilizando o mesmo volume de solução básica, portanto pôde-se avaliar a interferência da razão líquido/sólido (m.v⁻¹) para o desempenho do pré-tratamento. Após o ajuste, esta solução foi então colocada em Erlenmeyers, contendo a biomassa. A fim de diminuir a formação de espuma, adicionou-se 0,5 mL de antiespumante (Biocane FC 500, Brasil), sem formulação divulgada. Os Erlenmeyers foram tampados e levados para o agitador orbital (New Brunswick™ Innova® 42, EUA) ajustado na temperatura e agitação desejada. Após o tempo de experimento, as amostras foram retiradas do agitador orbital e filtradas.

2.4.3 PRÉ-TRATAMENTO UTILIZANDO-SE SISTEMA DE ULTRASSOM

As variáveis estudadas foram massa seca (3, 5 e 7 g em 100 mL de H₂O), tempo de exposição (22,5, 40 e 57,5 min), temperatura do meio reacional (20, 50 e 80 °C) e potência do banho de ultrassom (20, 50 e 80% de 132 W). As respostas avaliadas para este planejamento foram novamente a composição estrutural do caule de milho triturado após pré-tratamento em sistema de ultrassom e sua respectiva redução de massa. Mais uma vez, pesou-se uma quantidade de massa seca de CMTF em Erlenmeyers de 250 mL, utilizando-se balança analítica (SHIMADZU AUY220, Filipinas). Considerando-se a

água proveniente da umidade intrínseca do CMTM ajustou-se um volume final de 100 mL de H₂O.

Os experimentos foram realizados utilizando-se o mesmo volume de líquido, portanto pôde-se avaliar a interferência da razão líquido/sólido ($m.v^{-1}$) para o desempenho do pré-tratamento. Estes 100 mL foram então, colocados em Erlenmeyers, contendo a biomassa e estes tampados e levados a banho de ultrassom (UNIQUE INC., USC-1800^a, frequência de operação US 40 kHz e potência máxima de 132 W – 0,42 W.cm⁻²) (Nakashima et al., 2016; Nikolic et al., 2010). Após o tempo de experimento, as amostras foram retiradas do sistema de ultrassom, arrefecidas até temperatura ambiente (25 °C) e filtradas.

2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS (PBB)

A partir das melhores respostas obtidas nos pré-tratamentos pôde-se determinar o PBB utilizando o CMT pré-tratado e não tratado e. Avaliou-se também nesta etapa o efeito do peneiramento na produção de biogás, comparando-se a resposta usando o CMT não tratado e não peneirado e o não tratado e peneirado.

A metodologia para a determinação do PBB através da co-digestão do caule de milho triturado foi de acordo com Steinmetz et al. (2016) seguindo as normas da VDI 4630 (2006).

Os experimentos de digestão anaeróbia foram realizados em condições de temperatura mesofílica, aproximadamente 37 °C e em triplicata. Os testes foram realizados utilizando-se um frasco reator de 250 mL. O volume do gás foi medido usando-se tubos eudiômetros graduados de 500 mL. A concentração de sólidos voláteis em cada reator foi fixada em 10% ($m.v^{-1}$). A produção de gás foi monitorada diariamente por deslocamento da coluna do líquido selante dentro do eudiômetro, e o volume de biogás seco foi normalizado para 273,1 K e 1013 hPa. O inóculo anaeróbio mesofílico utilizado seguiu as condições otimizadas descritas por Steinmetz et al. (2016). O mesmo permaneceu sete dias sem alimentação para reduzir a produção de biogás basal. As características físicas do inóculo utilizado encontram-se descritas na **Tabela 7**. Após o teste, a produção de biogás foi considerada estabilizada sempre que a produção diária de

biogás foi igual ou inferior a 1% do volume total (VDI 4630, 2006). O padrão de referência utilizou celulose microcristalina (Sigma-Aldrich, Brasil).

Para avaliação da composição do biogás (CH_4 , CO_2 e H_2S), as amostras foram analisadas por sensores infravermelhos e eletroquímicos (BIOGAS5000, USA). Os sólidos totais, voláteis e fixos foram analisados de acordo com APHA (2012). As amostras foram secas a $105\text{ }^\circ\text{C}$ para a determinação de sólidos totais (ST) e calcinadas a $550\text{ }^\circ\text{C}$ para determinação de sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA NÃO TRATADA

O caule de milho triturado, foi peneirado em peneiras com o crivo variando de 4,750 a 0,075 mm. Os resultados deste fracionamento podem ser observados na **Figura 1**. A fração peneirada de maior abundância foi a que ficou retida sobre a peneira de mesh 30 (0,6 mm). O diâmetro médio de partícula mais abundante foi o de 0,890 mm. Sendo o tamanho médio de partícula responsável por 58,4±3,8% de todo o caule triturado. Os tamanhos menores de partícula foram descartados, e esta fração foi utilizada para os testes utilizando o caule de milho triturado e peneirado, assim como no estudo de Croce et al. (2016).

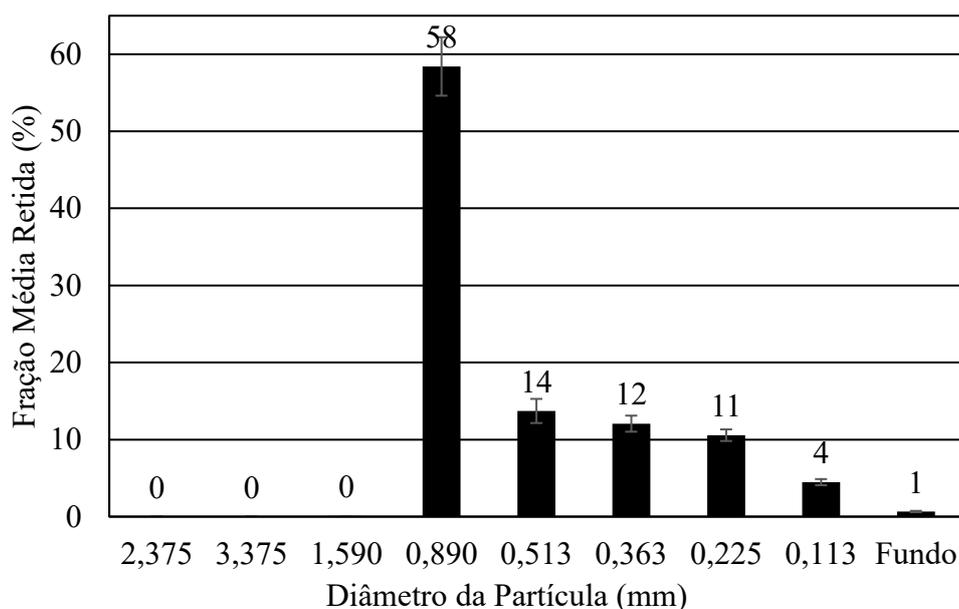


Figura 1 Distribuição granulométrica do caule de milho triturado após peneiramento.

A partir das análises cromatográficas foi possível determinar a composição estrutural da biomassa em questão, o CMTP e CMT.

A composição não tratada de ambos os substratos, peneirado e não peneirado pode ser observada na **Tabela 1**. Nota-se a presença de celulose, hemicelulose, lignina e sólidos fixos em quantidades de acordo com os encontrados por Su et al. (2006). Os pesquisadores relataram valores de 36,5±0,3%, 28,9±0,3%, 17,4±0,3% e 5,2±0,8%

respectivamente para o caule. Santos (2014), analisou a composição da palha das folhas do milho e relatou os seguintes valores $36,7\pm 0,2\%$, $34,2\pm 0,1\%$, $14\pm 0,1\%$ e $2,34\pm 0,3\%$. Ela também relatou o teor de extrativos presente na palha do milho $11,6\pm 0,5\%$. Já para Cai et al. (2016) os valores de celulose, hemicelulose e lignina ficaram em torno $43,4\%$, $19,5\%$ e $21,4\%$, para uma análise da composição conjunta de todas as partes do milho. Li et al. (2016) apresentam a composição estrutural de partes separadas do milho, neste estudo tem-se a composição do caule em torno de $34\pm 3\%$ de celulose (glicose), $24\pm 2\%$ de hemicelulose (arabinose + xilose), $20\pm 2\%$ de lignina e 2% de sólidos fixos. Neste estudo, cerca de 20% da composição do material não foi quantificado, estes valores correspondem a fração de extrativos que não são analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 1 Composição estrutural do caule de milho triturado não tratado.

Parâmetro	Caule não tratado	
	Peneirado ^a	Não peneirado ^a
Celulose (% m.m ⁻¹)	29,7±0,8	32±0,5
Hemicelulose (% m.m ⁻¹)	23,3±0,3	23,5±0,5
Lignina (% m.m ⁻¹)	21,8±2,4	18,9±1,4
Extrativos (% m.m ⁻¹)	16,8±0,2	16,7±0,1
Sólidos Fixos (% m.m ⁻¹)	3,4±0,2	3,8±0,2

Nota: Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%. Valores são médias de triplicatas e seus respectivos erros-padrão.

Quanto a composição inicial, não há diferença estatisticamente significativa entre a biomassa peneirada e não peneirada que continha todo o espectro de partículas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA PENEIRADA APÓS PRÉ-TRATAMENTO

3.2.1 PRÉ-TRATAMENTO DE VAPOR ÚMIDO EM AUTOCLAVE COM ÁCIDO SULFÚRICO DILUÍDO

A composição do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento de vapor úmido em autoclave com ácido sulfúrico diluído pode ser observada na **Tabela 2**.

Observa-se que praticamente todas as condições experimentais reduziram a quantidade de hemicelulose presente na biomassa. Segundo Guo et al. (2011) e Song et al. (2014), o caule de milho perdeu principalmente suas frações de hemicelulose e celulose após o pré-tratamento com ácido. Fernández-Cegri et al. (2012) observaram que o H₂SO₄ não pôde dissolver a lignina do resíduo de óleo de girassol, mantendo a mesma proporção que a do material não tratado. Estes estudos relataram que os pré-tratamentos ácidos e alcalinos tiveram efeitos diferentes sobre a composição da matriz lignocelulósica.

Tabela 2 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em autoclave na presença de H₂SO₄, valores codificados e reais das variáveis.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Massa Seca (g)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	-1 (17,5)	-1 (108)	-1 (0,8)	-1 (5,5)	28,5	3,7	41,4
2	-1 (17,5)	-1 (108)	-1 (0,8)	1 (14,5)	30,8	6,2	35,1
3	-1 (17,5)	-1 (108)	1 (2,3)	-1 (5,5)	9,3	1,1	57,3
4	-1 (17,5)	-1 (108)	1 (2,3)	1 (14,5)	9,8	0,3	51
5	-1 (17,5)	1 (124)	-1 (0,75)	-1 (5,5)	27,4	0,9	40,5
6	-1 (17,5)	1 (124)	-1 (0,75)	1 (14,5)	31,3	4,2	30,1
7	-1 (17,5)	1 (124)	1 (2,3)	-1 (5,5)	5,1	0,3	61,4
8	-1 (17,5)	1 (124)	1 (2,3)	1 (14,5)	28,5	1,6	65,1
9	1 (42,5)	-1 (108)	-1 (0,75)	-1 (5,5)	28,8	1,8	37,9
10	1 (42,5)	-1 (108)	-1 (0,75)	1 (14,5)	33,5	5,7	39,3
11	1 (42,5)	-1 (108)	1 (2,3)	-1 (5,5)	8,1	0,3	59,6
12	1 (42,5)	-1 (108)	1 (2,3)	1 (14,5)	12,6	0,3	57,1
13	1 (42,5)	1 (124)	-1 (0,75)	-1 (5,5)	43,9	5,8	28,9
14	1 (42,5)	1 (124)	-1 (0,75)	1 (14,5)	38,7	12,8	18,4
15	1 (42,5)	1 (124)	1 (2,3)	-1 (5,5)	38	0,8	31,3
16	1 (42,5)	1 (124)	1 (2,3)	1 (14,5)	37,7	1,7	37
17	-2 (5)	0 (116)	0 (1,5)	0 (10)	19,4	0,7	44,1
18	2 (55)	0 (116)	0 (1,5)	0 (10)	19	0,4	49,9
19	0 (30)	-2 (100)	0 (1,5)	0 (10)	15,7	0,3	51,7
20	0 (30)	2 (132)	0 (1,5)	0 (10)	16,2	0,5	59,9
21	0 (30)	0 (116)	-2 (0)	0 (10)	31,5	23,5	17,9
22	0 (30)	0 (116)	2 (3)	0 (10)	1,1	0,2	64,2
23	0 (30)	0 (116)	0 (1,5)	-2 (1)	20,6	0,7	61

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Massa Seca (g)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
24	0 (30)	0 (116)	0 (1,5)	2 (19)	22,9	0,4	46,3
25 (C)	0 (30)	0 (116)	0 (1,5)	0 (10)	33,1	3,5	40,9
26 (C)	0 (30)	0 (116)	0 (1,5)	0 (10)	40,3	4,7	27,9
27 (C)	0 (30)	0 (116)	0 (1,5)	0 (10)	35,7	4,4	33,6

Neste estudo observou-se também este tipo de resposta, conforme os dados apresentados na **Tabela 2**, apenas na condição onde não havia presença de ácido sulfúrico no meio reacional (Ensaio 21), não houve remoção da hemicelulose, mostrando mais uma vez a eficiência deste tipo de pré-tratamento para a remoção da hemicelulose.

O pré-tratamento ácido resulta em ruptura de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals que retém os componentes da biomassa, o que, consequentemente, causa a solubilização da hemicelulose e a certa redução da celulose em algumas condições (Li et al., 2010). Em contraste, o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino quebra as ligações entre a lignina. Pelo efeito do ácido diluído, a maioria da xilose nos materiais lignocelulósicos pôde ter sido hidrolisada em monossacarídeos, indicando que a hemicelulose na biomassa foi despolimerizada (Cai et al., 2016).

Através da análise de efeitos das variáveis, com 95% de confiança para as 3 respostas estudadas (celulose, hemicelulose e lignina) pôde-se observar que as variáveis temperatura e concentração de ácido são as únicas significativas para a alteração das frações de celulose e lignina presente na biomassa após o pré-tratamento. Para a fração de hemicelulose a única variável significativa para o processo foi a concentração de ácido. Estes resultados salientam o efeito dominante desta variável sobre as demais estudadas, quando se tratada de remoção da fração de hemicelulose.

A partir dos resultados do planejamento dos experimentos, foi possível propor modelos empíricos matemáticos, buscou-se maximizar a fração celulósica presente na biomassa e reduzir-se as frações de hemicelulose e lignina, interferentes para os processos fermentativos (Li et al., 2010).

As curvas de contorno referentes as composições de celulose, hemicelulose e lignina, podem ser vistas na **Figura 2 A, B e C** respectivamente. Os três modelos matemáticos foram validados através de análise de variância (ANOVA). Os gráficos foram gerados utilizando a interação de apenas duas variáveis, as quais foram significativas segundo a análise estatística. As demais variáveis foram fixadas. Os três modelos foram validados a 95% de confiança. O modelo matemático para a celulose, visto na **Figura 2 A**, apresentou um R^2 de 78,3%, já o modelo matemático para a hemicelulose, observado na **Figura 2 B**, teve um R^2 de 84,3% e para lignina, visto na

Figura 2 C, o modelo matemático possui um R^2 de 81,2%, apresentando uma boa capacidade preditiva.

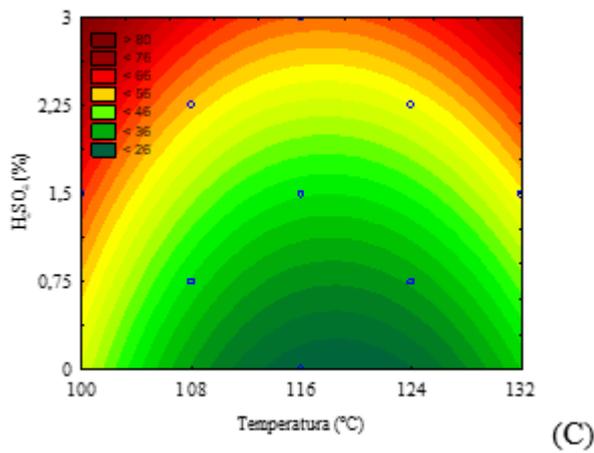
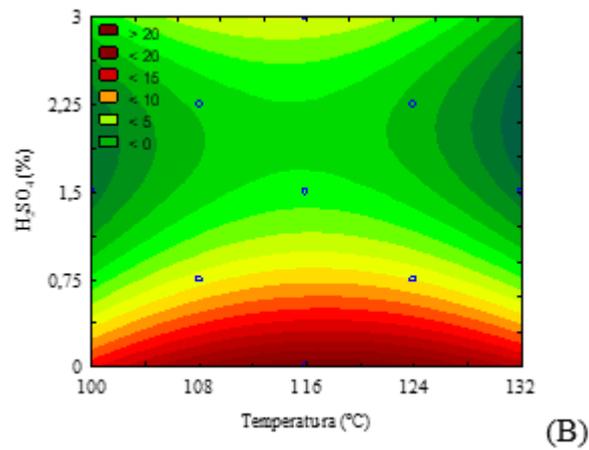
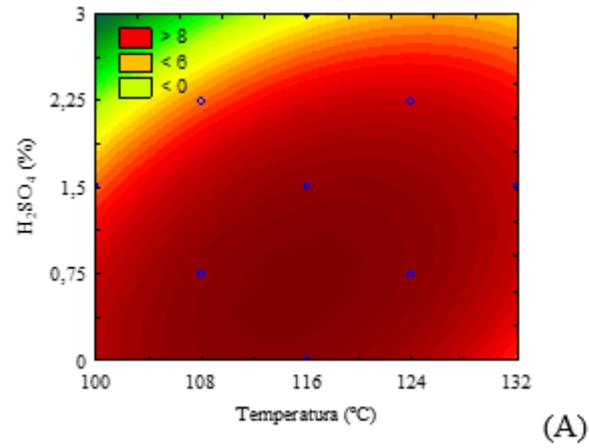


Figura 2 Porcentagem de celulose (A), hemicelulose (B) e lignina (C) presente na biomassa após o pré-tratamento ácido.

No estudo realizado por Li et al. (2016) o caule de milho submetido ao pré-tratamento ácido apresentou uma remoção quase completa da hemicelulose presente. Em comparação os teores de celulose e lignina aumentaram (Wang et al., 2018). O caule de milho foi pré-tratado com 2% (p/v) H₂SO₄, temperatura da autoclave de 121°C e 10% (m.v⁻¹) de concentração de sólidos durante 60 min. Nestas condições o teor de celulose (glicose) aumentou aproximadamente de 34±3% para 52±4%, hemicelulose (xilose) reduziu de 24±2% para 2±0% e lignina aumentou de 20±2% para 34±2%.

Cai et al. (2016) submeteu a palha de milho ao pré-tratamento com ácido diluído e teve um aumento de teor de celulose (glicose) de 43,4% para 57,8%, o teor de hemicelulose diminuiu de 19,5% para 2,5% e a lignina aumentou de 21,4% para 28,6%. As condições experimentais foram 2% (m.v⁻¹) H₂SO₄, temperatura da autoclave de 120 °C e 1:10 (m.v⁻¹) de razão sólido líquido, durante 60 min.

Neste estudo conseguiu-se aumentar o teor de celulose na biomassa pré-tratada para 43,9% (inicial 29,7±0,8%), diminuir o teor de hemicelulose para 5,8% (inicial 23,3±0,3%) e como consequência negativa aumentou-se o teor de lignina para 28,9% (inicial 21,8±1,4%). A condição na qual este resultado foi obtido foi de 0,75% (v.v⁻¹) de H₂SO₄, 120 °C de temperatura da autoclave, concentração de sólidos de 5,5% (m.v⁻¹) por 42 min. A composição da biomassa não tratada pode ser observada na **Tabela 1**.

Song et al. (2014) relataram que o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em autoclave foi eficiente para promover alterações estruturais na palha das folhas do milho, assim como o observado neste trabalho.

Utilizando a metodologia do planejamento experimental pôde-se obter valores satisfatórios de celulose e remoção de hemicelulose da biomassa em comparação com os resultados de Li et al. (2016) e Cai et al. (2016). Utilizando menos ácido sulfúrico (2,7 vezes menos) e menor tempo de exposição em autoclave (1,4 vezes menos). Quanto a temperatura de trabalho da autoclave novamente a faixa mais adequada foi em torno de 120 °C. A quantidade de sólido tratado não foi significativa para as respostas.

Analisando as **Figura 2 A, B e C** pôde-se encontrar as regiões que otimizam a composição da biomassa. Para a celulose encontrou-se uma região ótima que gira em torno de 116 °C para temperatura de operação da autoclave e 0,75% de concentração de ácido sulfúrico presente no meio reacional (Baadhe et al., 2014). As variáveis tempo e massa seca, fixadas anteriormente em 30 min e 5,5 g, tiveram seus valores escolhidos

baseados em condições operacionais dos equipamentos utilizados, sendo estas as condições operacionais escolhidas para dar prosseguimento nos estudos de co-digestão e varredura de infravermelho.

3.2.2 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO EM AGITADOR ORBITAL

Um dos primeiros estudos de pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio alcalino foi relatado por Gould e Freer (1984). Porém, na maioria das vezes não há um estudo sistemático das variáveis que afetam significativamente o processo. Utilizando-se a metodologia de planejamento experimental foi possível avaliar o efeito de todas as variáveis estudadas e suas interações tendo como resposta os teores de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa após o pré-tratamento. A lignina é um polímero polifenólico tridimensional complexo que dá rigidez e recalcitrância à biomassa lignocelulósica. Sob as condições alcalinas da solução que contém NaOH, o H_2O_2 se dissocia para formar ânions hidropoxi (HOO^-), que subsequentemente reagem com outra molécula de H_2O_2 para gerar os radicais hidroxila $\cdot OH$ e superóxido $O_2^{\cdot -}$, altamente reativos, mais uma molécula de H_2O . Esses radicais reagem prontamente e degradam a lignina, produzindo compostos de baixo peso molecular e causando sua despolimerização (Nakashima et al., 2016; Paudel et al., 2017), sendo sua remoção, o principal foco desta etapa de estudo.

A composição da biomassa triturada e peneirada após o pré-tratamento em agitador orbital pode ser observada na **Tabela 3**.

Tabela 3 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em agitador orbital na presença de H_2O_2 , valores codificados e reais das variáveis.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Concentração H_2O_2 (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	-1 (32,5)	-1 (36)	-1 (32,4)	1 (12)	43,4	24	6,6
2	-1 (32,5)	-1 (36)	-1 (130)	-1 (4)	34,6	21,9	17,2
3	-1 (32,5)	-1 (36)	1 (170)	-1 (4)	31,9	20,5	20,9
4	-1 (32,5)	-1 (36)	1 (170)	1 (12)	35,3	19,5	6
5	-1 (32,5)	1 (58)	-1 (130)	-1 (4)	39,7	23,3	5,4

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Concentração H ₂ O ₂ (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
6	-1 (32,5)	1 (58)	-1 (130)	1 (12)	45,3	20,4	9,5
7	-1 (32,5)	1 (58)	1 (170)	1 (12)	48,7	23,2	14,2
8	-1 (32,5)	1 (58)	1 (170)	-1 (4)	31,4	20,8	14,3
9	1 (87,5)	-1 (36)	-1 (130)	-1 (4)	39,2	23,6	6,2
10	1 (87,5)	-1 (36)	-1 (130)	1 (12)	48,9	22,1	3,8
11	1 (87,5)	-1 (36)	1 (170)	1 (12)	44,9	23,9	8,2
12	1 (87,5)	-1 (36)	1 (170)	-1 (4)	37	23,9	23,8
13	1 (87,5)	1 (58)	-1 (130)	1 (12)	51,5	18,8	6,2
14	1 (87,5)	1 (58)	-1 (130)	-1 (4)	42,3	23,9	8,4
15	1 (87,5)	1 (58)	1 (170)	-1 (4)	44,9	23	6,4
16	1 (87,5)	1 (58)	1 (170)	1 (12)	48,9	19	5,1
17 (C)	0 (60)	0 (47)	0 (150)	0 (8)	45,7	24,6	5,8
18 (C)	0 (60)	0 (47)	0 (150)	0 (8)	45,8	24,4	5,9
19 (C)	0 (60)	0 (47)	0 (150)	0 (8)	44,9	21,4	6

Diferentemente do pré-tratamento com H₂SO₄, após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino parte da fração de lignina foi solubilizada no líquido residual. Além disso, a hemicelulose foi parcialmente dissolvida pelas clivagens da ligações de hidrogênio (Cai et al., 2016). Como resultado, a fração de hemicelulose na biomassa pré-tratada foi pouco alterada.

Neste estudo conseguiu-se aumentar o teor de celulose na biomassa pré-tratada para 51,5% (inicial 29,7±0,8%), o teor de hemicelulose teve uma redução para 18,8% (inicial 23,3±0,3%) e o teor de lignina teve uma redução para 6,2% (inicial 21,8±1,4%). Esta nova composição da biomassa pré-tratada corresponde a um aumento proporcional de 73,4% no teor de celulose, uma redução de 19,3% de hemicelulose e uma redução de 71,6% na presença da lignina nesta biomassa. A condição que se conseguiu este resultado foi de 12% (v.v⁻¹) de H₂O₂, 58 °C de temperatura do agitador orbital, agitação de 130 rpm e concentração de sólidos de 3% (3 g de massa seca em 100 mL de solução) por 58 min (Ensaio 13). A composição da biomassa não tratada pode ser observada na **Tabela 1**.

No trabalho realizado por Cai et al. (2016) a palha de milho foi submetida ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, 2% (m.v⁻¹) H₂O₂, temperatura ambiente (25 °C) e 10% (m.v⁻¹) de concentração de sólidos e 200 rpm, durante 1440 min. Nestas condições o teor de celulose teve um aumento percentual quando comparado ao valor

inicial de aproximadamente 32,8%, a hemicelulose (xilose) teve uma redução de 6,2% e a lignina diminuiu 19,6%.

Yu et al. (2010) realizaram o pré-tratamento de palha de milho com 2% (v.v⁻¹) de solução de hidróxido de sódio (0,0016%) (v.v⁻¹) e 3% de peróxido de hidrogénio (v.v⁻¹), à temperatura ambiente (25 °C) por 960 min. Ao final do pré-tratamento o teor de lignina da palha de milho teve uma diminuição de 43,5%

Sun et al. (2015), pré-trataram a palha de milho com 2% (v.v⁻¹) H₂O₂, pH ajustado a 11,5, a temperatura de 35 °C e 10% (m.v⁻¹) de concentração de sólidos, durante 1440 min. Nestas condições o teor de celulose (glicose) teve um aumento percentual quando comparado ao valor inicial de aproximadamente 31,4%, a hemicelulose (xilose) teve um aumento de 33,3% e a lignina diminuiu 38,9%.

A partir dos resultados do planejamento de experimentos, apresentado na **Tabela 3** foi possível realizar a análise estatística dos efeitos das variáveis. Para a resposta teor de hemicelulose nenhuma variável apresentou efeito significativo com 95% de confiança, fato que pode ser facilmente observado na **Tabela 3**, uma vez que independente das condições experimentais utilizadas o teor de hemicelulose se manteve constante com uma média girando em torno de 22,2%, valor próximo da composição inicial da biomassa não tratada.

Para a resposta teor de lignina, pôde-se observar que a variável concentração de peróxido foi a única significativa para a alteração de suas frações na biomassa após o pré-tratamento, com 95% de confiança. Já para a fração de celulose, resposta de interesse e que se quer maximizar, as variáveis significativas positivas para o aumento desta fração com 95% de confiança foram a concentração de peróxido e o tempo de exposição da biomassa ao pré-tratamento. O efeito das variáveis para a resposta celulose pode ser visto na **Figura 3**.

Utilizando-se a metodologia de planejamento experimental foi possível identificar quais as variáveis significativas para maximizar os teores de celulose e diminuir os teores de lignina na biomassa. Chegou-se à conclusão de que as variáveis temperatura do meio reacional, agitação e razão sólido líquido não afetam significativamente o processo. Somente as variáveis concentração de peróxido de hidrogênio e tempo afetam positivamente, o que também foi encontrado por Song et al. (2013). Indicando que ao se trabalhar nas condições superiores do planejamento, 12% (v.v⁻¹) de H₂O₂ e tempo de

exposição de 87,5 min, pôde-se obter valores maiores de celulose. Este aumento nos teores de celulose ocorre em decorrência da desestruturação e remoção da lignina, o qual foi o objetivo primordial deste tipo de pré-tratamento.

De modo geral pré-tratamentos alcalinos proporcionam maiores níveis de remoção de lignina em comparação com outros reagentes, independentemente do efeito da temperatura (Cai et al., 2016). Tal efeito também foi identificado neste trabalho.

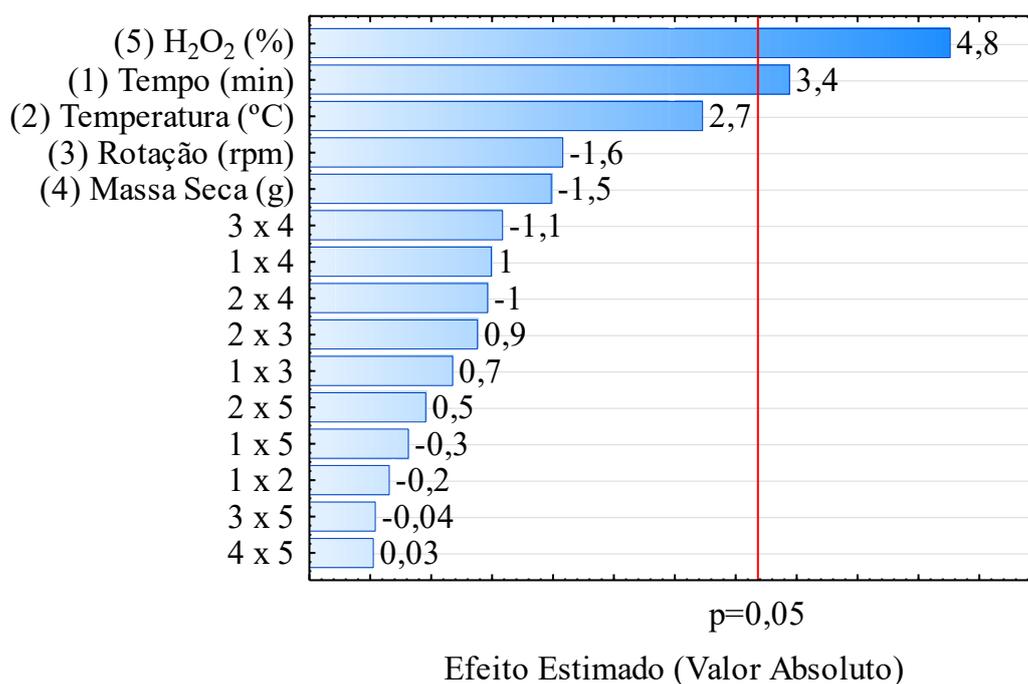


Figura 3 Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis estudadas sobre o teor de celulose presente na biomassa após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Este trabalho se mostrou promissor pois obteve-se valores percentuais de celulose maiores e reduções percentuais de lignina maiores que os apresentados por Zhao et al. (2016) que realizou o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em autoclave (*H-AFEX*). Os pesquisadores tiveram uma redução percentual de 9,3% do teor de celulose, enquanto neste trabalho obteve-se um incremento de 73,4% no teor de celulose. Já o teor lignina teve uma redução de 28,7%, e neste trabalho conseguiu-se uma redução de 71,6%. Zhao et al. (2016) utilizaram condições mais severas (130 °C, 10 min, concentração de NaOH de 1 (m.m⁻¹)) e maiores quantidades de peróxido de hidrogênio (concentração de 0,7 (m.m⁻¹)) para a realização do pré-tratamento.

3.2.3 PRÉ-TRATAMENTO EM SISTEMA DE ULTRASSOM

A composição da biomassa peneirada após o pré-tratamento em sistema de ultrassom pode ser observada na **Tabela 4**. Esta biomassa pré-tratada será referida como caule de milho triturado após pré-tratamento em sistema de ultrassom. Observa-se que em praticamente nenhuma das condições experimentais testadas houve alteração da composição estrutural. Em resultados relatados por Nakashima et al. (2016) e Nikolic et al. (2010) o sistema de ultrassom mostrou-se efetivo para desestabilizar a estrutura lignocelulósica. Porém, diferente deste estudo utilizou-se radiação ultrassônica com potência de até 600 W e associação com outros solventes.

Tabela 4 Composição estrutural do caule de milho triturado e peneirado após pré-tratamento em sistema de ultrassom, valores codificados e reais das variáveis.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência (%)	Massa Seca (g)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	-1 (22,5)	-1 (42,5)	-1 (20)	-1 (3)	29,4	21,3	27,2
2	-1 (22,5)	-1 (42,5)	-1 (20)	1 (7)	30,2	22,4	17,8
3	-1 (22,5)	-1 (42,5)	1 (80)	-1 (3)	31,4	21	17,2
4	-1 (22,5)	-1 (42,5)	1 (80)	1 (7)	31,2	23,1	12,8
5	-1 (22,5)	1 (67,5)	-1 (20)	-1 (3)	31,3	23,5	19,4
6	-1 (22,5)	1 (67,5)	-1 (20)	1 (7)	29,7	22,2	22,5
7	-1 (22,5)	1 (67,5)	1 (80)	-1 (3)	32	23,4	18,8
8	-1 (22,5)	1 (67,5)	1 (80)	1 (7)	29,2	21,7	32
9	1 (57,5)	-1 (42,5)	-1 (20)	-1 (3)	30,7	22,9	17,6
10	1 (57,5)	-1 (42,5)	-1 (20)	1 (7)	31,3	23,3	21,3
11	1 (57,5)	-1 (42,5)	1 (80)	-1 (3)	31,1	23,5	20,7
12	1 (57,5)	-1 (42,5)	1 (80)	1 (7)	29,9	22,5	23,4
13	1 (57,5)	1 (67,5)	-1 (20)	-1 (3)	32,9	24,6	22,6
14	1 (57,5)	1 (67,5)	-1 (20)	1 (7)	33	24,7	25
15	1 (57,5)	1 (67,5)	1 (80)	-1 (3)	30,7	23	11,3
16	1 (57,5)	1 (67,5)	1 (80)	1 (7)	31,2	23,8	20,2
17 (C)	0 (40)	0 (55)	0 (50)	0 (5)	33,1	24,6	18,7
18 (C)	0 (40)	0 (55)	0 (50)	0 (5)	25	18,9	23
19 (C)	0 (40)	0 (55)	0 (50)	0 (5)	29,4	22,4	17,1

Ao se utilizar todos os valores obtidos como resposta para o teor de celulose, hemicelulose e lignina, pôde-se obter 3 valores médios e seus respectivos erros-padrão.

Sendo eles $30,7 \pm 0,4$ para celulose, $22,8 \pm 0,3$ para hemicelulose e $20,5 \pm 0,4$ para lignina. Estes valores são muito próximos dos obtidos para a composição não tratada do caule de milho triturado e peneirado que pode ser vista na **Tabela 1**. Servindo, inclusive, como parâmetro para verificação dos teores iniciais na composição da biomassa.

Através da avaliação dos efeitos das variáveis para as 3 respostas estudadas (celulose, hemicelulose e lignina) pôde-se observar que, com 95% de certeza, nenhuma das variáveis testadas teve efeito significativo nas respostas estudadas. Nakashima et al. (2016) estudou o efeito do ultrassom isolado para provocar alterações estruturais (palha do caule e folhas do milho) e depois analisou as alterações na fibra através de espectroscopia de infravermelho usando transformada de Fourier, não sendo observado alteração na composição, resultado que corrobora o que foi apresentado neste trabalho.

Isto se deve principalmente pelas condições de trabalho serem muito brandas. Valores brandos de temperatura do sistema de ultrassom, associados a baixas potências de ultrassom, não foram capazes de desmontar a rígida estrutura lignocelulósica. As ondas ultrassônicas e o efeito de cavitação provocado por elas não tiveram efeito significativo nas faixas estudadas. Salienta-se que provavelmente ao se utilizar potências maiores de ultrassom, que os 132 W fornecidos pelo equipamento utilizado para estes testes e combinação com outros solventes, poder-se-á obter resultados promissores para alteração da composição do material lignocelulósico (Mood et al., 2013; Sasmal and Mohanty, 2018).

3.3 AVALIAÇÃO DA BIOMASSA PENEIRADA E NÃO PENEIRADA APÓS OS PRÉ-TRATAMENTOS E CONFIRMAÇÃO EXPERIMENTAL DOS DADOS COLETADOS

Os parâmetros operacionais para a realização da avaliação foram escolhidos a partir da análise das **Tabelas 2 e 3** das **Figuras 2 e 3**. Também, nesta etapa, pôde-se validar experimentalmente os modelos propostos para o pré-tratamento de vapor úmido com ácido diluído. O tratamento com sistema de ultrassom não teve testes repetidos, uma vez que não foi identificadas modificações significativas na composição estrutural do material após o pré-tratamento utilizando este sistema.

As condições experimentais utilizadas para o pré-tratamento ácido foram 116 °C para temperatura da autoclave, 0,75% (v.v⁻¹) de H₂SO₄, tempo de exposição de 30 min e 5,5 g de massa seca de caule de milho. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino as condições selecionadas foram tempo de reação de 87,5 min, 47 °C para temperatura do agitador orbital, 150 rpm como velocidade de agitação, 5 g de massa seca e 12% (v.v⁻¹) de H₂O₂.

Os resultados da composição estrutural após o pré-tratamento realizado nas condições experimentais selecionadas para confirmar os dados coletados podem ser vistos na **Tabela 5**. A análise da composição estrutural seguiu a metodologia descrita no item 2.2.1.

Tabela 5 Composição estrutural da biomassa depois de diferentes pré-tratamentos, peneirada e não peneirada.

Composição Estrutural	H ₂ SO ₄ em Autoclave			H ₂ O ₂ Básico em Agitador Orbital	
	Peneirado	Previsto *	Não peneirado	Peneirado	Não peneirado
Celulose (% m.m ⁻¹)	39±0,6 ^a	37,3	41,1±0,1 ^a	50±0,9 ^f	50,1±1,2 ^f
Hemicelulose (% m.m ⁻¹)	5,3±0,3 ^b	6,9	5,1±0 ^b	19,7±0,2 ^g	19,3±0,1 ^g
Lignina (% m.m ⁻¹)	25,7±0,1 ^c	24,7	23,7±1,6 ^c	7,4±0,4 ^h	6,9±0,1 ^h
Perda de Massa (% m.m ⁻¹)	36,2±0,1 ^d		39,4±0,1 ^e	50,8±0,4 ⁱ	52,3±0,4 ^j

Nota: Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%. Valores são médias de triplicatas e seus respectivos erros-padrão.

* Valores previstos pelo modelo empírico matemático obtido após tratamento estatístico, para o CMT peneirado.

Os valores previstos pelo modelo empírico matemático obtido para o pré-tratamento com ácido sulfúrico podem ser vistos na **Tabela 5**. Os erros percentuais do modelo estão em torno de 4% para celulose e para a lignina. Já para a hemicelulose o erro salta para em torno de 30%. Mesmo assim, ainda próximo do observado experimentalmente.

A comparação entre o CMT peneirado e não peneirado também pode ser observado na **Tabela 5**. Assim como a composição não tratada, observada na **Tabela 1**, a operação de peneirar o substrato não diferencia a composição do mesmo após os pré-tratamentos. Tal resultado é importante, visto que se pode eliminar esta operação unitária, podendo-se trabalhar tanto com os tamanhos maiores ou menores de partículas, presentes no CMT,

conforme descrito na **Figura 1**. Não somente com a partícula média mais abundante de 0,890 mm.

Já, quanto a perda de massa comparando o CMT peneirado com o não peneirado há diferença significativa. Tal fato foi explicado pelo caule não peneirado conter partículas menores que ao final do pré-tratamento são solubilizadas no líquido sobrenadante, ou mesmo no momento da filtração para separação do sólido são perdidas.

Não sendo verificada diferença significativa na composição estrutural através do Teste de Tukey, entre o pré-tratamento com o CMT peneirado e não peneirado, procedeu-se a avaliação do potencial bioquímico de biogás. Ambos os pré-tratamentos, com ácido sulfúrico e com peróxido de hidrogênio alcalino, foram avaliados e comparados com o CMT não tratado peneirado e não peneirado.

3.4 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA FIBRA DE CMT

A análise de EIV-TF buscou responder como estava o arranjo estrutural das moléculas que compõe o material pré-tratado e não tratado. A análise foi capaz de responder quais as diferenças entre os pré-tratamentos e com isso obter algumas hipóteses para o aumento e/ou diminuição da produção de biogás.

O espectro de IV-TF do CMT não tratado e pré-tratado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) alcalino e em autoclave na presença de ácido sulfúrico (H_2SO_4) é apresentado na **Figura 4**, e a atribuição dos picos de EIV-TF a grupos funcionais químicos de acordo com diferentes literaturas é mostrada na **Tabela 6** (Kumar et al., 2009; Li et al., 2016; Yao et al., 2018; Zhao et al., 2016).

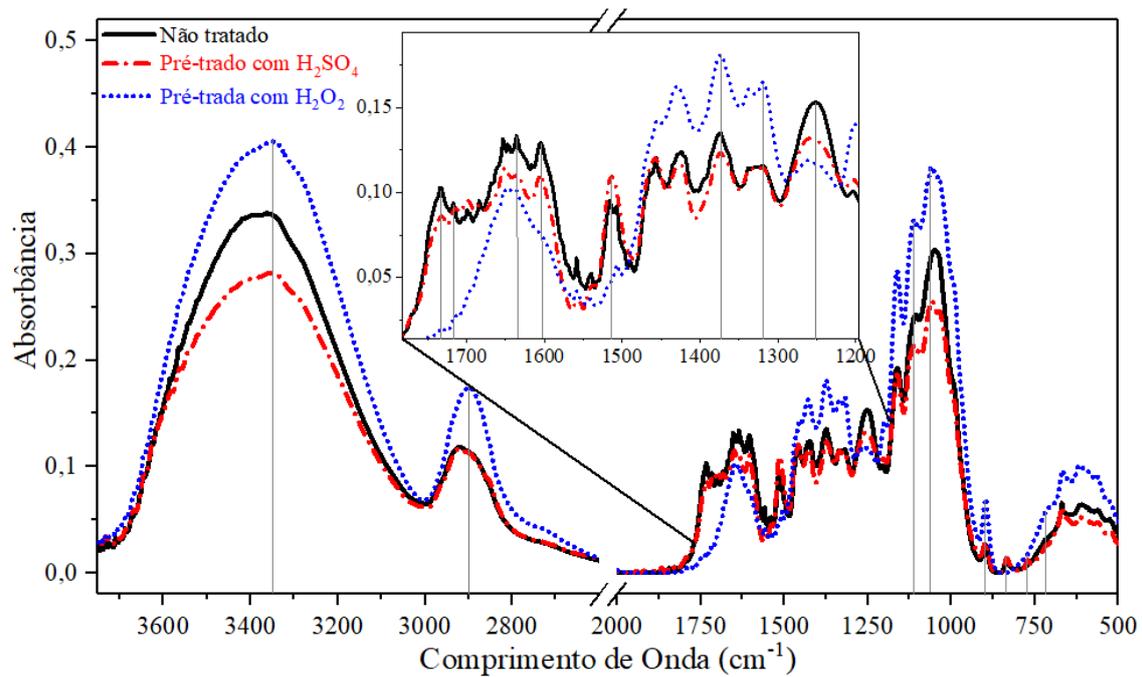


Figura 4 Espectros de infravermelho utilizando transformada de Fourier da biomassa não tratada e pré-tratada com H_2SO_4 e H_2O_2 .

Tabela 6 Comprimentos de onda que correspondem a determinado grupo funcional e respondem a espectroscopia de infravermelho e seus respectivos valores relativos para os dois pré-tratamento estudados*.

Comprimento de Onda (cm ⁻¹)	Assinatura (Assignment)	Não tratado	H ₂ SO ₄		H ₂ O ₂	
		Absorbância/ Razão	Absorbância /Razão	Variação (%)	Absorbância/ Razão	Variação (%)
3348	Estiramento O-H (Ligações de hidrogênio de celulose)	0,3368	0,2819	16,3	0,4057	-20,5
2900	Estiramento C-H (Grupo metil/metileno de celulose)	0,1143	0,1132	1	0,1745	-52,7
1734	Ligações de carbonila (Associadas à remoção da cadeia lateral de lignina)	0,1029	0,0855	16,9	0,0194	81,1
1716	Ácidos carboxílicos/grupos éster	0,0938	0,0896	4,5	0,0269	71,3
1633	Estiramento do anel aromático (Associado à remoção de lignina)	0,1335	0,1106	17,2	0,1010	24,3
1604	Estiramento do anel aromático (Mudanças na estrutura da lignina)	0,1293	0,1108	14,3	0,0757	41,5
1516	Lignina genérica	0,0923	0,1094	-18,5	0,0577	37,5
1516/897	Razão entre lignina/celulose	3,5	3,8	-8,3	0,8	76,4
1373	Estiramento O-H fenólico (Mudanças na estrutura da lignina)	0,1352	0,1233	8,8	0,1814	-34,2
1319	Estiramento do anel de siringil (Mudanças no monômero de lignina)	0,1160	0,1145	1,3	0,1651	-42,3
1251	Absorção C-O (Resultado da clivagem de grupos acetil - lignina)	0,1530	0,1303	14,8	0,1171	23,5
1110	Celulose cristalina	0,2414	0,2143	14,3	0,3324	-27,9
1059	Estiramento C-O-C (Celulose e Hemicelulose)	0,2985	0,2557	11,2	0,3817	-37,7
897	Celulose amorfa	0,0264	0,0289	-9,5	0,0698	-164,4
1110/897	Razão entre celulose cristalina/amorfa	9,1	7,4	18,9	4,8	47,9
833	Flexão C-H de siringil	0,0109	0,0137	-25,7	NA	100
771	Celulose cristalina (I α)	0,0078	0,0119	-52,6	0,0180	-130,8
719	Celulose cristalina (I β)	0,0315	0,0251	20,3	0,0572	-81,6
771/719	Razão de polimorfos de celulose cristalina (I α /I β)	0,2	0,5	-91,5	0,3	-27,1

% Variação Relativa=100(Absorbância para biomassa não tratada - Absorbância para biomassa pré-tratada)/Absorbância para biomassa não tratada; onde o número positivo indica diminuição.

As posições das bandas em torno de 3448 e 2900 cm^{-1} foi atribuída às ligações químicas da celulose presentes na biomassa. Em ambas há um aumento da absorbância (20,5 e 52,7%) para o tratamento com H_2O_2 . Tal fato foi explicado pelo aumento no teor de celulose presente na biomassa após o pré-tratamento. Já para o pré-tratamento com H_2SO_4 houve uma redução da absorbância na banda de 3448 cm^{-1} , indicando a diminuição das ligações O-H da celulose (Assumpção et al., 2016; Cai et al., 2016; Li et al., 2016; Sun et al., 2013; Zhao et al., 2016). Mesmo o teor de celulose sendo maior que na biomassa não tratada essa estava com sua estrutura modificada, em decorrência da exposição a pressão, temperatura e ao ácido diluído.

As bandas em torno de 1734, 1716, 1633, 1604 e 1516 cm^{-1} são associados a grupamentos químicos presentes na estrutura da lignina. Praticamente todos os picos tiveram um achatamento ou desapareceram por completo para o tratamento com H_2O_2 , em decorrência da ação dos radicais hidroxila (Kumar et al., 2009; Nakashima et al., 2016). O pré-tratamento com H_2SO_4 apresentou redução nestes mesmos picos, com exceção da banda 1516 cm^{-1} que foi também associada a presença de lignina na biomassa. Este fato está de acordo com a análise da composição estrutural onde o pré-tratamento ácido acaba por aumentar o teor proporcionalmente de lignina (Assumpção et al., 2016; Li et al., 2016; Yao et al., 2018).

A razão entre lignina e celulose teve uma diminuição de 76,4% para o pré-tratamento com H_2O_2 enquanto que o pré-tratamento com H_2SO_4 houve um aumento desta razão (Li et al., 2010) A presença ou ausência da lignina na biomassa que participa dos processos de co-digestão parece ser o fator preponderante para explicar o desempenho superior de um dos pré-tratamentos e detrimento do outro. Lizasoain et al. (2017) e Yao et al. (2018) relataram a formação de pseudo-lignina após pré-tratamento em condições severas (altas temperaturas/pressões e solventes fortemente alcalinos) sobre o caule de milho e trigo respectivamente, estes pré-tratamentos acabaram por diminuir a produção de biogás e em alguns casos inibir completamente a produção de biogás.

O pico a 1373 cm^{-1} (lignina fenólica) apresentou diminuição para o pré-tratamento com H_2SO_4 e aumento para o pré-tratamento com H_2O_2 . De acordo com a literatura, a lignina fenólica é a que apresenta mais efeitos inibitórios do que a que se encontra adsorvida como barreira física a celulose (Zhao et al., 2016). Porém, neste estudo, sua presença não causou prejuízos para co-digestão. A alteração na estrutura da lignina é

explicada pelo pré-tratamento ácido ter agido preferencialmente nesta fração da lignina enquanto o pré-tratamento com H₂O₂ não agiu. Sendo a lignina remanescente deste pré-tratamento a lignina fenólica. Tal comportamento foi observado também para a banda 1329 cm⁻¹ (anel de siringil), o pré-tratamento com H₂O₂ aumentou o percentual relativo deste grupo funcional de lignina, mais que para a biomassa não tratada (Assumpção et al., 2016; Sun et al., 2013; Wang et al., 2013; Yao et al., 2018; Zhao et al., 2016).

Os grupos acetil (lignina), que respondem a banda 1251 cm⁻¹ tiveram uma diminuição para ambos os pré-tratamentos, sendo novamente uma redução mais acentuada de cerca de 30,7% para o pré-tratamento com H₂O₂ (Wang et al., 2013; Zhao et al., 2016).

A diminuição da intensidade do pico a 1059 cm⁻¹ foi atribuída a uma degradação/dissolução parcial da hemicelulose. Como o pré-tratamento com H₂SO₄ age principalmente na remoção da hemicelulose a diminuição de 16,7% foi justificada (Zhao et al., 2016).

A razão entre celulose cristalina e celulose amorfa (1110 cm⁻¹/897 cm⁻¹) apresentou uma diminuição de 47,9% para o pré-tratamento com H₂O₂ e uma diminuição de 18,9% para o pré-tratamento com H₂SO₄ (Cai et al., 2016; Li et al., 2010, 2016). Resultado semelhante encontrado por Zhao et al. (2016) que submeteu a palha de milho ao pré-tratamento com *H-AFEX*. Também houve um aumento na proporção de polimorfos de celulose cristalina (I α /I β) ambas as alterações indicam que a estrutura supramolecular da celulose foi alterada. Isso foi consistente com a farinha de milho tratada por AFEX (Kumar et al., 2009).

Ambos os pré-tratamentos sobre o caule de milho deram origem a mudanças estruturais químicas. Porém, somente o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino essas mudanças reduziram efetivamente a recalcitrância do caule de milho Mathew et al. (2016).

3.5 POTENCIAL BIOQUÍMICO DE BIOGÁS (PBB)

Os pré-tratamentos selecionados para avaliação do potencial bioquímico de biogás da biomassa foram o com ácido sulfúrico e com peróxido de hidrogênio alcalino. O pré-tratamento com sistema de ultrassom não teve testes repetidos para PBB, uma vez que não foram identificadas modificações na composição estrutural da biomassa. As condições operacionais para realização do pré-tratamento da biomassa foram as mesmas do item 3.3, baseadas nas melhores respostas dos pré-tratamentos.

Os resultados da avaliação do PBB que o material pré-tratado e não tratado pode fornecer encontram-se na **Figura 5** e na **Tabela 7**.

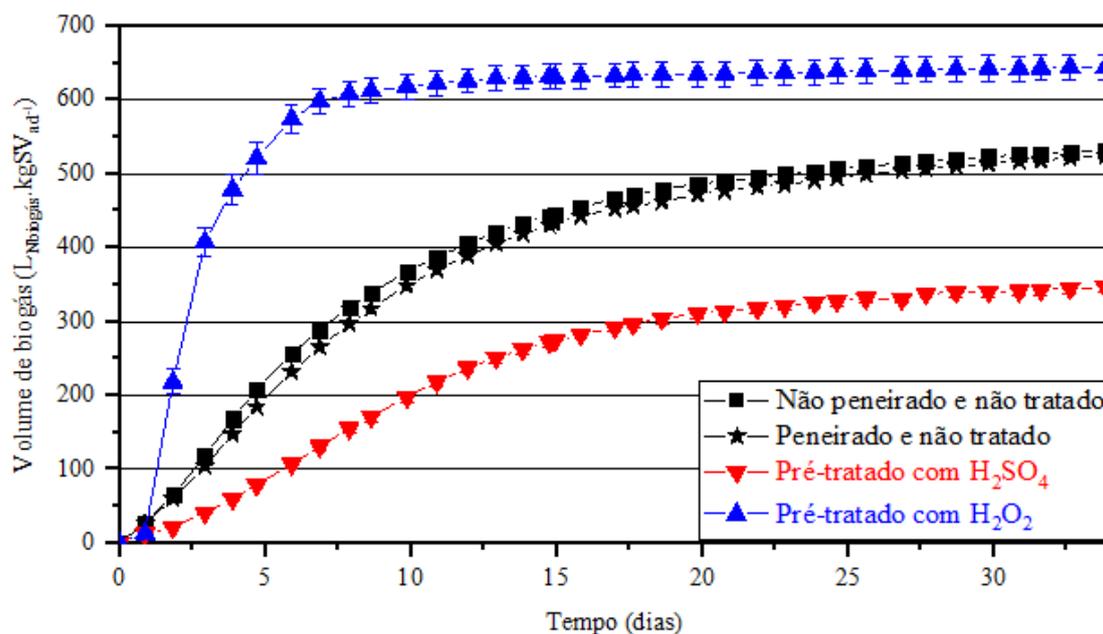


Figura 5 Produção acumulada de biogás por quilograma de sólido volátil adicionado, comparação entre o caule triturado não tratado (não peneirado e peneirado) e após pré-tratamento com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂).

Nota: Valores são médias de triplicatas e seus respectivos erros-padrão.

A produção de biogás do inóculo foi menor do que 10% da produção total de biogás para todos os quatro ensaios, assim como a produção de biogás a partir do padrão de celulose microcristalina foi superior a 80% do valor de referência 650 L_{Nbiogás}.kgSV_{ad}⁻¹ conforme rege a norma VDI 4630 (2006). Atestando, portanto, a validade dos testes realizados.

Tabela 7 Caracterização dos substratos e inóculo, média do potencial bioquímico de biogás (PBB) e concentração de CH₄, CO₂ e H₂S das amostras estudadas.

Parâmetro	Inóculo	Padrão celulose	Caule não tratado		Caule pré-tratado	
			Peneirado	Não peneirado	H ₂ SO ₄	H ₂ O ₂
Celulose (% m.m ⁻¹)	3,4	99±1	29,7±0,8 ^a	32±0,5 ^a	40±0,5	52±1
Hemicelulose (% m.m ⁻¹)	21,4	ND	23,3±0,3 ^b	23,5±0,5 ^b	5,2±0,1	19,4±0,1
Lignina (% m.m ⁻¹)	30	ND	21,8±2,4 ^c	18,9±1,4 ^c	24,7±0,9	7,7±0,2
Extrativos (% m.m ⁻¹)	ND	ND	16,8±0,2 ^d	16,7±0,1 ^d	ND	ND
Sólidos fixos (% m.m ⁻¹)	1,4±0	0±0	3,4±0,2	3,8±0,2	1,7±0,1	1,4±0
Sólidos totais (% m.m ⁻¹)	3,7±0,1	95,1±0	91,6±0,1	91,8±0,1	91,3±0	90,1±0,2
Sólidos voláteis (% m.m ⁻¹)	2,3±0	95,1±0	88,2±0,1	88±0,1	89,5±0	88,6±0,1
pH	7,88	7,92	7,90	7,92	8,05	8,21
Amostra adicionada (g)	0±0	1±0	2,4±0	2,4±0	2,4±0	2±0
PBB (L _{Nbiogás} .kgSV _{ad} ⁻¹)	25,9±0,3	634,9±5,1 ^e	523,5±4,2 ^f	532,4±2,2 ^f	346,4±5,6	644,2±16,4 ^e
Velocidade máxima [L _{Nbiogás} .KgSV _{ad} ⁻¹ .d ⁻¹]	ND	150,2±1,5	48,2±0,7 ^g	54,9±0,3 ^g	26,8±1	216,1±17,4
Dia da μ maxBiogás	ND	3-4	3-5	3-4	5-7	1-2
CH ₄ (%)	ND	53,2	57,7	57,2	55,6	54,4
CO ₂ (%)	ND	29,1	31,2	31,3	27,1	34
H ₂ S (%)	ND	23	21,4	21,4	14,6	25,2

Nota: Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5%. Valores são médias de triplicatas e seus respectivos erros-padrão.

Os testes tiveram uma concentração inicial de amostra em média de $2,3 \pm 0,1$ g. Esta massa inicial adicionada aos frascos reatores possui diferentes composições de celulose, hemicelulose, lignina e sólidos como pode ser observado na **Tabela 7**. Para os testes com pré-tratamento com H_2O_2 dos 2 g adicionados em média, a cada reator, 1 g era composto por celulose. Ao se comparar a produção acumulada de biogás do padrão de celulose microcristalina com a biomassa pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino pôde-se observar que ambas produziram valores estatisticamente iguais de biogás. Já que no teste com a amostra de celulose pura foi adicionado em média 1 ± 0 g de amostra.

No ensaio que continha a amostra pré-tratada com H_2SO_4 , das 2,4 g adicionadas ao reator, 0,96 g eram compostas de celulose. Com relação a isso pôde-se observar que em valores absolutos de celulose presentes nos reatores, os dois ensaios continham praticamente os mesmos teores. Porém, ao se analisar os demais parâmetros fica nítido a diferença entre ambos e destes com a biomassa não tratada. A biomassa pré-tratada com H_2O_2 produziu cerca de 86% a mais de $L_{Nbiogás} \cdot kgSV_{ad}^{-1}$ quando comparado com a biomassa pré-tratada com H_2SO_4 . Em comparação com a biomassa não tratada o ensaio com H_2O_2 produziu cerca de 22% a mais que ambos. Sun et al. (2015), diferente deste estudo, não observaram ganho na produção de biogás após pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino utilizando concentrações baixas de H_2O_2 . Comparando-se a biomassa tratada com H_2SO_4 com a não tratada houve uma diminuição na produção de biogás de cerca de 34,4% no volume final de biogás. Lizasoain et al. (2017) em condições severas de pré-tratamento sobre o caule de milho encontraram uma forte relação entre a diminuição da produção de biogás e a presença de lignina na biomassa pré-tratada, assim como foi apresentado neste trabalho.

Fernández-Cegrí et al. (2012) realizaram diferentes pré-tratamentos sobre torta de girassol, e também relataram a ineficiência de pré-tratamentos termoquímicos com H_2SO_4 para promover o incremento da produção de biogás. Por outro lado, os pesquisadores relataram a eficiência dos tratamentos alcalinos assim como os resultados encontrados neste estudo.

A produção de biogás acumulada do caule de milho não tratado peneirado e não peneirado ficou próxima, sendo consideradas iguais estatisticamente pelo teste de Tukey. Seus teores de sólidos e velocidade máxima de produção de biogás também são iguais

estatisticamente, com 95% de confiança, mais uma vez reforçando os resultados apresentados na análise da composição estrutural e mostrando que não há diferença em utilizar o substrato peneirado em comparação com a biomassa contendo todos os tamanhos de partículas apresentados na **Figura 1**. Cabe salientar que o ensaio contendo a biomassa não peneirada apresentou um ligeiro ganho de produção de biogás (Xiao et al., 2013). Tal fato pode ser facilmente explicado visto que esta amostra continha também partículas de tamanho menor e não somente a de 0,890 mm. Estas partículas menores são mais facilmente digeridas pelos microrganismos que produzem o biogás (Croce et al., 2016).

Quando comparados o volume final de biogás produzido pelo ensaio com pré-tratamento com H_2O_2 com o ensaio não tratado, o ganho percentual de 22% pode levar a conclusão errônea de que não há ganho real em se pré-tratar a biomassa em questão. Contudo, ao se analisar a **Figura 5** e os valores de velocidade máxima ($[L_{Nbiogás} \cdot KgSV_{ad}^{-1} \cdot d^{-1}]$) e os dias que a velocidade máxima ocorre em cada uma das condições estudadas (**Tabela 7**), pode-se evidenciar o ganho ao se pré-tratar a biomassa antes do processo de co-digestão (Zhao et al., 2018).

A velocidade máxima de produção de biogás para o ensaio onde houve pré-tratamento com H_2O_2 foi cerca 319% maior que para a biomassa sem tratamento e 43,9% maior que a do padrão de celulose microcristalina, e essa acontece em média 2 dias antes. No pré-tratamento com H_2SO_4 há uma redução da velocidade máxima de produção de biogás, sendo que ela foi cerca de 52% da velocidade média da biomassa não tratada. A grande vantagem em aumentar-se a velocidade máxima de produção de biogás é possibilitar reatores com menores tempos de retenção hidráulica (TRH), neste caso seria possível produzir o mesmo volume de biogás, neste estudo até mais (22%) e em tempos menores (Liu et al., 2017).

Analisando a composição do biogás produzido pelos ensaios, praticamente todos produziram teores satisfatórios de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2). Também houve uma baixa composição de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Mancini et al. (2018) reportaram um ganho percentual de 21,4% no volume final de metano. Neste estudo conseguiu-se um aumento percentual no volume final de metano de aproximadamente 15,5%.

A análise da **Figura 5** permite afirmar que o pré-tratamento com H_2SO_4 prejudica a cinética de produção de biogás. Por outro lado, o pré-tratamento com H_2O_2 proporciona um aumento no volume final e na velocidade máxima de produção. Nota-se ainda que em um terço do tempo total decorrido do estudo, praticamente todo o biogás já havia sido produzido. Comparando-se a produção acumulada para o período inicial de 11 dias de co-digestão, fica ainda mais claro tal fato. Para o mesmo período de tempo, a produção de biogás para a biomassa não tratada, peneirada e não peneirada, pré-tratada com H_2SO_4 e pré-tratada com H_2O_2 foi a seguinte: $370,1 \pm 3,7$, $387,2 \pm 1,6$, $218,7 \pm 6,1$ e $622,4 \pm 16,8$ respectivamente. A redução no tempo também foi observada por Mancini et al. (2018) utilizando um pré-tratamento alcalino (NaOH) na palha de arroz.

Ao se analisar a composição média do digestato após os ensaios de potencial bioquímico de biogás, observou-se que a razão Lignina/(Celulose + Hemicelulose) aumentou em todas as condições estudadas. Na biomassa não tratada peneirada esta razão aumentou de 0,4 para 1, na biomassa não tratada e não peneirada aumentou de 0,3 para 1,1, na biomassa tratada com H_2SO_4 aumentou de 0,5 para 0,9 e na biomassa tratada com H_2O_2 aumentou de 0,1 para 1,4. O pré-tratamento com H_2SO_4 teve o menor aumento desta relação, uma vez que este foi o que menos produziu biogás, indicando que não houve um consumo satisfatório dos carboidratos presentes no reator.

Outro fato que cabe ser relatado, foi que praticamente não houve consumo da fração de hemicelulose inicialmente adicionada ao teste. Os ensaios que continham biomassa sem tratamento e com tratamento de H_2O_2 o teor inicial de hemicelulose era, em média, de $23,4 \pm 0,8$ e $19,4 \pm 0,1$ respectivamente, após os testes, estes valores foram de $22,5 \pm 1$ e $21,4 \pm 1$, indicando que não há um consumo dos carboidratos que compõe esta fração da matriz lignocelulósica (Croce et al., 2016). Não havendo consumo da hemicelulose foi corroborado a correlação observada nos reatores que continham biomassa pré-tratada com H_2O_2 e o padrão de celulose microcristalina. Observa-se que a produção de biogás possui uma relação direta com o teor de celulose presente na biomassa inicialmente adicionada ao reator. A biomassa não tratada, apresentou um volume final de biogás menor, pois a mesma apresentava teores menores de celulose $0,74$ g, enquanto os demais ensaios apresentavam cerca de 1 g. Além disso, esta celulose se encontrava protegida pela matriz lignina/hemicelulose.

Como mencionado anteriormente, o ensaio contendo a biomassa pré-tratada com H_2SO_4 , continha um valor de celulose semelhante as demais amostras (0,96 g). Porém, a mesma não estava diretamente disponível. Em função das características do tipo de pré-tratamento usado, ocorre um aumento percentual no teor de lignina em comparação com os demais ensaios (Wang et al., 2018). Este componente estrutural acaba por exercer um efeito inibitório na produção de biogás, isso fica ainda mais evidente quando comparado com a biomassa pré-tratada com H_2O_2 onde o teor de lignina foi reduzido em praticamente um terço e o ganho no volume final produzido de biogás foi observado, bem como redução do tempo para atingir este valor.

Liew et al. (2012) testaram a degradação de biomassa lignocelulósica, incluindo palha de milho, palha de trigo, folhas e resíduos de jardim utilizando enzimas na hidrólise do material. As palhadas de trigo e milho, por apresentarem quantidades inferiores de lignina, proporcionaram maior geração de biogás do que as folhas e resíduos de jardim. A produção de metano e o teor de lignina apresentam relação linear inversa.

No estudo realizado por Song et al. (2014), em condições mesofílicas, obteve-se um aumento percentual de 75,6% no teor de metano, comparando-se a palha das folhas de milho com a tratada com 2% de H_2SO_4 . Porém, este aumento só foi possível porque as folhas do milho contêm valores muito menores de lignina ($7,5 \pm 0,4$) do que a encontrada no caule do milho usado neste trabalho ($21,8 \pm 2,4\%$ peneirado e $18,9 \pm 1,4\%$ não peneirado). Sendo que após o pré-tratamento o teor de lignina não foi alterado para Song et al. (2014). Conclui-se novamente que este tipo de pré-tratamento só é indicado para biomassa que contenha baixos teores de lignina, o que se tratando de biomassa lignocelulósica restringe bastante as possibilidades de aplicação.

Neste mesmo trabalho, Song et al. (2014) realizaram um pré-tratamento oxidativo com 3% de H_2O_2 ácido. O pré-tratamento representou um ganho percentual de 116,7% na produção de metano.

Michalska et al. (2012) também indicaram resultados satisfatórios do pré-tratamento oxidativo de palha de diferentes biomassas lignocelulósicas para o aumento da produção de biogás.

4. CONCLUSÕES

A composição estrutural da biomassa foi de $30,8 \pm 1,3\%$ de celulose, $23,4 \pm 0,8\%$ de hemicelulose, $20,3 \pm 3,8\%$ de lignina, $16,7 \pm 0,3\%$ de extrativos e $3,6 \pm 0,4\%$ de sólidos fixos para o material triturado.

O pré-tratamento com vapor úmido em autoclave na presença de ácido sulfúrico foi efetivo na remoção da hemicelulose da biomassa. Porém, como consequência negativa tem-se o aumento proporcional do teor de lignina. Também há um aumento de cerca de $47,8\%$ no teor de celulose, quando comparado com a biomassa não tratada.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em agitador orbital, possibilitou a remoção da lignina da biomassa, cerca de $71,6\%$, com um aumento proporcional de $73,4\%$ no teor de celulose e uma redução de $19,3\%$ de hemicelulose.

Já o pré-tratamento em sistema de ultrassom não apresentou mudanças significativas na composição estrutural do caule de milho, não sendo adequado seu emprego nas condições experimentais estudadas. Recomenda-se o uso de energias maiores.

Não foi verificada diferença significativa entre a composição do material pré-tratado peneirado e não peneirado depois dos pré-tratamentos com H_2SO_4 e H_2O_2 . Indicando que não há necessidade da realização desta etapa de separação das partículas presentes na biomassa triturada. A avaliação do potencial bioquímico de biogás, também indicou que não há diferença significativa entre usar a biomassa peneirada ou não peneirada.

Quanto ao PBB da biomassa pré-tratada o pré-tratamento com H_2O_2 alcalino se mostrou promissor. O volume final de biogás produzido foi aumentado em 22% , bem como reduzir em praticamente um terço o tempo para obtenção deste volume. Já o pré-tratamento com H_2SO_4 , prejudicou a produção de biogás. A presença de lignina inibiu o processo de co-digestão, não sendo um pré-tratamento indicado para o caule de milho triturado.

As alterações químicas na matriz lignocelulósica puderam ser claramente observadas através da análise de EIV-TF, seja a remoção da lignina na biomassa pré-tratada com H_2O_2 como o aumento proporcional na biomassa tratada com H_2SO_4 , sendo

este um método relativamente mais simples de análise que a determinação da composição estrutural através de cromatografia líquida de alta eficiência.

4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões podem ser delineadas:

- Aplicação das condições otimizadas de pré-tratamento com ácido sulfúrico do CMT para posterior produção de etanol de segunda geração.
- Ampliação de escala das condições de pré-tratamento e produção de biogás, aumentando as quantidades de material pré-tratado e o tamanho dos reatores que realizarão a co-digestão.
- Otimização das condições do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para produção de biogás, bem como para produção de etanol de segunda geração.
- Aplicação das condições experimentais estudadas em diferentes subprodutos agroindustriais e/ou resíduos, a fim de se obter energia dos mesmos.
- Realização de novos estudos de pré-tratamento utilizando sistemas de ultrassom de maior potência e assistidos por micro-ondas.

REFERÊNCIAS

- APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541. doi:ISBN 9780875532356
- Assumpção, D., Carvalho, D., Andrade, D., 2016. Pré-Tratamento Combinado $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da Cana-de-Açúcar. *Rev. Virtual Química XX*.
- Baadhe, R.R., Potumarthi, R., Mekala, N.K., 2014. Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study. *Bioresour. Technol.* 162, 213–217. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.117
- Bazoti, S.F., Golunski, S., Pereira Siqueira, D., Scapini, T., Barrilli, É.T., Alex Mayer, D., Barros, K.O., Rosa, C.A., Stambuk, B.U., Alves, S.L., Valério, A., de Oliveira, D., Treichel, H., 2017. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresour. Technol.* 244, 582–587. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.007
- Cai, D., Li, P., Chen, C., Wang, Y., Hu, S., Cui, C., Qin, P., Tan, T., 2016. Effect of chemical pretreatments on corn stalk bagasse as immobilizing carrier of *Clostridium acetobutylicum* in the performance of a fermentation-pervaporation coupled system. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.ecss.2009.04.024
- Croce, S., Wei, Q., Imporzano, G.D., Dong, R., Adani, F., 2016. Anaerobic digestion of straw and corn stover: The effect of biological process optimization and pretreatment on total bio-methane yield and energy performance. *Biotechnol. Adv.* 34, 1289–1304. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.09.004
- Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Romano, S.D., Felissia, F.E., Area, M.C., 2013. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 42, 363–368. doi:10.1016/j.indcrop.2012.06.019
- Dahunsi, S.O., Oranusi, S., Efevbokhan, V.E., 2017. Pretreatment optimization, process control, mass and energy balances and economics of anaerobic co-digestion of *Arachis hypogaea* (Peanut) hull and poultry manure. *Bioresour. Technol.* 241, 454–464. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.152
- Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., Menardo, S., 2010. Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresour. Technol.* 101, 3780–3783. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.113
- Fernández-Cegrí, V., Raposo, F., Rubia, M.A. De, Borja, R., 2012. Effects of chemical and thermochemical pretreatments on sunflower oil cake. doi:10.1002/jctb.3922
- Gould, J.M., Freer, S.N., 1984. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H_2O_2 . *Biotechnol. Bioeng.* 26, 628–631. doi:10.1002/bit.260260613
- Guo, P., Mochidzuki, K., Cheng, W., Zhou, M., Gao, H., Zheng, D., Wang, X., Cui, Z., 2011. Effects of different pretreatment strategies on corn stalk acidogenic fermentation using a microbial consortium. *Bioresour. Technol.* 102, 7526–7531. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.083
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, a, Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Natl. Renew. Energy Lab.* 1–9.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009. Physical and chemical

- characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 3948–3962. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.075
- Kunz, A., Miele, M., Steinmetz, R.L.R., 2009. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresour. Technol.* 100, 5485–5489. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.039
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Vogel, K.P., Simmons, B.A., Singh, S., 2010. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass : Biomass recalcitrance , delignification and enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* 101, 4900–4906. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.066
- Li, P., Cai, D., Luo, Z., Qin, P., Chen, C., Wang, Y., Zhang, C., Wang, Z., Tan, T., 2016. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. *Bioresour. Technol.* 206, 86–92. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.077
- Liew, L.N., Shi, J., Li, Y., 2012. Methane production from solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy* 46, 125–132. doi:10.1016/j.biombioe.2012.09.014
- Liu, C., Wachemo, A.C., Tong, H., Shi, S., Zhang, L., Yuan, H., Li, X., 2017. Biogas production and microbial community properties during anaerobic digestion of corn stover at different temperatures. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2017.12.076
- Lizasoain, J., Trulea, A., Gittinger, J., Kral, I., Piringer, G., Schedl, A., Nilsen, P.J., Potthast, A., Gronauer, A., Bauer, A., 2017. Corn stover for biogas production: Effect of steam explosion pretreatment on the gas yields and on the biodegradation kinetics of the primary structural compounds. *Bioresour. Technol.* 244, 949–956. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.042
- Mancini, G., Papirio, S., Riccardelli, G., Lens, P.N.L., Esposito, G., 2018. Trace elements dosing and alkaline pretreatment in the anaerobic digestion of rice straw. *Bioresour. Technol.* 247, 897–903. doi:10.1016/j.biortech.2017.10.001
- Mathew, A.K., Parameshwaran, B., Sukumaran, R.K., Pandey, A., 2016. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.* 199, 13–20. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.121
- Michalska, K., Miazek, K., Krzystek, L., Ledakowicz, S., 2012. Influence of pretreatment with Fenton ' s reagent on biogas production and methane yield from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 119, 72–78. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.105
- Miele, M., Sandi, A.J., Kunz, A., Henn, J.D., 2013. Impactos na infraestrutura de transporte na competitividade e nas emissões de gases de efeito estufa das exportações brasileiras de carne suína, in: *Competitividade de cadeias agroindustriais brasileiras*. EMBRAPA, Brasília, DF, p. 64.
- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M., 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 77–93.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Nakashima, K., Ebi, Y., Kubo, M., Shibasaki-Kitakawa, N., Yonemoto, T., 2016. Pretreatment combining ultrasound and sodium percarbonate under mild conditions

- for efficient degradation of corn stover. *Ultrason. Sonochem.* 29, 455–460. doi:10.1016/j.ultsonch.2015.10.017
- Nikolic, S., Mojovic, L., Rakin, M., Pejin, D., Pejin, J., 2010. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chem.* 122, 216–222. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.063
- Paudel, S.R., Banjara, S.P., Choi, O.K., Park, K.Y., Kim, Y.M., Lee, J.W., 2017. Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and challenges. *Bioresour. Technol.* 245, 1194–1205. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.182
- Pienkos, P.T., Zhang, M., 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose* 16, 743–762. doi:10.1007/s10570-009-9309-x
- Rabelo, S.C., Filho, R.M., Costa, A.C., 2009. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 153, 139–150. doi:10.1007/s12010-008-8433-7
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2014. *Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos*, 3^o ed. Cárita.
- Santos, F. a, Queiróz, J.H. De, Colodette, J.L., Fernandes, S. a, Guimarães, V.M., 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova* 35, 1004–1010. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Santos, M.S.R. Dos, 2014. Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas.
- Sasmal, S., Mohanty, K., 2018. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Toward Biofuel Production 203–221.
- Seganfredo, M.A. (Org.), 2007. *Gestão Ambiental na Suinocultura*, 2^a. ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Nrel/Tp-510-42622 18. doi:NREL/TP-510-42619
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP). doi:NREL/TP-510-42618
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42619. doi:NREL/TP-510-42621
- Song, Z., Liu, X., Yan, Z., Yuan, Y., Liao, Y., 2014. Comparison of Seven Chemical Pretreatments of Corn Straw for Improving Methane Yield by Anaerobic Digestion 9, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0093801
- Song, Z., Yag, G., Feng, Y., Ren, G., Han, X., 2013. Pretreatment of Rice Straw by Hydrogen Peroxide for Enhanced Methane Yield. *J. Integr. Agric.* 12, 1258–1266. doi:10.1016/S2095-3119(13)60355-X
- Steinmetz, R.L.R., Mezzari, M.P., da Silva, M.L.B., Kunz, A., do Amaral, A.C., Tápparo, D.C., Soares, H.M., 2016. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. *Bioresour. Technol.* 219, 21–28. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.031
- Su, D., Sun, J., Liu, P., Lü, Y., 2006. Effects of Different Pretreatment Modes on the Enzymatic Digestibility of Corn Leaf and Corn Stalk 14, 796–801.

- Sun, C., Liu, R., Cao, W., Yin, R., Mei, Y., Zhang, L., 2015. Impacts of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment on Chemical Composition and Biochemical Methane Potential of Agricultural Crop Stalks. *Energy and Fuels* 29, 4966–4975. doi:10.1021/acs.energyfuels.5b00838
- Sun, S.N., Li, M.F., Yuan, T.Q., Xu, F., Sun, R.C., 2013. Effect of ionic liquid/organic solvent pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corncob for bioethanol production. Part 1: Structural characterization of the lignins. *Ind. Crops Prod.* 43, 570–577. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.074
- Verein Deutscher Ingenieure - VDI, 2006. Fermentation of organic materials. Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests . VDI 4630. Düsseldorf, Germany.
- Wang, D., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., Zhang, J., Zeng, Y., Luo, T., Mei, Z., 2018. Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomass? *Bioresour. Technol.* 249, 117–124. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.197
- Wang, F.Q., Xie, H., Chen, W., Wang, E.T., Du, F.G., Song, A.D., 2013. Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 144, 572–578. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.012
- Xiao, X., Zhang, R., He, Y., Li, Y., Feng, L., Chen, C., Liu, G., 2013. Influence of particle size and alkaline pretreatment on the anaerobic digestion of corn stover. *BioResources* 8, 5850–5860. doi:10.15376/biores.8.4.5850-5860
- Yao, Y., Bergeron, A.D., Davaritouchae, M., 2018. Methane recovery from anaerobic digestion of urea-pretreated wheat straw. *Renew. Energy* 115, 139–148. doi:10.1016/j.renene.2017.08.038
- Yu, H., Zhang, X., Song, L., Ke, J., Xu, C., Du, W., Zhang, J., 2010. Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 660–664. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.08.002
- Zhao, C., Shao, Q., Ma, Z., Li, B., Zhao, X., 2016. Physical and chemical characterizations of corn stalk resulting from hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment. *Ind. Crops Prod.* 83, 86–93. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.018
- Zhao, X., Luo, K., Zhang, Y., Zheng, Z., Cai, Y., Wen, B., Cui, Z., Wang, X., 2018. Improving the methane yield of maize straw: Focus on the effects of pretreatment with fungi and their secreted enzymes combined with sodium hydroxide. *Bioresour. Technol.* 250, 204–213. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.160
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y., 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog. Energy Combust. Sci.* 42. doi:10.1016/j.pecs.2014.01.001