

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Ilana Michelle Araújo Ramos

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE CANA ENER-
GIA**

Goiânia, 2017.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Ilana Michelle Araújo Ramos

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE CANA ENER-
GIA**

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG (PPGTPS- IFG) - Dissertação de Mestrado Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa: Tecnologia de Redução e Gerenciamento de Resíduos.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho de Oliveira

Coorientadora: Profª. Dra. Mariângela Fontes Santiago

Goiânia, 2017.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Maurício Amormino Júnior, CRB6/2422)

R175a Ramos, Ilana Michelle Araújo.
Aplicações de enzimas na produção de biogás a partir de cana energia / Ilana Michelle Araújo Ramos. – Goiânia (GO), 2017.
85 f.

Orientador: Sérgio Botelho de Oliveira
Coorientadora: Mariângela Fontes Santiago

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis) – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás.

1. Biogás. 2. Bioenergética. 3. Energia – Fontes alternativas. 4. Tecnologia – Processos sustentáveis. I. Oliveira, Sérgio Botelho de. II. Santiago, Mariângela Fontes. III. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás. IV. Título.

CDU: 665.776

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Ilana Michelle Araújo Ramos

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE CANA ENER-
GIA**

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG (PPGTPS- IFG) - Dissertação de Mestrado Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa: Tecnologia de Redução e Gerenciamento de Resíduos.

Prof. Dr. Sérgio Botelho de Oliveira, IFG Goiás (orientador)

Profª Drª Mariângela Fontes Santiago, UFG (coorientador)

Profª Drª Fabrícia Paula de Faria, UFG

Prof. Dr. Danna Pereira Barbosa, PUC - Goiás

Aprovado em: 02/12/2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lourdes e Sinval

Aos meus filhos, Filipe e Rafael

Ao meu marido, Marcelo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu Deus, por me permitir chegar até este ponto da minha vida profissional.

Aos meus amados filhos, Filipe e Rafael, por mesmo sem compreender, me apoiarem em minhas escolhas.

Ao meu querido esposo Marcelo, por me incentivar a viver os meus sonhos.

À minha paciente família, por todo o apoio nesse período de ausências. Aos meus pais, Lourdes e Sinval, que sempre me ensinaram a buscar o conhecimento e ir em busca de meus projetos. Aos meus irmãos Marcel e Roges, por me apoiarem incondicionalmente. À minha sogra Diomar, por seu carinho e cuidado.

Aos professores Dr. Sérgio Botelho de Oliveira, Dra. Fabrícia Paula de Faria e Dra. Mariângela Fontes Santiago, pelos inestimáveis auxílios durante toda essa jornada, e pela paciência.

Ao doutorando Syd Pereira Faria, por me permitir acompanhá-lo em sua pesquisa e me ajudar em todo o tempo.

À doutoranda Amanda Gregorim Fernandes, pela paciência e ajuda nos experimentos.

Ao Rodrigo José Dos Santos Majewski, por ter me acompanhado e auxiliado em toda a parte final da experimentação.

À Laís Camargo de Lacerda Medrado, colega de mestrado e amiga, por todo o apoio nesse projeto.

Ao Alexander, Izadora, Jannaína e demais colegas do Laboratório de Biotecnologia de Funções da UFG, pelo companheirismo e ajuda constante.

À Jhessica Golveia, Érica, Luane Garcia e demais colegas do Laboratório de Enzimologia e Materiais Bioativos da Faculdade de Farmácia da UFG, pelo auxílio inestimável.

A todos os colegas, companheiros de mestrado, por compartilhar as alegrias e dificuldades comuns a essa etapa.

À Votorantim, pela participação em seu projeto.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Biogás, em especial a Rosana e Suzel, pelas preciosas dicas.

À coordenação do Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis, pelo auxílio em todas as questões envolvidas com o programa, em especial pela sempre presenteza da Leila Ninon.

À todos os professores do programa de Mestrado em Tecnologia de Processos Sustentáveis, por todos os ensinamentos.

TÍTULO: APLICAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE CANA ENERGIA

Autor: Ilana Michelle Araújo Ramos

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho de Oliveira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariângela Fontes Santiago

RESUMO

Recentemente surgiu uma variedade de cana de açúcar voltada para a produção de biomassa. A chamada cana energia foi desenvolvida para ser a matéria-prima por excelência para a produção de etanol celulósico e de energia elétrica. Por produzir grande quantidade de biomassa, a cana energia pode ser uma alternativa na produção de biogás, a partir de biodigestores. Esse é justamente o enfoque desta pesquisa, o uso dessa variedade de cana como biomassa vegetal, para a obtenção de biogás. A cana energia se trata de uma variedade da espécie *Saccharum* spp, direcionada para a produção exclusiva de biomassa, e a mesma apresenta várias vantagens em relação a cana de açúcar comum: têm em geral, menor teor de sacarose e maior teor de fibras totais, e alta produtividade por hectare plantado, além de ser uma cana mais robusta, mais resistente a pragas e doenças, e mais longa. A biomassa utilizada nos biodigestores pode ou não passar por um pré-tratamento, cujo objetivo principal é otimizar o processo de obtenção de biogás, diminuindo o tempo de biodigestão ou promovendo o aumento da produção de biogás. Para isso, foi testado o pré-tratamento enzimático, com o enfoque em duas classes de enzimas, a lacase (degradação de lignina) e as hemicelulases (xilanase e ABFase, degradadoras de hemicelulose). O objetivo do trabalho foi avaliar a ação enzimática na biomassa cana energia como pré-tratamento para a sua digestão anaeróbia, resultando na produção de biogás. Para isso, as enzimas foram produzidas e passaram por reação de hidrólise em substrato de cana energia. Após a hidrólise, foram avaliados os teores de açúcares redutores e glicose solubilizada. O tratamento que apresentou melhor rendimento relativo foi o que utilizou primeiramente a lacase e após 24 h do início da hidrólise se adicionou as hemicelulases. Após a hidrólise, foi avaliado então o potencial de produção de metano da cana energia tratada com enzimas. A produção de biogás da cana hidrolisada ficou bem abaixo da cana que não passou por pré-tratamento enzimático. Novos experimentos precisam ser testados para avaliar se o pré-tratamento enzimático pode de fato beneficiar o processo de digestão anaeróbia e obtenção de biogás.

PALAVRAS-CHAVE: BIOGÁS, CANA ENERGIA, PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO, LACASE, XILANASE, ABF-ASE

TITLE: APPLICATION OF ENZYMES IN THE PRODUCTION OF BIOGÁS FROM ENERGY CANE

AUTHOR: Ilana Michelle Araújo Ramos

ADVISER: Prof. Dr. Sérgio Botelho De Oliveira

CO-ADVISER: Prof^a. Dr^a. Mariângela Fontes Santiago

ABSTRACT

Recently, a variety of sugar cane has been developed for the production of biomass. The sugar cane called was developed to be the raw material par excellence for the production of cellulosic ethanol and electric energy. By producing large amounts of biomass, energy cane can be an alternative in the production of biogas, from biodigesters. This is precisely the focus of this research, the use of this sugarcane variety as a vegetal biomass, to obtain biogas. Sugar cane is a variety of the species *Saccharum spp*, directed to the exclusive production of biomass, and it has several advantages over the common sugarcane: they have, in general, lower sucrose content and higher total fiber content, and high productivity per hectare planted, besides being a more robust cane, more resistant to pests and diseases, and more longevity. The biomass used in biodigestors may or may not undergo a pretreatment, the main objective of which is to optimize the biogas production process, reducing the biodigestion time or promoting the increase of the biogas production. For this, the enzymatic pretreatment, with the focus on two classes of enzymes, the laccase (lignin degradation) and the hemicellulases (xylanase and ABFase, hemicellulose degrading agents) were tested. The objective of the work was to evaluate the enzymatic action in the energy biomass as pre-treatment for its anaerobic digestion, resulting in the production of biogas. For this, the enzymes were produced and underwent hydrolysis reaction on energy cane substrate. After the hydrolysis, the levels of reducing sugars and solubilized glucose were evaluated. The treatment that presented the best relative yield was the one that used the laccase first and after 24 h of the beginning of the hydrolysis the hemicellulases were added. After the hydrolysis, it was evaluated the potential for the production of sugar cane meta-in energy treated with enzymes. The biogas production of the hydrolyzed sugarcane was well below the sugarcane that did not undergo enzymatic pretreatment. New experiments need to be tested to assess whether enzyme pretreatment may actually benefit the anaerobic digestion process and biogas production.

KEYWORDS : BIOGAS, ENERGY CANE, ENZYMATIC PRE-TREATMENT, LACASE, XILANASE, ABF-ASE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações enzimáticas utilizadas na hidrólise da cana energia.....	Pág. 55
Tabela 2: Atividade enzimática das enzimas lacase, xilanase e ABFase, em U.mL ⁻¹	Pág. 59
Tabela 3: Composição lignocelulósica da cana energia.....	Pág. 59
Tabela 4: Rendimento de ART após a hidrólise da cana energia variedade #26.....	Pág. 60
Tabela 5: Rendimento de ART após a hidrólise da cana energia variedade #26.....	Pág. 63
Tabela 6: Produção acumulada de biogás.....	Pág. 65
Tabela 7: Inibidores e sua concentração tóxica em processos de digestão anaeróbia. Fonte: Adaptado de Friehe, 2010.....	Pág. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABFase- α -L-Arabinofuranosidase

AMPTS II - Automatic Methane Potential Test System

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

ART – Açúcar Redutor Total

ATR – Açúcar Total Recuperável

CBD - Caldo de Batata Dextrose

DNS - Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

ϵ - Coeficiente de Extinção Molar

FAO – United Nations Food and Agriculture Organization

GEE - Gases de Efeito Estufa

GNV - Gás Natural Veicular

KTOE - Kilotonne of Oil Equivalent

Lac- Lacase

LiP - Lignina Peroxidase

M – Molar

MCR - Metil Coenzima M Redutase

MM - Meio Mínimo

MnP - Manganês Peroxidase

MSO – Matéria Seca Orgânica

MW – Megawatt

NML/G - Normal mililitros por grama (0°C, 1013 Hpa)

OECD - Organization for Economic Co-Operation and Development

PV - Peroxidase Versátil

RPM - Rotações por Minuto

RSU - Resíduos Sólidos Urbanos

ST - Sólidos Totais

STV - Sólidos Totais Voláteis

U - Unidade Enzimática (quantidade de enzima capaz de forma 1 μ mol de produto por minuto nas condições do experimento)

U ML⁻¹– Unidade de Atividade Enzimática por Mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cana de açúcar comum (à esquerda) e cana energia (direita). Fonte: Vignis.....	Pág. 22
Figura 2: Raízes de cana energia (à esquerda) e cana de açúcar (à direita). Fonte: Vignis.....	Pág. 22
Figura 3: Comparação entre as características da cana de açúcar e cana energia. Fonte: Vignis e elaboração NovaCana.com	Pág. 24
Figura 4. Desenho esquemático das rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia. Fonte: Chernicharo (2007) apud Brito (2011).....	Pág. 32
Figura 5. Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular dos vegetais (ROSSETO, 2011).....	Pág. 37
Figura 6: Estrutura dos componentes lignocelulósicos da parede celular dos vegetais. Fonte Ferreira et al., 2009 (Figura adaptada).....	Pág. 38
Figura 7 - Fluxograma esquemático representando a coordenação das enzimas xilanolíticas na desconstrução da hemicelulose visando à produção de biocombustíveis.....	Pág. 44
Figura 8: Enzima lacase, com destaque para o seu sítio ativo com cobre (Cu).....	Pág. 46
Figura 9: Mecanismo de ação da lacase	Pág. 47
Figura 10: Reação de oxidação da seringaldazina até a formação de quinona. Fonte Silva (2006).....	Pág. 47
Figura 11: AMPTS II: Automatic Methane Potential Test System. Fonte: AMPTS II, 2014.....	Pág. 57
Figura 12: Rendimento relativo dos tratamentos	Pág. 61
Figura 13: Erlenmeyers da hidrólise enzimática contaminados por fungo não identificado....	Pág. 62
Figura 14: Produção Acumulada de biogás, após 35 dias de experimento	Pág. 67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Pág. 15
1.1. OBJETIVO GERAL	Pág. 17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Pág. 17
2. CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pág. 18
2.1. Produção de cana de açúcar no Brasil e em Goiás	Pág. 18
2.2. Caracterização da cana energia	Pág. 20
2.3. Produção de biogás no Brasil e no mundo	Pág. 25
2.4. Importância do biogás para o Centro-Oeste Brasileiro	Pág. 28
2.5. Obtenção do biogás	Pág. 30
2.6. Tratamento enzimático para substrato na produção de biogás	Pág. 35
2.6.1. Componentes da parede celular vegetal	Pág. 36
2.6.1.1. Celulose	Pág. 38
2.6.1.2. Hemicelulose	Pág. 39
2.6.1.3. Lignina	Pág. 40
2.6.1.4. Pectina	Pág. 41
2.6.2. Enzimas degradadoras da parede celular	Pág. 42
2.6.2.1. Celulases	Pág. 42
2.6.2.2. Hemicelulases	Pág. 42
2.6.2.3. Lacases	Pág. 45
2.6.3. Produção de enzimas	Pág. 48
3. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	Pág. 50
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	Pág. 50
3.1.1. Caracterização da cana energia	Pág. 50
3.1.2. Produção de lacase	Pág. 50
3.1.2.1. Origem e manutenção do fungo	Pág. 51
3.1.2.2. Condições de cultivo para produção de lacase	Pág. 51
3.1.2.3. Ensaio enzimático para atividade de lacase	Pág. 51
3.1.3. Produção de hemicelulases	Pág. 52
3.1.4. Reações de hidrólise com cana energia (variedade #26)	Pág. 54
3.1.5. Reação de hidrólise em grande escala	Pág. 56
3.1.6. Experimento com AMPTS II	Pág. 57
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Pág. 58

3.2.1. Produção de enzimas	Pág. 58
3.2.2. Caracterização do substrato	Pág. 59
3.2.3. Hidrólise enzimática em pequena escala	Pág. 60
3.2.4. Hidrólise enzimática em escala laboratorial.....	Pág. 62
3.2.5. Experimento com AMPTS II	Pág. 65
4. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	Pág. 70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pág. 71

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século XX, o mundo tem explorado exaustivamente os recursos naturais existentes, causando a poluição da atmosfera e degradação do meio ambiente. O petróleo, por exemplo, uma fonte tradicional de energia (e um recurso não renovável), foi tão continuamente extraído que seus poços já começam a dar sinais de esgotamento. Da mesma forma acontece com o carvão mineral, outro recurso não renovável. Assim, o uso de fontes tradicionais de obtenção de energia tem traçado uma trajetória de declínio, não somente pelos riscos de esgotamento, mas também, e principalmente, pelas ameaças que oferecem ao meio ambiente.

Assim, as chamadas “fontes alternativas de energia” ganham um espaço cada vez maior. Essas fontes alternativas, além de prejudicarem menos o meio ambiente, são renováveis, e por isso perenes. Entre essas fontes alternativas de energia, merece destaque o uso de biomassa para a obtenção de energia e de combustíveis.

Há três classes de biomassa: a biomassa sólida, líquida e gasosa (CORTEZ *et al.*, 2008).

A biomassa sólida tem como fonte os produtos e resíduos da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), os resíduos das florestas e a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos.

A biomassa líquida existe em uma série de biocombustíveis líquidos com potencial de utilização, todos com origem nas chamadas “culturas energéticas”. São exemplos o biodiesel, obtido a partir de óleos de colza ou girassol; o etanol, produzido com a fermentação de hidratos de carbono (açúcar, amido, celulose); e o metano, gerado pela síntese do gás natural.

Já a biomassa gasosa é encontrada nos efluentes agropecuários provenientes da agroindústria e do meio urbano e também nos aterros de RSU (resíduos sólidos urbanos). Estes resíduos são resultado da degradação biológica anaeróbia da matéria orgânica, e são constituídos por uma mistura de metano e gás carbônico. Esses materiais são submetidos à combustão para a geração de energia.

No Brasil são gerados, diariamente, uma quantidade gigantesca de resíduos. Um dos grandes problemas ambientais da atualidade é a produção crescente desses resíduos orgânicos, estando este também associado à emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE). Em muitos

países, a gestão sustentada de resíduos, assim como a sua prevenção, tornou-se numa prioridade política, representando uma parcela importante dos esforços comuns no sentido de reduzir a poluição e a emissão de GEE (JARDIM, 2013). O Brasil possui uma propensão notável para a geração de energia por fontes renováveis. O meio rural, em especial, pode ser facilmente suprido total ou parcialmente pelo uso das formas alternativas de produção de energia. As condições de clima e relevo são favoráveis no país, tanto para a energia solar e eólica quanto para a potência hídrica e para os recursos de biomassa.

E uma das alternativas para o uso dessa biomassa é o seu uso em biodigestores, para a obtenção de biogás. Os biodigestores podem ser definidos como câmaras que não contém oxigênio, permitindo que determinadas bactérias decomponham os dejetos orgânicos, produzindo como produto final adubo orgânico, biofertilizantes e biogás (ANDRADE *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2014). O biodigestor é uma solução ambientalmente correta, pois o lançamento de dejetos não tratados na natureza ou a sua utilização inadequada, além de contaminar o meio ambiente, representa um risco para a saúde da população, esse é o principal motivo para se construir um biodigestor, pois este tem por finalidade diminuir os impactos ambientais, fornecendo energia e um rico biofertilizante para adubação de lavouras e pastagens (PEREIRA *et al.*, 2012).

Para o presente estudo, o enfoque é a utilização de cana energia como biomassa, para a obtenção de biogás. A cana energia se trata de uma variedade da espécie *Saccharum* spp, direcionada para a produção exclusiva de biomassa (VIOLANTE, 2012). São várias as suas vantagens em relação a cana de açúcar comum: têm em geral, menor teor de sacarose e maior teor de fibras totais, e alta produtividade por hectare plantado, além de ser uma cana mais robusta, mais resistente a pragas e doenças, e mais longeva. Por isso, o interesse por essa espécie vem crescendo, uma vez que ela pode ser uma alternativa na produção tanto de etanol de 2ª geração, como utilizado para cogeração de energia elétrica, a partir da produção de biogás (FREITAS, 2013).

A biodigestão se trata de um processo que envolve diferentes etapas. A biomassa utilizada nos biodigestores pode ou não passar por um pré-tratamento, cujo objetivo principal é otimizar o processo de obtenção de biogás, diminuindo o tempo de biodigestão ou promovendo o aumento da produção de biogás. O pré-tratamento enzimático já tem seu uso difundido em outros tipos de biomassa, mas não se sabe ainda se o seu uso influenciará a produção de biogás na biomassa da cana energia. Para isso, será desenvolvido um estudo, para aplicação de um *pool* de enzimas, com o intuito de melhorar o processo de geração de biogás, a partir do substrato cana energia.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação enzimática na biomassa cana energia como pré-tratamento para a digestão anaeróbia e produção de biogás.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir as enzimas: endoxilanase, arabinofuranosidase e lacase;

Realizar reações hidrolíticas para analisar a sinergia das enzimas na hidrólise da fração de hemicelulose;

Caracterizar a cana energia, do ponto de vista da sua composição lignocelulósica;

Avaliar a influência do pré-tratamento enzimático na produção de biogás.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de cana de açúcar no Brasil e em Goiás

O Brasil é o maior produtor de cana de açúcar do mundo. Segundo dados da FAO (UNITED NATIONS FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION), em parceria com OECD (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT) (2014), o país ocupa o primeiro lugar na produção mundial, seguido bem de longe de Índia e China. Segundo estimativas da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) para a safra 2016-2017, a produção de cana de açúcar deverá chegar a 694,54 milhões de toneladas, um crescimento de 4,4% em relação à safra anterior, que foi de 665,59 milhões de toneladas. De acordo com o levantamento, a área a ser colhida está estimada em 9,1 milhões hectares, aumento de 5,3% se comparada com a safra 2015/16, que foi de 8,6 milhões de hectares (CONAB, 2017).

Toda essa cana de açúcar produzida tem destino certo. Entre os produtos beneficiados, a produção de açúcar em 2017 deverá atingir 39,96 milhões de toneladas, 19,3% superior à safra 2015/16, em função de preços mais rentáveis. Já a produção de etanol deve se manter acima de 27,8 bilhões de litros, redução de apenas 8,5%, em função da preferência pela produção de açúcar (CONAB, 2017).

Os maiores produtores de cana de açúcar no Brasil se localizam na região Centro-Sul do país, com destaque para o estado de São Paulo, o maior produtor, concentrando 52,4 % da produção brasileira, seguido de Goiás (10,5 %), Minas Gerais (9,4%) e Mato Grosso do Sul (7,0%) (CONAB, 2017).

Em Goiás há estimativas de melhora nos patamares de produtividade em relação à safra 2017/2018: um crescimento de 7,5% e uma produção que pode chegar a 70 milhões de toneladas, conforme estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017). Um dos motivos para esse cenário positivo é a maior quantidade de chuva.

O que tem favorecido o crescimento de Goiás como produtor de cana de açúcar são os estímulos recebido pelas indústrias, pelos produtores e também por características como: clima, solo fértil, áreas planas que facilitam a colheita, terras relativamente mais baratas ao se comparar com São Paulo e Minas Gerais e os investimentos feitos pelo Governo do Es-

tado na reconstrução de estradas e na estruturação dos incentivos para a implantação de novas indústrias em Goiás (NOVACANA, 2017).

De acordo com Jardim (2013), a cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais eficientes na conversão de energia solar em energia química. Ainda de acordo com o autor, no Brasil a cana é uma das principais opções para a produção de biomassa, sendo competitiva economicamente em relação a outras fontes como capim napier, capim elefante, eucalipto, entre outras. Entre os fatores que contribuem com essa competitividade, convém destacar o fato de que as técnicas de cultivo já estarem dominadas, o parque industrial já estar montado e funcionando, além do considerável número de usinas distribuídas pelas diversas regiões do país.

A cana de açúcar tem um grande papel no setor agrícola brasileiro, em especial pelo crescente interesse no seu uso para a produção de etanol. No entanto, diversos outros usos estão sendo estudados para esse material vegetal. Os resíduos da indústria de processamento da cana de açúcar, o chamado bagaço, podem ser utilizados em caldeiras, como combustível no lugar do carvão ou diesel. A torta de filtro, resíduo gerado nos processos de filtração e clarificação do caldo, é rica em minerais e matéria orgânica, e é geralmente utilizada como adubo nas próprias plantações de cana. Já a vinhaça, que é um subproduto da produção de álcool, também é rica em minerais e é geralmente utilizada em fertirrigação.

Desta forma no Brasil o setor sucroenergético detém a maior capacidade de geração de energia elétrica, pois ao aproveitar o bagaço, a palha e as ponteiros como combustível para as centrais térmicas, acaba representando 70% da produção nacional de biomassa. Além disso, a cana de açúcar é a principal matéria-prima para a produção de biocombustíveis (JARDIM, 2013).

Mas além destes usos, merece destaque o crescimento pelo interesse de se produzir biogás a partir de resíduos da indústria da cana de açúcar, através de um processo de digestão anaeróbia, que consiste em um processo biológico onde microrganismos anaeróbios, na ausência de oxigênio livre, convertem a matéria orgânica em biogás, composto por uma mistura de metano, dióxido de carbono e pequenas quantidades de hidrogênio, nitrogênio, monóxido de carbono e sulfeto de hidrogênio (MANOCHIO, 2015).

Conforme Goldemberg e Moreira (2005), a biomassa é uma das fontes para produção de energia com maior potencial de crescimento nos próximos anos. Tanto no mercado internacional quanto no interno, ela é considerada uma das principais alternativas para a diversificação da matriz energética e a consequente redução da dependência dos combustíveis fósseis. E quando se fala em produção de biogás, consequentemente está se falando de utiliza-

ção de biomassa, sendo a biomassa da cana uma alternativa com grandes possibilidades de crescimento em seu uso, seja na forma de planta inteira, seja na forma de bagaço, uma vez que a quantidade de resíduos gerados pela indústria da cana é grande.

2.2. Caracterização da cana energia

A cana de açúcar é uma cultura que já vem sendo explorada comercialmente a bastante tempo. A planta foi descoberta na ilha de Nova Guiné, no meio do oceano pacífico e se espalhou para o mundo gradualmente, junto com a migração humana. No Brasil a cana de açúcar só chegou em 1520, logo após os portugueses. Desde então se tornou uma cultura de grande importância para a economia brasileira.

Os programas de cana de açúcar sempre priorizaram o teor de sacarose como principal característica a ser maximizada, e em virtude disto, grande parte dos genes que contribuem para o aumento da fibra foram gradualmente eliminados do arcabouço genético que compõem as variedades atuais (FREITAS, 2013). Maiores teores de fibras contribuem negativamente no processo industrial sob um ponto de vista de aproveitamento dos açúcares do caldo, pois o conteúdo de fibras induz um maior arraste de açúcar pelo bagaço da cana durante a moagem.

Entretanto, há alguns anos atrás, passou-se a direcionar o melhoramento genético da cana de açúcar para a obtenção de variedades com altos valores de fibras, a chamada cana energia. A ideia do aproveitamento da cana de açúcar como planta energética ao invés de apenas como fonte de sacarose iniciou-se ao final da década de 70 do século passado, nos Estados Unidos, em razão da crise do petróleo e do prenúncio de mais problemas à frente (MATSUOKA *et al.*, 2014).

Os programas de melhoramento da cana em diversos países do mundo, inclusive o Brasil, têm procurado também clones com mais alta produção de fibras, conhecidos como cana energia (*energycane*). Esses clones têm em geral menor teor de sacarose e maior teor de fibras totais, porém, a alta produção de biomassa total é sempre o primeiro fator a ser considerado (ROSSETO, 2012).

De acordo com Tolmasquim (2016), motivados pelo desenvolvimento do etanol celulósico, a pesquisa tem buscado desenvolver variedades de cana com maior o teor de fibra, em detrimento do teor de açúcares. Os esforços neste sentido são feitos a partir de outra espécie de cana, a *Saccharum spontaneum*. As variedades desenvolvidas a partir desta espécie são denominadas cana energia, em contraposição à cana de açúcar.

Kumar *et al.* (2015) defendem que devido à alta produtividade de biomassa, a cana energética tem potencial para produzir muito mais açúcares celulósicos por hectare que as variedades convencionais de cana de açúcar.

Matsuoka *et al.* (2014) explicitaram os caminhos pelos quais a cana energia foi obtida. A partir de um programa de melhoramento genético da cana de açúcar tradicional, inicialmente idealizado em Porto Rico, no final da década de 1970, começaram as tentativas para obtenção de um material com elevados teores de celulose, hemicelulose e lignina. Para isso, recorreu-se a utilização de variedades mais rústicas de cana de açúcar. Exemplos da espécie *Saccharum officinarum* foram cruzadas com exemplares de *Saccharum spontaneum*, que naturalmente já apresenta um alto teor de fibra.

Lima (2016) acrescenta que no Brasil, alguns centros de pesquisas e produtores já começaram a investir em pesquisa e desenvolvimento de cruzamentos e tecnologias para a produção de cana energia. Segundo o autor, o desenvolvimento de cana energia iniciou-se em 2005 com Matsuoka e Rubio na CanaVialis. Em continuidade ao trabalho, a empresa Vignis busca obter cana com maior teor de fibra para utilização como energia através de melhoramento (FREITAS JR., 2011). Como mostra a Figura 1, há uma diferença perceptível entre cana de açúcar e cana energia, no que se refere ao tamanho da planta.

Na Figura 2, há uma comparação em as raízes da cana de açúcar e da cana energia, em que se percebe um sistema radicular robusto, com alto grau de perfilamento, o que lhe confere características como rusticidade e maior resistência ao stress hídrico (MATSUOKA *et al.*, 2014).

Já a empresa GranBio, com sede em Campinas, SP, desenvolveu a CanaVertix® e instalou sua fábrica no estado de Alagoas no segundo semestre de 2014 para produzir etanol de segunda geração (PAIVA, 2014).



Figura 1: Cana de açúcar comum (à esquerda) e cana energia (direita).

Fonte: Vignis



Figura 2: Raízes de cana energia (à esquerda) e cana de açúcar (à direita).

Fonte: Vignis

De acordo com Matsuoka *et al.* (2014), a cana energia apresenta algumas características que a distinguem da cana de açúcar tradicional: a cana energia apresenta uma lâmina de folha mais estreita, uma haste mais fina e um perfilhamento mais profuso. Isso está de acordo com Kumar *et al.* (2015), que afirmam que a cana energia produz mais talos e permite maior proporção de multiplicação. Em outras palavras, maior capacidade de perfilhamento. Além disso, permite ainda um maior número de colheitas, graças ao rizoma de *S. spontaneum*, precisamente uma característica que os criadores pioneiros da cana de açúcar procuraram nesta espécie, em contraposição à vulnerabilidade da espécie *S. officinarum*.

Paiva (2015), em reportagem para a Revista Cana Online, sistematizou as principais características das novas variedades obtidas de cana energia. Diferentemente da cana de açúcar que apresenta declínio na produção a partir do primeiro corte, na cana energia, a touceira vai perfilhando em decorrência dos rizomas. Com isso, a expectativa em relação à longevidade do canavial é de 10 anos. Como o genoma da cana energia tem a participação maior de ancestrais mais rústicos, ela é mais resistente, de modo geral, às doenças que a cana de açúcar. Ela pode ser plantada em áreas mais restritivas, como em ambientes degradados, sem a necessidade de concorrer com a produção de alimentos. Além disso, a cana energia apresenta elevado teor de fibras, o que, associado à alta produtividade, implica em um grande rendimento de biomassa por área. Nos canaviais, sob condições normais, a cana energia mede por volta de quatro metros e meio, mas não perde as características como alta quantidade de perfilhos e cerca de 30% a mais de fibra em comparação com a cana convencional.

A Figura 3 representa um quadro comparativo entre a cana de açúcar e duas variedades de cana energia desenvolvidas pela empresa Vignis. Comparando-se a produtividade em tonelada por hectare, os dois tipos de cana energia tem desempenho bem superior ao da cana de açúcar comum.

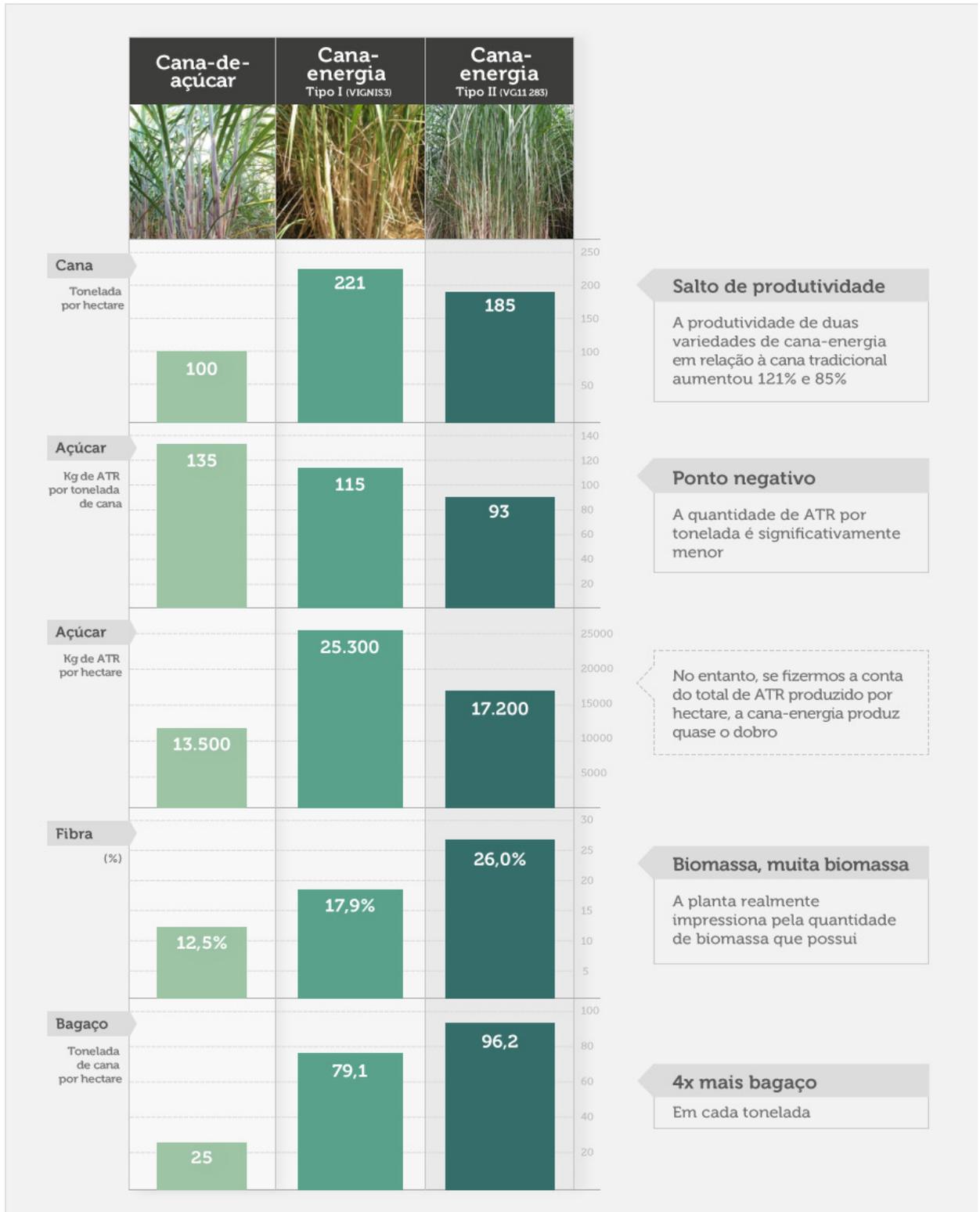


Figura 3: Comparação entre as características da cana de açúcar e cana energia.

Fonte: Vignis e elaboração NovaCana.com

De acordo com esses dados, apesar da quantidade de Açúcar Total Recuperado (ATR) (capacidade da cana de ser convertida em açúcar ou etanol) das variedades de cana

energia ser menor do que o da cana de açúcar, quando se faz um balanço de produtividade por área de plantio, a cana energia é mais vantajosa. Além disso, a cana energia produz uma quantidade maior de bagaço quando comparada à cana de açúcar.

Esses teores de fibra são importantes quando se busca uma biomassa com potencial energético. Violante (2012) explica que os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca), entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio.

Sobre os teores de fibra, recentemente Ogata (2013) avaliou a composição de fibra de 207 genótipos de cana energia (planta inteira), com alto teor de fibra, do programa de melhoramento do IAC no Brasil. A composição da celulose variou de 26,5% a 54,2% (média de 44,2%), enquanto a hemicelulose variou de 16,7% a 26,0% (média de 21,7%) e o teor de lignina variou de 17,7% a 27,1% (média de 23,5%).

Complementando ainda as características da cana energia, Matsuoka *et al.* (2014) enumeram: (i) produz energia renovável, possibilitando a redução de gases do efeito estufa; (ii) alta capacidade de conversão do carbono atmosférico em carbono orgânico na formação de biomassa; (iii) constitui alternativa de diversificação na matriz energética e redução do consumo de petróleo; (iv) tem alta densidade de energia, ou seja, energética e economicamente é matéria-prima mais eficiente do que aquela de plantas alimentícias; (v) plantas adaptadas às condições de estresse e resistentes aos microrganismos maléficos; (vi) não compete com a produção de alimentos, podendo ser plantada em regiões degradadas ou de expansão, impróprias para outras culturas e pode ser usada no controle de erosões; (vii) apresenta técnicas de exploração dominadas; (viii) a colheita pode ser feita durante todo ano e seu produto pode ser armazenado para prolongamento do uso; (ix) possibilidade de se obterem formas estéreis, não produtoras de sementes e que assim podem ser produzidas para que a multiplicação seja apenas vegetativa.

2.3. Produção de biogás no Brasil e no mundo

O biogás é produzido a partir da digestão anaeróbia de matéria orgânica, podendo para isso ser utilizado desde resíduos domésticos, de indústrias, da agropecuária e até mesmo de aterros sanitários. Ele representa uma alternativa cada vez mais utilizada pelo mundo, por

aliar além da produção de um produto rentável, o uso de resíduos que poderiam ao ser descartados gerar impactos ambientais indesejáveis.

O biogás é um biocombustível com grande potencial de aplicação, podendo inclusive ter um papel importante no incremento da parcela de energia renovável utilizada no setor dos transportes. O biogás tem excelentes propriedades de combustão, podendo ser utilizado como combustível para veículos e para a produção de energia elétrica e calor (JARDIM, 2013). Este aproveitamento pode ser ainda otimizado, aplicando tecnologias de separação de gases, permitindo assim separar o metano do dióxido de carbono e outras impurezas. Deste modo, o biogás resultante (designado por biometano) pode ser compatibilizado com o gás natural em qualquer uma das suas aplicações comuns, podendo ser utilizado em veículos que funcionam com o gás natural veicular (GNV).

Em diversos países seu uso já faz parte do cotidiano. Segundo Guimarães e Galvão (2013), o continente europeu tem concentrado grande parte da produção de biogás, destacando-se os seguintes países desenvolvidos, produtores deste biocombustível no mundo: Alemanha, Reino Unido, Itália, França e Estados Unidos da América. Dentre os países em desenvolvimento, o Brasil, a China e a Índia possuem produção relevante.

Raboni e Urbini (2014) afirmam que a União Europeia demonstra um papel de liderança mundial na área de biogás, com a sua produção de 10.085,8 *thousand tonnes of oil equivalente* (ktoe) ano⁻¹ (em 2011) (o equivalente a 117.288.550 kWh) em termos de energia primária, respondendo por cerca de 60% da produção mundial. A tonelada de óleo equivalente (toe) é uma unidade de energia definida como a quantidade de energia liberada pela queima de uma tonelada de petróleo bruto. São aproximadamente 42 gigajoules ou 11.630 quilowatts-hora, embora, como diferentes óleos brutos tenham diferentes valores caloríficos, o valor exato é definido por convenção. Ainda de acordo com os autores, a Alemanha é o país europeu que tem feito os maiores progressos neste domínio, sendo a maior parte do biogás resultante dos processos de digestão anaeróbia e co-digestão de matrizes orgânicas selecionadas.

Jardim (2013) assegura que a Alemanha desponta como líder na produção mundial de biogás, com cerca de 7000 unidades produtoras, sendo responsável por mais de metade do total de energia primária produzida a partir de biogás. O total de eletricidade produzida em 2012 foi de 20 TWh, equivalente ao consumo de 5,7 milhões de habitações. O biogás já fornece mais de 3% do total do consumo elétrico, assim como representa quantidades significativas de energia térmica a indústrias, combustível para veículos e volume injetado na rede de Gás Natural (IEA, 2012).

Já quando se fala em biometano para a utilização em veículos, convém destacar o papel da Suécia, que já utiliza o referido combustível em várias frotas de transportes públicos e privados (JARDIM, 2013). O biometano é obtido a partir da transformação a partir do biogás.

No Brasil, o biogás surge como uma grande potencialidade, e além de sua vantagem da aplicação final como substituinte do combustível fóssil, apresenta a vantagem da redução da emissão de metano produzido a partir da digestão anaeróbica de rejeitos urbanos e industriais, conforme ocorre nos aterros (BORSCHIVER e SILVA, 2014). Porém, as iniciativas para sua produção ainda são incipientes, especialmente se comparado com o panorama internacional.

Segundo Kunz & Oliveira (2006), o interesse pelo biogás, no Brasil, intensificou-se nas décadas de 70 e 80, especialmente entre os suinocultores. Programas oficiais estimularam a implantação de muitos biodigestores focados, principalmente, na geração de energia e na produção biofertilizante e diminuição do impacto ambiental. Segundo os autores o principal objetivo dos programas governamentais era reduzir a dependência das pequenas propriedades rurais na aquisição de adubos químicos e de energia térmica para os diversos usos (cozimento, aquecimento, iluminação e refrigeração), bem como reduzir a poluição causada pelos dejetos animais e aumentar a renda dos criadores. Infelizmente, os resultados não foram os esperados e a maioria dos sistemas implantados acabaram sendo desativados.

Porém recentemente esse quadro começou a ser revertido. Em 2012, a ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica), através da chamada de Projeto de P&D Estratégico nº 014/2012: “Arranjos Técnicos e Comerciais para Inserção da Geração de Energia Elétrica a partir do Biogás oriundo de Resíduos e Efluentes Líquidos na Matriz Energética Brasileira”, recebeu ao todo 23 propostas, com investimento na ordem de R\$ 476 milhões. Os projetos previam a instalação de 33,7 MW em usinas de geração a partir do biogás de resíduos e efluentes líquidos (ANEEL, 2012).

Zanette (2009) defende que o Brasil apresenta grande potencial para a produção de biogás, a partir das diferentes fontes de matéria orgânica, em torno de mais de 50 milhões de m³ de metano por dia, superior à produção nacional de gás natural disponibilizada para o consumo de cerca de 35 milhões de m³ /dia. Infelizmente, esse setor da geração de energia ainda não está sendo totalmente aproveitado, estando aquém do seu potencial.

Segundo Silveira (2016), a biomassa tem sido apontada como uma das principais alternativas para a diversificação da matriz energética e na diminuição do uso de combustíveis

fósseis. Essa fonte energética tem despertado interesse, principalmente, em função do elevado potencial de crescimento da demanda por energia nos próximos anos.

No Brasil, merece destaque as iniciativas de produção de biogás nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais, que já contam com estudos de potencial de produção de biogás a partir de resíduos sólidos urbanos e agroindustriais. O Rio Grande do Sul é apontado como um dos estados pioneiros na produção e fomento para geração de biometano e biogás. Em 11 de maio de 2016 entrou em vigor a Lei 14.864/2016, que incentiva a fabricação de biometano no Estado, por meio do Programa Gaúcho de Incentivo à Geração e Utilização de Biometano - RS Gás. A lei incentiva a produção descentralizada, visto que a Sulgás garantirá a compra do biometano no longo prazo. A legislação possibilita a criação de linhas de crédito especial, inclusive com subsídios, para a geração de biometano e concede tratamento tributário diferenciado (GUERI *et al.*, 2016).

2.4. Importância do biogás para o Centro-Oeste Brasileiro

O Brasil é um dos líderes em produção de energias a partir de biomassa. No entanto, essa liderança está relacionada diretamente à produção de etanol e biodiesel. Quando se leva em consideração o aproveitamento de biomassas e resíduos agroindustriais, o potencial de produção de biogás no país é muito grande. Porém, isso ainda não é uma realidade. Nesse sentido, vale ressaltar que o poder público tem se esforçado para fortalecer políticas públicas de apoio a produção de biogás. Com esse intuito, foi criado o programa Probiogás (Projeto de Cooperação Técnica entre os Governos do Brasil e da Alemanha, coordenado e executado pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades e pela Agência Alemã de Cooperação Internacional GIZ), cujo encerramento está previsto para o final do ano de 2017. Seu objetivo é ampliar o aproveitamento energético do biogás no Brasil em saneamento básico e iniciativas agropecuárias, trabalhando em duas áreas temáticas – água residuais e resíduos sólidos (BRASIL, 2015).

Entretanto, Karlsson *et al.* (2014) entendem que as iniciativas para geração de biogás no Brasil ainda andam a passos lentos em comparação ao panorama internacional. Contudo, sabe-se que o investimento nessa área pode resultar em reflexos significativos na matriz energética do país. O Brasil, mesmo sendo um dos líderes em produção de energias a partir de biomassa, enfrenta problemas para inserir o biogás como fonte renovável de energia no quadro nacional, pois os subsídios por parte do governo e o investimento das políticas públicas são pouco estimulados.

No Brasil, dentre os incentivos federais que promovem o uso de energias limpas, destaca-se o recente Programa de Desenvolvimento de Geração Distribuída de Energia Elétrica – PROGD, instituído pela Portaria nº 538 de 2015 do Ministério de Minas e Energia (MME), que pretende investir R\$ 100 bilhões de reais até o ano de 2030 para alcançar cerca de 23.500 MW em geração distribuída de energia limpa e renovável (BRASIL, 2015). Da mesma forma, o Programa de Incentivo às Fontes Renováveis de Energia Elétrica – PROINFA, regulamentado pelo Decreto nº 5.025 de 2004 tem sido fundamental para o surgimento de novos empreendimentos com base em fontes renováveis, diversificando a matriz energética brasileira e valorizando as características e potencialidades regionais e locais, abordando diversos conceitos correlatos. (BRASIL, 2004).

As fontes renováveis que mais se desenvolveram com os recursos do PROINFA foram as fontes: eólica, com atuais 6,17 % de participação na matriz elétrica; e a biomassa, representando 8,97 % de toda a energia elétrica do país (ANEEL, 2017). Todavia, a biomassa para fins energéticos está entre as fontes renováveis com maiores possibilidades, devido principalmente a sua grande quantidade e diversidade de material disponível que compreende toda a matéria vegetal, os dejetos de animais e a matéria orgânica contida nos rejeitos industriais e urbanos. Porém esses programas ainda caminham a passos lentos.

Em relação ao uso energético do biogás e do biometano, as políticas são ainda mais recentes. A Resolução da Agência Nacional de Petróleo (ANP) nº 8 de 30/01/2015, estabelece a especificação do biometano a ser comercializado em território brasileiro. Portanto, isso demonstra a tendência do crescimento desta tecnologia no setor energético, uma vez que tem mostrado ser bastante promissora quando analisados os projetos pioneiros instalados em países desenvolvidos.

Zanette (2009) defende que a expressiva produção agropecuária e agroindustrial brasileira resulta em um expressivo potencial de produção de biogás a partir de resíduos agropecuários e efluentes agroindustriais. Enquanto os resíduos agropecuários resultam em um potencial de produção de metano de 66,3 milhões de m³ /dia, os efluentes industriais representam um potencial de 12,7 milhões de m³ /dia.

O Brasil é um país que ainda não aproveita totalmente os resíduos orgânicos para geração de bioenergia. O maior mercado para o biogás é no setor sucroalcooleiro, ao usar os rejeitos da cana para gerar energia. A indústria da celulose e de alimentos também poderia aproveitar melhor os rejeitos, gerando energia ou biocombustível.

A região Centro Oeste é um dos potenciais brasileiros para a área de bionegócios com a produção de biomassa e seus derivados. Essa região brasileira apresenta um importante

potencial energético para o país e tem como recursos de biomassa disponíveis: a cana-de-açúcar, os óleos vegetais, resíduos agrícolas e resíduos florestais (BARRETO *et al.*, 2016).

O Centro Oeste continua a ocupar a posição de principal produtor de grãos do Brasil, tais como cereais, leguminosas e oleaginosas. Somente o estado do Mato Grosso produz 20 milhões de toneladas de soja por ano, o que o torna o quarto maior produtor do mundo. (GERBELLI, 2012).

Segundo Barreto *et al.* (2012), esse potencial viabiliza a região centro oeste a crescer em bionegócios voltados para a produção de energia de fontes renováveis. Levando em consideração os aspectos econômicos, a região Centro Oeste tem grande potencial para criação de um eco-sistema que alimente continuamente todos os setores que estejam ligados diretamente a área de bioenergia, desde a sua cultura, colheita e entrega dessa matéria-prima para as indústrias que geram impostos e movimentam o setor produtivo, o que alavanca fortemente a área de bionegócios de toda a região.

2.5. Obtenção do biogás

Jardim (2013) afirma que existem diversos tipos de resíduos, resultantes da atividade humana/industrial ou resíduos florestais, que são passíveis de serem utilizados como recurso para produção de biogás. Estes resíduos, denominados de biorresíduos, podem ser quaisquer materiais passíveis de decomposição por ação biológica. Estes biorresíduos sofrem a ação de bactérias metanogênicas (produtoras de metano), produzindo biogás em maior ou menor quantidade, em virtude das diversas variáveis do processo. Desta forma, a produção pode ser realizada em diferentes ambientes, como aterros, estações de tratamento de águas residuais ou outros digestores de resíduos orgânicos, através da digestão anaeróbia da matéria orgânica.

O biogás é composto principalmente por metano e dióxido de carbono, e traço de outros gases (H_2S , NH_3 , H_2O , NO , O_2 , etc.), quando o percentual de metano é maior que 45% é considerado inflamável (SILVA, 2016).

A digestão anaeróbia é um processo conhecido há muito tempo e seu emprego para a produção de biogás para a conversão em energia de cozimento, iluminação e como biofertilizante é muito popular nos países asiáticos, a exemplo da China e Índia (KUNZ & OLIVEIRA, 2006). Ela consiste de um processo biológico em que algumas espécies de bactérias anaeróbicas produzem enzimas para atacar a estrutura de materiais orgânicos complexos para produzir compostos simples: metano, dióxido de carbono, deixando na solução aquosa subprodutos

como amônia, sulfetos e fosfatos extraindo, em simultâneo, a energia e os compostos necessários para seu próprio crescimento (COSTA, 2006).

O processo de fermentação anaeróbia é um processo sensível, podendo ser dividido em quatro fases (RIZZONI *et al.*, 2012; BRITO, 2011; BRONDANI, 2010; KUNZ & OLIVEIRA, 2006):

- Fase hidrolítica: nesta fase as enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas pelas bactérias hidrolisam moléculas complexas dos substratos solúveis em pequenas moléculas que são transportadas para dentro das células dos microrganismos e metabolizadas. Nessa fase ocorre a transformação de proteínas em aminoácidos, de carboidratos em açúcares solúveis e de lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa e glicerina;

- Fase de fermentação ácida (acidogênese): os produtos gerados na primeira fase vão ser transformados em ácidos orgânicos (acético, propiônico, butírico, isobutírico, fórmico, hidrogênio (H₂) e dióxido de carbono (CO₂) pelas bactérias fermentativas.

- Fase de acetogênese: as bactérias acetogênicas, denominadas como produtoras de hidrogênio convertem os produtos gerados da acidogênese em dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio (H₂), acetato e ácidos orgânicos de cadeia curta;

- Fase metanogênica: as bactérias metanogênicas convertem os ácidos orgânicos de cadeia curta, o dióxido de carbono (CO₂) e o hidrogênio (H₂) em metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂)

O mecanismo de decomposição anaeróbica se desenvolve pela ação de um consórcio de microrganismos, envolvendo grupos fisiológicos distintos: bactérias fermentativas, metanogênicas, hidrolíticas e redutoras de sulfato. Nesse processo, um dos produtos finais da degradação é o metano (BRITO, 2011). O biogás, produto da degradação anaeróbica, é composto majoritariamente por metano (50%–70%) e CO₂.

O processo como um todo pode ser resumido conforme a Figura 4.

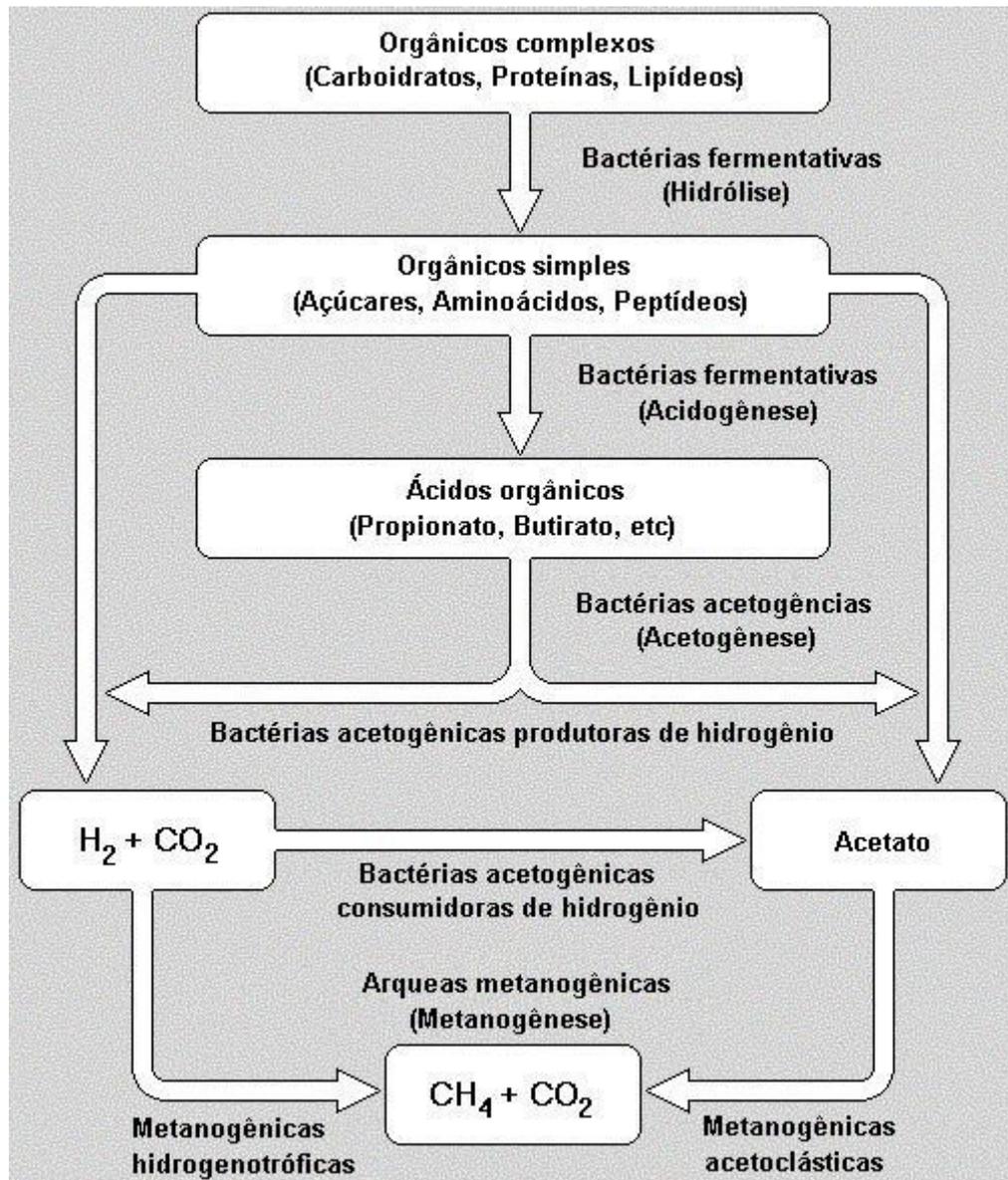


Figura 4. Desenho esquemático das rotas metabólicas envolvidas no processo de digestão anaeróbia.

Fonte: Chernicharo (2007) *apud* Brito (2011).

De acordo com Brondani (2010), há vários fatores que influenciam a digestão anaeróbia, destacando-se:

- **Temperatura:** As bactérias são bastante sensíveis às variações bruscas de temperatura. As reações químicas e bioquímicas sofrem influência direta da temperatura, afetando o processo de digestão anaeróbia, contudo variações bruscas de temperatura podem levar o processo de digestão ao desequilíbrio e morte das bactérias digestoras. O processo de fermentação ocorre entre 15° a 65° C, dividido em três faixas térmicas: psicofílica (abaixo de 20° C), mesofílica (30° a 40° C) e a termofílica (50° a 65° C). O processo de biodigestão se faz mais efe-

tivo na faixa mesofílica em que à temperatura ideal esteja em torno de 37° C (RIZZONI *et al.*, 2012).

- Tempo de retenção: Período em que o material orgânico permanece no biodigestor, até que ocorra sua completa degradação. Quanto maior o volume de carregamento diário, menor é o tempo de retenção, contudo o tempo de retenção reduzido pode tornar a digestão incompleta, desencadeando um desequilíbrio no processo.
- pH: Deve ser controlado, não pode ser muito ácido, caso contrário ocorrerá o desaparecimento das bactérias metanogênicas (que transformam os ácidos orgânicos em biogás). Para o desenvolvimento das atividades dos microrganismos se faz necessário um pH neutro ou ligeiramente alcalino. O valor médio do pH deve estar entre 6,5 a 7,2. Além disso, a sobrecarga do biodigestor pode fazer com que ocorra uma acidificação do meio, ocasionada pelas bactérias responsáveis pela degradação dos grandes polímeros, por possuírem uma atividade com maior formação de ácidos orgânicos (RIZZONI *et al.*, 2012).
- Quantidade de água: O biodigestor funciona por carga hidráulica e, portanto, necessita de certa quantidade de água para funcionar. Por isso, matérias orgânicas com baixa umidade necessitam de um acréscimo de água (de acordo com o tipo da matéria) para que atinja uma relação propícia. Em geral a quantidade de água no biorreator deve oscilar entre 60% e 90% da massa do conteúdo total, tanto o excesso, quanto a falta de água são prejudiciais ao rendimento (COSTA, 2006).
- Quantidade de matéria seca (MS): Para que a produção de metano ocorra de forma satisfatória é necessário que a concentração de matéria seca seja de 7 a 9%, isto é, a cada 100,0 litros de biomassa deve haver uma média de 8,0 kg de MS, para digestores contínuos (OLIVEIRA, 2009).
- Concentração de nutrientes: A presença de alguns macronutrientes como o carbono, nitrogênio, potássio, fósforo e enxofre, alguns micronutrientes minerais, vitaminas e aminoácidos são indispensáveis para o desenvolvimento das arqueas metanogênicas, sendo assim, o conhecimento da composição química e o tipo de biomassa utilizada são importantes (OLIVEIRA, 2009).

A presença excessiva de alguns elementos pode ainda acarretar em uma toxicidade do meio, inviabilizando o processo. Com relação aos compostos que conferem toxicidade ao meio, inibindo ou eliminando o crescimento e atividade microbiana, podem ser citados cátions de sais inorgânicos dissolvidos (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , dentre outros), amônia, sulfeto, metais

pesados, outras toxinas inorgânicas (cianeto) e orgânicas (detergentes e pesticidas) (BRITO, 2011).

A metanogênese é a fase mais crítica e mais lenta da biodigestão, é extremamente influenciada pelas condições de operação, como temperatura, composição do substrato, taxa de alimentação, tempo de retenção, pH, concentração de amônia entre outros. Esta etapa é realizada por bactérias estritamente anaeróbias obrigatórias, conhecidas com *Archaea methanogens*. Elas desempenham um papel de fundamental importância na produção de biogás. Todas as metanogênicas conhecidas produzem a enzima metil coenzima M redutase (MCR) que catalisa o passo final na produção de metano durante a fermentação anaeróbica da biomassa (RODRIGUES, 2012).

A quantidade de biogás produzida depende, entre outros fatores, da tecnologia empregada na digestão e do substrato (TOLMASQUIM, 2016). Bochmann e Montgomery (2013) afirmam que quando a composição do substrato e a tecnologia de pré-tratamento são adequadas, a biodisponibilidade do substrato aumenta. Isso pode levar a uma melhor performance de reatores de biogás em termos de rendimento de gás e taxa de degradação durante a digestão anaeróbia.

Sambusiti (2013) defende que a digestão anaeróbica de materiais lignocelulósicos é limitada pelo passo de hidrólise biológica, bem como pela acessibilidade de compostos biodegradáveis (celulose e hemiceluloses). De acordo com a autora, várias características de composição e estrutura podem afetar a hidrólise e a acessibilidade da celulose. Entre esses parâmetros, há o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, a estrutura das hemiceluloses, o teor e composição da lignina, o teor de pectinas, a área superficial acessível e o volume dos poros. Todos esses parâmetros devem ser considerados ao se propor uma planta de biodigestão. Assim, para obter altos rendimentos anaeróbicos de biodegradação, os substratos lignocelulósicos devem primeiro ser pré-tratados.

Diversos pré-tratamentos podem ser utilizados para aumentar a biodegradabilidade dos materiais lignocelulósicos (moagem, pirólise, hidrólise ácida e/ou alcalina, explosão a vapor, hidrólise enzimática, dentre outras). Cada pré-tratamento deve ter seus parâmetros operacionais estudados (tempo de reação, temperatura, pressão e concentração do catalizador) para maximizar a produção de açúcares, aumento de acessibilidade ou remoção de lignina, e minimização da produção de compostos recalcitrantes ou tóxicos (Vázquez *et al.*, 2007, Petersen *et al.*, 2009).

O biogás pode ser consumido diretamente, situação em que apresenta poder calorífico entre 4.500 e 6.000 kcal/m³, ou tratado para separação e aproveitamento do metano, cujo po-

der calorífico é semelhante ao do gás natural. Porém, de acordo com Brondani (2010), esse poder calorífico do biogás, que depende da porcentagem de metano, pode ser muito maior. Segundo ele, o biogás altamente purificado pode alcançar 12000 kcal/m^3 . Um metro cúbico de biogás equivale à:

- 0,613 litro de gasolina
- 0,579 litro de querosene
- 0,553 litro de Diesel
- 0,454 litro de gás de cozinha
- 1, 536 quilograma de lenha
- 0,790 litro de álcool hidratado
- 1,428 KW de eletricidade.

2.6. Tratamento enzimático para substrato na produção de biogás

Enzimas são compostos proteicos que atuam como catalisadores de reações químicas. Kipper (2013) explica que as enzimas são componentes orgânicos fundamentais dos seres vivos tais como plantas, animais e microrganismos. Além de atuarem como catalisadores biológicos, elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem, e por isso são exploradas comercialmente nos mais diversos segmentos da indústria.

Cysneiros *et al.* (2013), no entanto, advertem que ainda que as enzimas sejam catalisadores eficientes em sistemas biológicos, sua atividade é influenciada por uma série de fatores, tais como o pré-tratamento do substrato, pH, temperatura, além de sofrerem influência de substâncias que podem atuar ativando ou inibindo sua atividade. A essas substâncias denominam-se ativadores e inibidores enzimáticos, respectivamente. Os inibidores enzimáticos são substâncias que diminuem a atividade da enzima, de maneira reversível ou irreversível, por mecanismos que não envolvem a desnaturação da mesma.

Kipper (2013) argumenta que a eficiência das enzimas é medida em termos da sua atividade. A atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que converte em produtos uma determinada quantidade de substrato por unidade de tempo. Esse parâmetro é muito importante quando se pretende implantar um processo com a utilização de enzimas.

As enzimas são sintetizadas por células vivas e atuam em quase todas as reações químicas do metabolismo dos organismos vivos. Como são catalisadoras, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram seu equilíbrio químico.

Para isso, vale lembrar que a na constituição das fibras da cana energia estão presentes principalmente a celulose, hemicelulose e lignina. Conforme Pereira (2013), o principal componente da biomassa vegetal é a lignocelulose, constituída pela celulose, hemicelulose e lignina, presentes na parede das células vegetais; compreendendo mais da metade do peso seco das plantas. De acordo com o autor, somente uma pequena porcentagem destes polímeros, gerados como subprodutos da atividade agrícola é aproveitada. Muitos microrganismos produzem um complexo de enzimas extracelulares que degradam a fração de celulose e hemicelulose da lignocelulose possibilitando o aproveitamento da fração de celulose e de hemicelulose como fonte de carbono e energia.

Romano *et al.* (2009) analisaram o efeito de adição de enzimas na digestão anaeróbica de um tipo de gramínea (*Agropyron elongatum*). A adição de enzima mostrou um impacto positivo na solubilização do substrato. Resultados semelhantes foram encontrados por Frigon *et al.*, (2012) utilizou uma gramínea em seu estudo; Badshah *et al.*, (2012) bagaço de cana de açúcar e Sambusiti (2013) utilizou sorgo e palha de trigo, utilizando enzimas variadas.

Outros autores, entretanto, não encontraram vantagem no pré-tratamento enzimático. Citam-se Ellenrieder *et al.* (2010) e Parawira (2012). Porém ambos sugerem que as pesquisas nessa área têm que continuar, a fim de confirmar ou não a aplicabilidade desse pré-tratamento.

Conforme Dodd e Cann (2009), uma das principais limitações para a conversão eficiente de biomassa vegetal em biocombustíveis é a natureza recalcitrante da parede celular da planta, composta principalmente de materiais lignocelulósicos. Romper essa barreira natural de fibras da parede celular é o primeiro passo na produção do biogás.

Pereira (2013), Bortolazzo (2011) e Melo (2010) sintetizaram as principais características dessas três frações da biomassa. Segue-se então suas principais peculiaridades.

2.6.1. Componentes da parede celular vegetal

De acordo com Martinez *et al.* (2009), lignocelulose é o nome dado ao material presente na parede celular da maioria das plantas terrestres, constituídos de celulose embebido numa matriz amorfa de hemicelulose e lignina. Estes três tipos de polímeros se apresentam fortemente ligados um ao outro e representam mais de 90% do peso seco da célula vegetal. Vários fatores influenciam a quantidade desses polímeros, como a espécie, época de colheita e, também, ao longo de diferentes partes da mesma planta. Rosseto (2012) elucida a composi-

ção da parede celular vegetal (Figura 5). Segundo o autor, para que a biomassa lignocelulósica possa ser utilizada em processos de fermentação e/ou biodigestão, a celulose (insolúvel) deve ser decomposta em unidades menores de açúcar (solúvel). Nesse esquema é possível verificar que celulose está envolvida por uma rede de proteção formada pela hemicelulose e lignina. Sendo assim, para que ela seja acessada, é necessário romper essa rede de proteção que a envolve.

Ferreira *et al.* (2009) afirmam que as hemiceluloses estão intimamente associadas à celulose, definindo as propriedades estruturais na parede celular além de desempenhar funções na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. A Figura 6 mostra as estruturas parciais dos componentes lignocelulósicos.

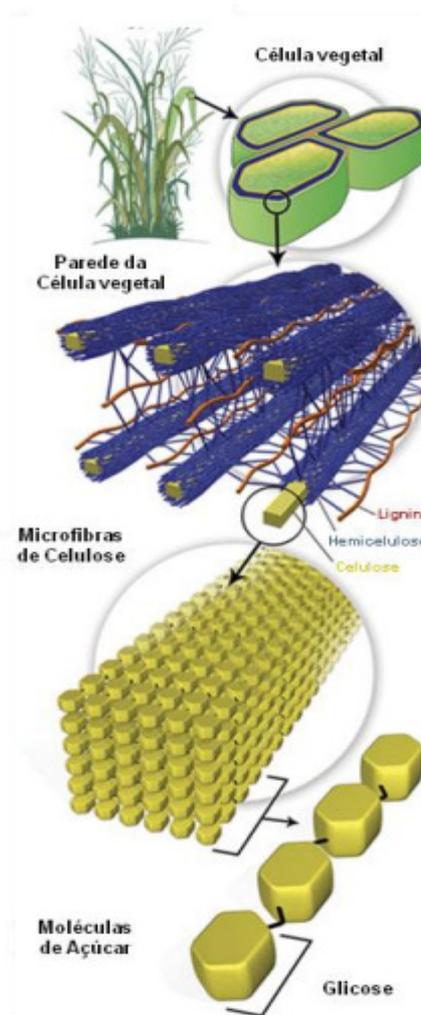


Figura 5. Representação esquemática da composição e arranjo da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular dos vegetais (ROSSETO, 2011).

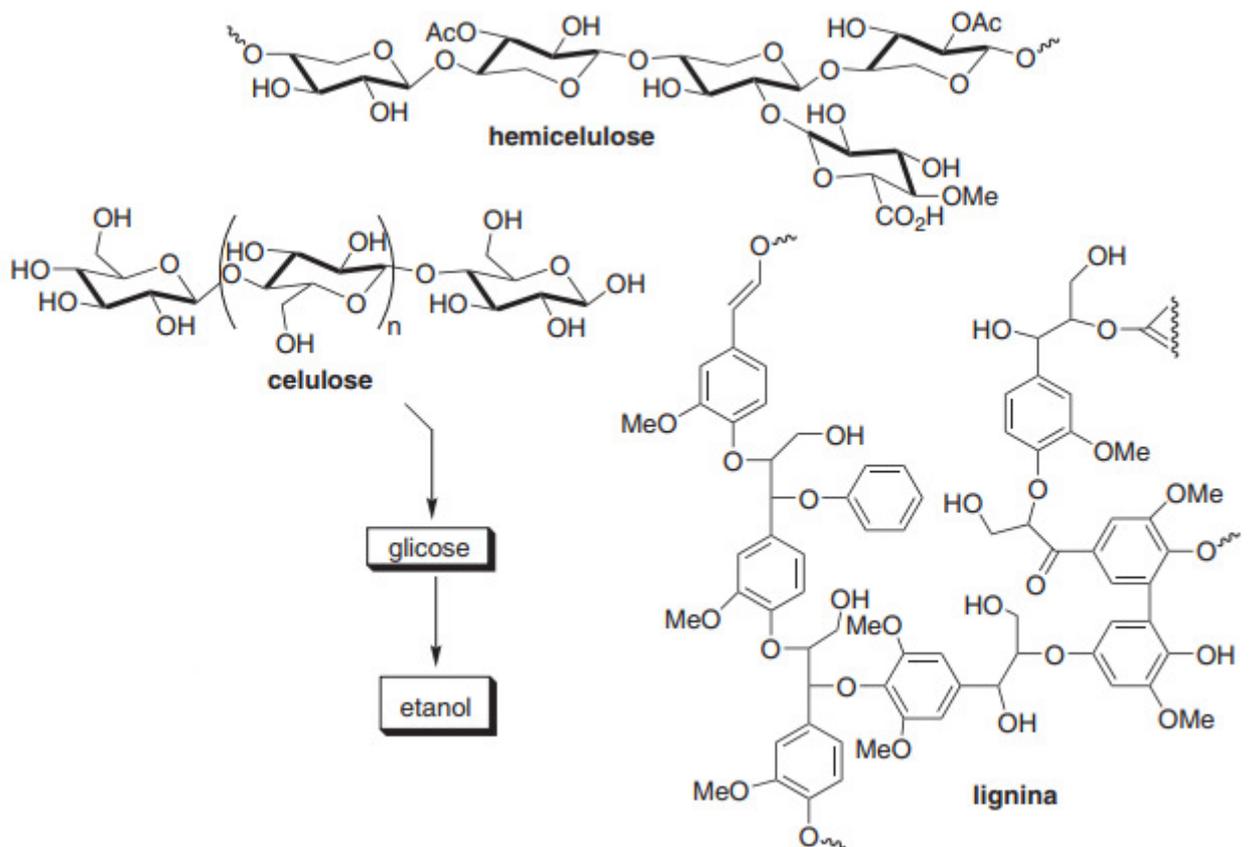


Figura 6: Estrutura dos componentes lignocelulósicos da parede celular dos vegetais. Fonte Ferreira *et al.*, 2009 (Figura adaptada).

2.6.1.1. Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o principal constituinte estrutural das células vegetais, representando 35 a 50% do peso seco das mesmas. Seu papel é exclusivamente estrutural, conferindo à célula proteção osmótica e resistência mecânica (PEREIRA, 2013).

Há estimativas de que cerca de 50 bilhões de toneladas deste composto químico são produzidas por ano. Ela está presente também em bactérias e algas, mas em pequenas proporções, estando localizada principalmente na parede secundária das células vegetais (MELO, 2010). Ela é composta de cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações β -1,4 com alto grau de polimerização e elevada massa molar, principalmente, em sua forma cristalina que confere a alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas (BORTOLAZZO, 2011).

Aproximadamente cem unidades de glicose formam microfibrilas que se empacotam ou se conectam por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por forças de Van der Waals, formando fibras rígidas e insolúveis. As microfibrilas apresentam regiões onde as

fibras se encontram ordenadas, apresentando alto grau de cristalinidade, denominada região cristalina e regiões onde as fibras estão mais distantes entre si, apresentando-se menos compactas, denominada de região amorfa (MELO, 2010). Além das regiões amorfas, as fibras de celulose apresentam irregularidades, falhas e microporos que aumentam a superfície de contato da celulose com outras moléculas como a água e enzimas.

2.6.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é uma mistura de polímeros polissacarídeos de baixa massa molecular, onde estão associadas com a celulose nos tecidos das plantas (PEREIRA, 2013). Encontra-se em associação com a celulose na parede das células vegetais. É formada por heteropolissacarídeos, contendo diferentes resíduos de carboidratos: D-xilose, D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, L-raminose ácido D-galacturônico e ácido D-glicurônico, sendo, normalmente, formada por 2 à 6 açúcares diferentes, unidos na maioria por ligações do tipo β -1,4 (MELO, 2010). Por esse motivo, o termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes poliméricos com propriedades peculiares.

Algumas unidades de açúcares possuem cinco carbonos e outras seis, denominadas respectivamente de pentose e hexose que, quando condensadas, recebem o nome de pentosana e hexosana, com fórmula geral $(C_5H_8O_4)_n$ e $(C_6H_{10}O_5)_n$ respectivamente, onde n é o grau de polimerização (PEREIRA, 2013).

Estruturalmente, as hemiceluloses são mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, proporcionando flexibilidade e estabilidade ao conjunto (RAMOS, 2003). Comparada as celulosas, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos.

As hemiceluloses são classificadas de acordo com a identidade dos principais açúcares presentes, como glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas (MELO, 2010). A xilana é a principal hemicelulose presente na parede celular das plantas, sendo, após a celulose, o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza. Em plantas, situa-se entre a lignina e as fibras de celulose, formando ligações covalentes com a lignina e ligações de hidrogênio com as fibras de celulose (MELO, 2010).

Ainda de acordo com Melo (2010), a xilana é a principal classe de hemicelulose, e por ser heterogênea e complexa, para que seja eficientemente hidrolisada, requer uma ampla

variedade de enzimas, que devem agir em conjunto, para convertê-la em unidades de xilose. Conforme Pereira (2013), a cadeia principal da xilana é formada por unidades de 1,4 β -D-xilanopiranosil que podem ser substituídas em vários graus por 4-O-metil-D-glucuronopiranosil, α -L-arabinofuranose e grupamento acetil. Terrasan (2007) acrescenta que a xilana, na natureza, devido a sua heterogeneidade estrutural, é completamente hidrolisada pela ação sinérgica de diferentes enzimas, incluindo xilanases e β -xilosidases, responsáveis pela degradação da sua cadeia principal e outras enzimas chamadas auxiliares ou desramificantes, importantes para remoção dos grupos laterais. E entre essas enzimas auxiliares destacam-se as α -L-arabinofuranosidases, responsáveis pela remoção de resíduos L-arabinofuranosil do polímero.

Segundo Dodd e Cann (2009), a hidrólise completa dos dois principais componentes, celulose e xilano, de gramíneas perenes (como a cana energia), libera glicose, xilose e arabinose, que podem então ser fermentados ou bioconvertidos para biocombustíveis. O terceiro componente principal, a lignina, é um polímero fenólico que se associa aos polissacarídeos das paredes celulares da planta, principalmente por meio de ácidos ferúlico e cumárico.

2.6.1.3. Lignina

De acordo com Melo (2010), a lignina é uma substância química que confere rigidez à parede da célula, gerando uma estrutura resistente a impacto, compressão e dobra. A lignina também contribui para impedir a penetração de enzimas destruidoras da parede celular e resistem ao ataque de micro-organismos.

Ela é um polímero, cuja estrutura tridimensional não uniforme, é composta basicamente de unidades de fenil propano (PEREIRA, 2013). De acordo com Bortolazzo (2011), ela é geralmente mais resistente à decomposição biológica que os outros biopolímeros principais encontrados em resíduos de planta, por causa de sua estrutura química. A taxa de decomposição da lignina é lenta comparada com a celulose e hemiceluloses. Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material.

Conforme Sanchez (2009), a lignina encontra-se ligada a celulose e hemicelulose formando um laço físico, constituindo dessa forma, uma barreira impenetrável na parede celular da planta, servindo de suporte estrutural, conferindo impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. Ela consiste de um heteropolímero amorfo, não solúvel em água, e possui na sua estrutura 9 átomos de carbono derivados de álcool cinamil

substituído, que são cumaril, coniferil e álcool siringil. As ligninas são altamente ramificadas, não cristalinas, com estrutura e composição química variando de acordo com a fonte de origem.

A lignina provém da polimerização desidrogenativa dos seguintes álcoois: álcool trans-coniferílico; álcool trans-sinapílico e álcool trans-paracumárico. Também podem possuir em sua estrutura, ácidos carboxílicos aromáticos na forma de éster (MELO, 2010).

De acordo com Ogata (2013) durante o desenvolvimento das plantas, a lignina é incorporada como o último componente da parede celular, interpenetrando as fibrilas, acarretando no fortalecimento da parede. Tem como principais funções o transporte de água, nutrientes e metabólitos, a resistência mecânica dos vegetais e proteção dos tecidos contra o ataque de patógenos e/ou pragas.

Segundo Barreto e Menezes (2015), existem quatro principais grupos de enzimas que auxiliam no processo de degradação da lignina, e que são produzidas pelos fungos degradadores da madeira: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), peroxidase versátil (PV) e lacase (Lac). Neste trabalho será utilizada apenas a enzima lacase como degradadora de lignina.

2.6.1.4. Pectina

Pectinas ou poliuronídeos são geralmente considerados polissacarídeos ricos em ácido galacturônico que ocorrem na lamela média e em outras membranas da parede celular. De um modo geral, são constituídas por polímeros lineares de ligações α -(1 \rightarrow 4) de ácido galacturônico (aproximadamente 65% da cadeia- domínio homogalacturonana) e resíduos de ramnogalacturonanas I e II, que consistem de unidades de ácido galacturônico alternadas com unidades específicas de ramnose [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(\rightarrow)]. Nesta região ocorre perda da linearidade, devido a leves dobraduras da cadeia principal. Ainda os resíduos de ramnose carregam outros açúcares como D-galactose, D-arabinose, D-fucose, 2-O-metilfulcose, D-apiose e outros que variam em proporções dependendo da sua fonte (PAIVA *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos pécticos parecem ser importantes no controle da porosidade da parede, na adesão de células subjacentes e no controle do ambiente iônico da parede celular. Análises de mutações que alteram a estrutura de uma das cadeias de pectina, a ramnogalacturonana II, indicam que alguns tipos de ligações pécticas tem importância também sobre o reforço da parede, a aderência intercelular e o crescimento normal em plantas vasculares (CANTERI *et al.*, 2012). Outra função está ligada aos mecanismos de defesa vegetal. O ácido

galacturônico, unidade básica da pectina, é um componente essencial de elicitores ativos da parede celular, substâncias que provocam o acúmulo de fitoalexinas com propriedades anti-bióticas nos locais de infecção vegetal.

2.6.2. Enzimas degradadoras da parede celular

Enzimas são proteínas que têm a propriedade de catalisar transformações de moléculas orgânicas em condições brandas de reação. A enzima, uma vez sintetizada, poderá atuar independentemente da célula que a produziu, desde que o pH, a temperatura e o substrato, entre outros fatores, sejam adequados. As enzimas apresentam características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos, sendo relevantes as vantagens de conversões enzimáticas nos processos industriais (BISTRATINI, 2016).

Existem vários tipos de enzimas que degradam a parede celular. No presente trabalho o enfoque serão apenas as celulases, hemicelulases e as lacases.

2.6.2.1. Celulases

Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose. No caso das celulases, três enzimas fazem parte desse grupo: as endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases (CASTRO e PEREIRA, 2010). As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam oligossacarídeos. As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que são compostos menores, formados por duas unidades de glicose. As beta-glicosidases quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando unidades de glicose (livres) (RODRIGUES, 2014). No entanto, para o presente trabalho, não se utilizou enzimas do tipo celulase. Isso por que a intenção do pré-tratamento enzimático não era solubilizar completamente a celulose, mas apenas desestruturar a parede celular, para verificar se o procedimento afetaria positivamente a produção de biogás no biodigestor.

2.6.2.2. Hemicelulases

Passarinho (2014) afirma que vários microrganismos são ativamente envolvidos na degradação da hemicelulose e as enzimas que a hidrolisam são referidas como hemicelulases. De acordo com a autora, sua definição e classificação estão de acordo com o substrato em

que agem e são enzimas do tipo glicosil hidrolases (GHs). Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, a sua completa hidrólise requer uma ampla variedade de enzimas agindo cooperativamente para convertê-la em unidades de xilose. Assim, bactérias e fungos que degradam xilana desenvolveram diversas máquinas enzimáticas para a hidrólise do xilana, e a evidência é facilmente obtida das sequências do genoma de tais organismos (Dodd e Cann, 2009).

Rodrigues (2014) afirma que a característica heteropolissacarídica das hemiceluloses torna complexo o mecanismo de ataque enzimático. Das enzimas conhecidas, as endoxilanases são as mais estudadas. Para degradação da xilana são necessárias basicamente seis enzimas diferentes. As endo-1,4- β -D-xilanases hidrolisam aleatoriamente o esqueleto de xilana, enquanto as β -D-xilosidases produzem os monômeros de xilose a partir da hidrólise das extremidades não redutoras de xilo-oligossacarídeos e da xilobiose. Além delas, Falkoski *et al.* (2012) citam as α -L-arabinofuranosidases, que atuam no processo de despolimerização da hemicelulose. A função destas enzimas é hidrolisar e remover os fragmentos hemicelulose que revestem as fibras de celulose, aumentando assim a acessibilidade à celulose e consequentemente estimulando a ação de celulases.

As α -L-arabinofuranosidases, também chamadas de ABFases (SOUZA, 2012), podem ser produzidas por micro-organismos, como bactérias e fungos, sendo essencialmente enzimas extracelulares. Sua produção é influenciada pela fonte de carbono e composição do meio de cultura. A ação dessas enzimas acelera a hidrólise de ligações glicosídicas em mais de 1017 vezes, constituindo um dos catalisadores conhecidos mais eficientes.

A função de ABFases na desconstrução da xilana é remover cadeias laterais de arabinose do esqueleto de xilose de arabinoglucuronoxilano. Estas enzimas são agrupadas em quatro famílias diferentes (GH 43, 51, 54 e 62) e podem hidrolisar ligações glicosídicas com inversão líquida (GH 43) ou retenção (GH 51, 54) de configuração estereoquímica no carbono anomérico. (DODD E CANN, 2009).

Uma das atividades enzimáticas de importância crítica necessárias para a despolimerização da xilana é a atividade das endoxilanases (Figura 7). Essas enzimas clivam a ligação glicosídica β -1,4 entre os resíduos de xilose na espinha dorsal dos xilanos (DODD E CANN, 2009). Assim a remoção da xilana, por endoxilanases e ABFases abrem a malha de fibras da lignocelulose e aumentam o acesso da celulose.

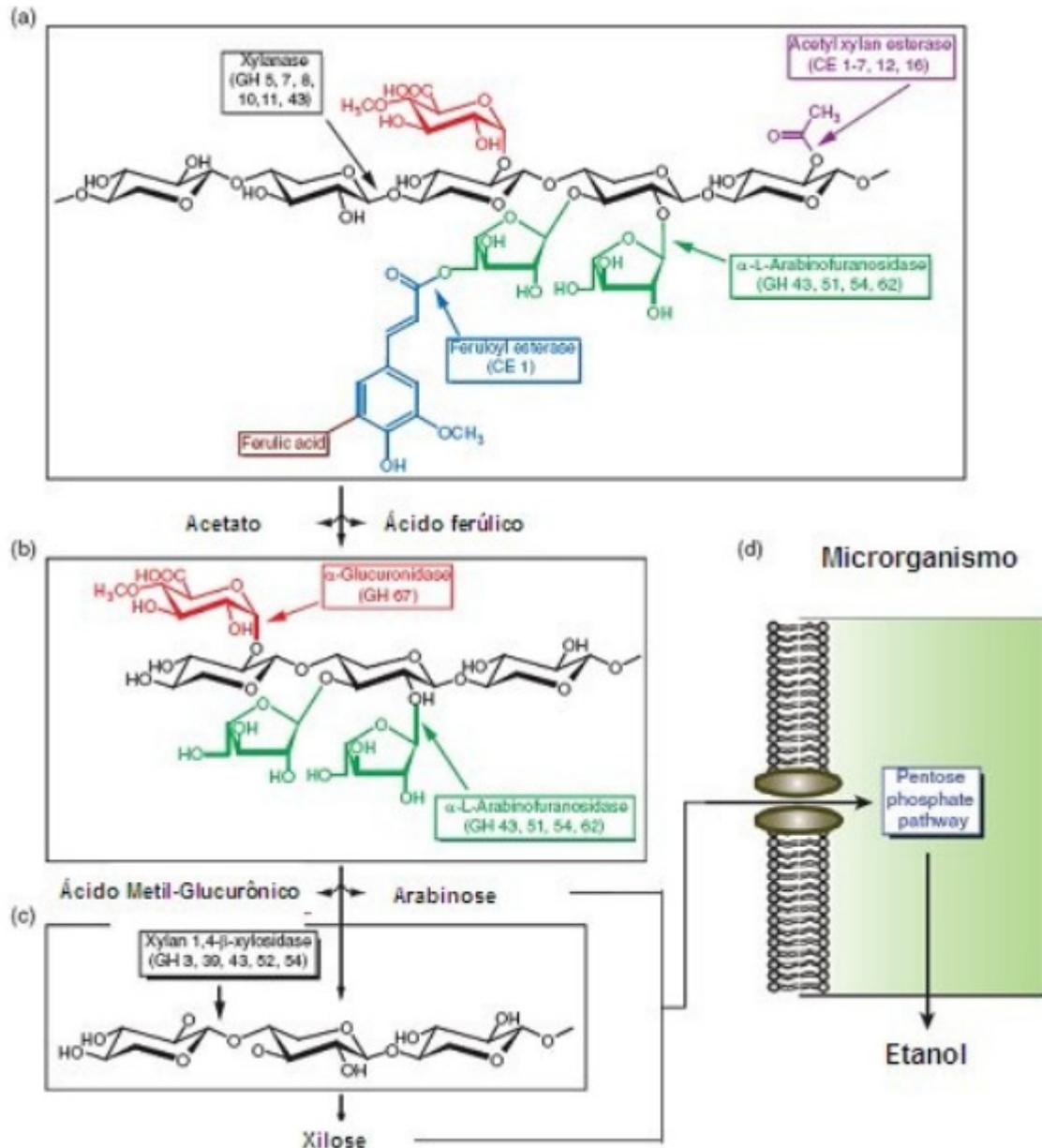


Figura 7 - Fluxograma esquemático representando a coordenação das enzimas xilanolíticas na desconstrução da hemicelulose visando à produção de biocombustíveis. (a) Xilanases, acetil-xilana-esterases e feruloil-esterases atuam em conjunto para produzir xilo-oligossacarídeos substituídos com a concomitante liberação de ácido ferúlico e ácido acético. (b) Arabinofuranosidas e glucuronidas, em seguida, liberam arabinose e ácido glucurônico destes xilo-oligossacarídeos. (c) As xilosidas convertem o xilo-oligossacarídeos em seus açúcares constituintes, xilose. (d) Microrganismos fermentativos selecionados podem finalmente utilizar os açúcares xilose e arabinose para produção de etanol (Fonte: FARINAS, 2011).

Lucena Neto & Ferreira Filho (2004) mostraram que xilanase de *H. grisea* foi mais ativa em intervalos de pH de 4,5-6,5. Resultado encontrado também por Cysneiros *et al.* (2013). Já a temperatura ótima para a ação das xilanases é de 50 °C (CYSNEIROS *et al.*, 2013). As ABFases no entanto agem bem em temperaturas ainda mais elevadas (até 70 °C) (SOUZA, 2012).

A principal hemicelulose do bagaço da cana de açúcar é a arabinoxilana, constituída de uma cadeia central de xilose com ramificações de arabinofuranose. Segundo Crivelari (2012), a arabinoxilana representa entre 25% a 33% da parede celular de cana-de-açúcar. Alguns tipos de ramificações, além de monossacarídeos, podem estar ligadas às arabinoxilanas, entre elas radicais metila, ácido ferúlico e ácido paracumárico. Acetilação pode ocorrer diretamente na cadeia principal, enquanto os compostos fenólicos se ligam à arabinose. Pode haver nas ramificações com ácido ferúlico, a formação de diferulatos, que ligam duas cadeias de arabinoxilanas covalentemente. Os ácidos ferúlicos são considerados como os iniciadores da formação da lignina na parede celular (BUANAFINA, 2009).

2.6.2.3. Lacases

A lacase foi inicialmente estudada no Japão na seiva da árvore da laca japonesa *Rhus vernicifera* e foi descrita pela primeira vez em 1883 (ALVES, 2011). A lacase é uma polifenoloxidase de natureza glicoproteica, que catalisa a oxidação de compostos não fenólicos, polifenóis e outros compostos. Ela é produzida por alguns fungos da podridão branca tais como *Lycoperdon* sp., *Coriolus versicolor*, *Phellinus ignarius* (CONCEIÇÃO, 2010). Além desses destacam-se os pertencentes aos gêneros *Pleurotus* sp. e *Pycnosporus* sp., muito utilizados em pesquisas com indução de lacases (GARCIA, 2006; MENEZES *et al.*, 2009; GOLVEIA, 2016). Isso está de acordo com Aguiar Filho (2008), que explica que as lacases são produzidas por fungos e também por plantas. São produzidas pela maioria dos Basidiomicetos e catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos (mono-, di- e polifenóis, aminofenóis e metoxifenóis) gerando radicais fenoxilas, e com concomitante redução de oxigênio para água.

A maioria das diferentes lacases conhecidas apresentam: I) massa molecular (MM) na faixa de 60-100 kDa. II) apresentam-se na forma de 2 ou 3 isoenzimas, em geral denominadas La (ou lcc) I, II e III. III) possuem estrutura de glicoproteína, com 15-20% de conteúdo relativo de carboidratos IV). Todas as lacases conhecidas contém cobre, os quais apresentam um número de oxidação 2⁺ (SILVA, 2006). Tais átomos de cobre estão diferen-

temente coordenados, podendo assim ser distinguidos três tipos ou estados de coordenação denominados tipo T1, T2 e T3, sendo que este último é constituído por um par de átomos de cobre, de acordo com suas diferentes propriedades e características específicas (FARIA, 2010). A Figura 8 mostra o modelo da lacase com centro ativo contendo o cobre.

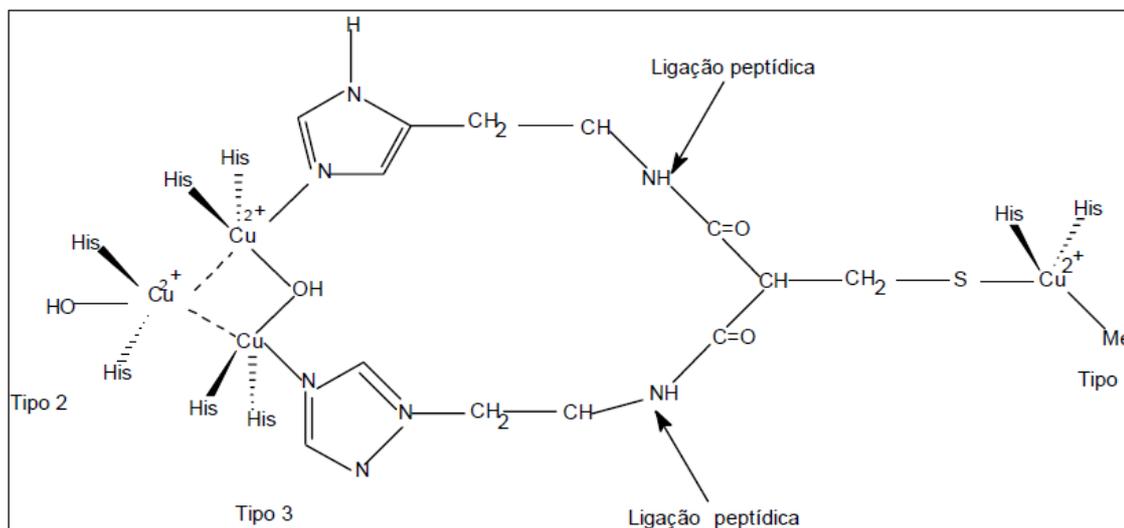


Figura 8: Enzima lacase, com destaque para o seu sítio ativo com cobre (Cu).

O ciclo catalítico desta enzima envolve portanto sucessivas transferências de um elétron entre os átomos de cobre, podendo ser distinguidas duas etapas, uma anaeróbia (reduzora) e outra aeróbia (oxidante). O mecanismo de oxidação do substrato é via retirada de um elétron com a formação inicial de fenoxi-radical e cátion radical, os quais subsequentemente podem reagir através de mecanismos não enzimáticos (Figura 9). Neste caso, são frequentes as reações de acoplamento radical-radical, desproporcionamento, retirada de próton e ataque nucleofílico à H₂O.

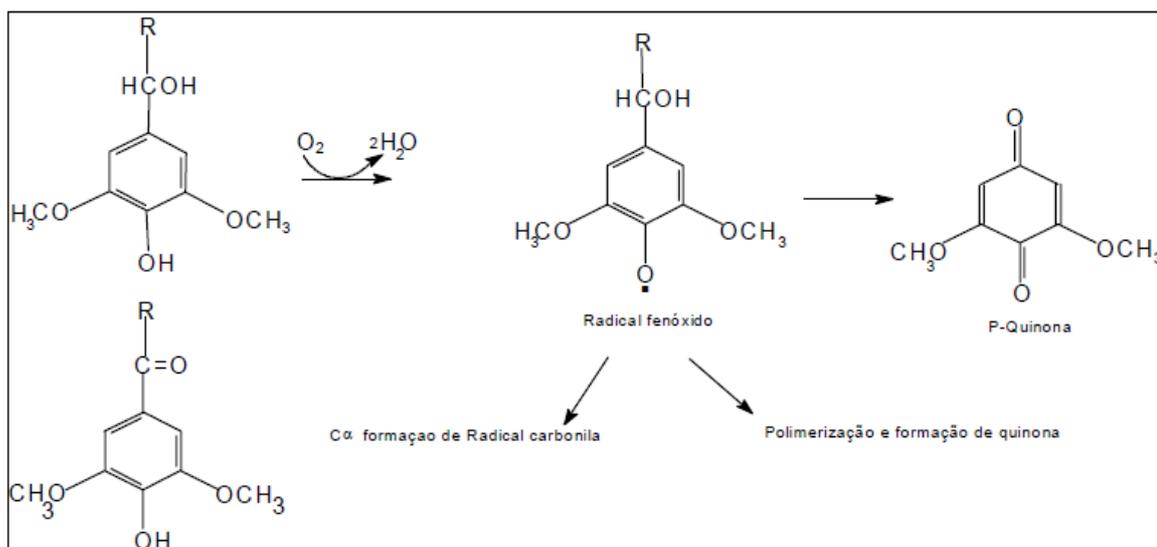


Figura 9: Mecanismo de ação da lacase

Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (SILVA, 2006). Entre a diversidade de compostos oxidados pela lacase, a oxidação da seringaldazina na ausência de H_2O é típica para identificação de lacase, sendo portanto utilizada na determinação da atividade enzimática. A seringaldazina é um substrato fenólico dimetoxilado apresentando em sua estrutura dois átomos de nitrogênio ligados por uma dupla ligação (Figura 10). A reação com a seringaldazina gera inicialmente um radical livre. Em seguida, ocorre a liberação do segundo elétron através de reação enzimática, formando uma quinona de coloração púrpura intensa e que aparentemente não é propensa à polimerização.

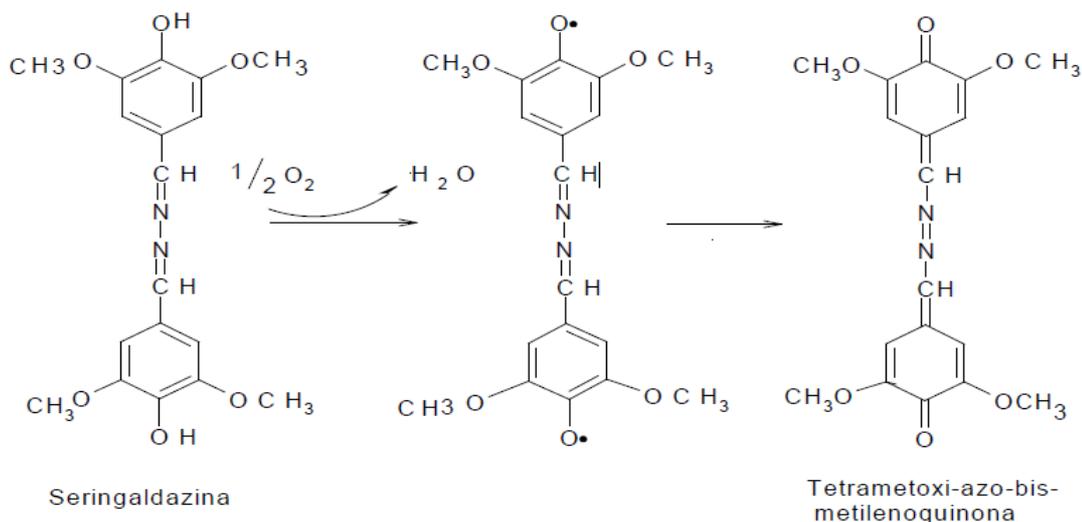


Figura 10: Reação de oxidação da seringaldazina até a formação de quinona. Fonte Silva (2006)

Garcia (2006) afirma que a lacase tem um potencial redox mais baixo que lignina peroxidase e manganês peroxidase e por isso oxida somente fragmentos fenólicos de lignina. Apesar disso, uma inclusão de substâncias oxidativas de baixa massa molar, conhecidas como mediadores, expande a atividade oxidativa desta enzima (ARANTES e MILAGRES, 2009). Um mediador é uma molécula de baixa massa que atua como um carregador de elétrons, compostos que podem ser oxidados por lacases, formando intermediários capazes de interagir com outros substratos que possuem potencial redox mais alto. Dessa forma, este processo pode levar um mecanismo de oxidação que não é possível para uma enzima sozinha, estendendo, assim, uma faixa de substratos oxidáveis.

As lacases são muito utilizadas na degradação da lignina, juntamente com outras enzimas. Pacheco e Soares (2014) afirmam que as lacases vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados, a produção de bioetanol, a clarificação de vinhos e chás e a produção de biossensores. De acordo com Golveia (2016), do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, patogênese, detoxificação, formação de pigmentos e degradação de lignina.

O pH e temperatura ideais de ação da lacase variam conforme o substrato a ser analisado. De um modo geral, O pH ótimo das lacases depende da diferença do potencial redox entre o substrato de redução e o cobre tipo 1 da lacase, este cobre se correlaciona com a taxa de transferência de elétrons sendo favorecido por um substrato fenólico com pH mais ácido (LACERDA, 2015).

A temperatura pode influenciar na cinética da reação enzimática por meio do aumento da velocidade da reação ou da desnaturação da enzima. Também de um modo geral, a temperatura ótima para a ação das lacases varia entre 20 e 50 °C (LACERDA, 2015).

2.6.3. Produção de enzimas

Fungos são considerados os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. Os principais fungos celulolíticos produtores de celulasas e xilanase incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*, *Chaetomium sp* e *Humicola sp* (BORTOLAZZO, 2011).

Já para a produção de lacases, os principais fungos utilizados são, de acordo com Baptista *et al.* (2012), *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium* spp., *Paecilomyces* spp., *Cunninghamella elegans*, *Candida* spp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp., *Aspergillus sclerotium* e *Mucor racemosus*. Além desses pode-se citar ainda os pertencentes ao gênero *Pycnoporus* sp. (Golveia, 2016) e *Pleurotus* spp. (ALEXANDRINO *et al.*, 2007).

O objetivo do pré-tratamento enzimático na biomassa da cana energia é melhorar o processo de obtenção de biogás, facilitando assim a ação das bactérias anaeróbias. Para isso, optou-se, a partir da análise da estrutura da lignocelulose da cana energia testar a ação e a sinergia de duas classes de enzimas: as hemicelulases, especificamente xilanase e arabinofuranosidade (ABFase), responsáveis pela degradação de parte da hemicelulose presente nas biomassas vegetais; e a lacase, responsável pela degradação de lignina.

Várias são as metodologias descritas para a produção de enzimas derivadas da ação de fungos. Para o presente estudo optou-se por seguir protocolos adotados por Golveia (2016) e Faria (2011).

3 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, no Laboratório de Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciência Biológicas, também da Universidade Federal de Goiás e nos laboratórios de Química do Instituto Federal de Goiás.

3.1.1. Caracterização da cana energia

A cana energia utilizada no experimento foi cedida pela empresa Vignis Bioenergia Ltda, que participa do projeto “*Biogás redutor de cana energia para redução de minérios lateríticos*”, em parceria com o Instituto Federal de Goiás (IFG). Trata-se de uma variedade de cana energia desenvolvida pela empresa, que foi entregue já triturada, com a identificação #26. Este material foi mantido sob refrigeração, a - 8°C, conforme protocolo do grupo de pesquisa em biogás, até seu uso.

Para que ela fosse caracterizada, optou-se pelo envio da mesma para análise dos teores de celulose, hemicelulose e lignina. O laboratório escolhido foi o CBO Análises Laboratoriais, com sede em Valinhos, Estado de São Paulo. A cana energia foi seca em estufa com circulação forçada de ar, a 40 °C, por seis dias. Após a secagem o material foi embalado e encaminhado para o laboratório citado, que realizou as análises, de acordo com os procedimentos de Nogueira (2005). Os resultados encontram-se nos anexos deste trabalho.

3.1.2. Produção de lacase

Para a produção de lacase, optou-se por seguir o protocolo adotado por Golveia (2016). Utilizou-se o fungo *Pycnosporus sanguineus* como produtor de lacase. Esse fungo é classificado como fungo causador da podridão branca da madeira, por eficientemente degradar a lignina. Isso se deve ao fato de produzirem diversas enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases e manganês peroxidase. Por isso optou-se pela utilização deste fungo.

Os equipamentos utilizados para a produção da lacase foram: estufa (TE-391, Tecnal), Shaker ou incubadora refrigerada com agitação (TE-421, Tecnal), Espectrofotômetro (SP-2000 UV meter, Spectrum).

Os materiais utilizados na seleção foram: Meio de cultivo sólido Batata Dextrose Ágar, Meio de cultivo líquido Caldo de Batata artesanal, 2,5- xilidina (2,5-dimetilanilina 99%, Sigma Aldrich), Seringaldazina (Syringaldazin 99%, Sigma Aldrich).

Como indutor da produção de lacase utilizou-se o fruto de cacau (*Theobroma cacao* L. Sterculiaceae), que passou por secagem em estufa de ar forçado, a 40 °C, por 6 dias. O processamento foi feito triturando-se o resíduo. Os resíduos secos e triturados foram armazenados em dessecadores até a sua utilização.

3.1.2.1. Origem e manutenção do fungo

A linhagem de *P. sanguineus* CCT 4518 foi obtida junto à Fundação André Tosello em Campinas-SP. O fungo foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Ágar), no escuro, à temperatura ambiente, armazenados a 4° C e repicados mensalmente para a manutenção das culturas.

3.1.2.2. Condições de cultivo para produção de lacase

O cacau foi utilizado na concentração de 1% (p/v.). Os resíduos foram acrescentadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 60 mL do meio de cultura CBD (Caldo de Batata Dextrose 0,5%/ Extrato de Malte 1%). O material foi autoclavado a 1 atm, a 120°C, por 20 minutos. Foram inoculados 5 discos de 6 mm, retirados do fungo crescido em meio sólido, sendo mantidos incubados à temperatura de 28 °C. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 150 rpm, por 7 dias.

3.1.2.3. Ensaio enzimático para atividade de lacase

Para acompanhar a atividade enzimática da lacase foi feito um acompanhamento, a partir da inoculação do fungo e a cada 24 horas. Para isso utilizou-se seringaldazina (Sigma Chemical Company) como substrato (SZKLARZ *et al.*, 1989).

Para o ensaio enzimático foram utilizados 10 µL de extrato bruto, 890 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,0) e 100 µL de seringaldazina 1,0 mmol.L⁻¹ preparada

em etanol. Inicialmente adicionou-se a seringaldazina, sendo feito o acompanhamento por 5 minutos a 525 nm em espectrofotômetro, à temperatura ambiente.

Para o branco foi misturado 10 µL do extrato bruto e 990 µL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0. A atividade enzimática foi determinada em triplicata. Para determinação do cálculo de atividade enzimática foi utilizada a Equação 1, descrita por Leonowicz e Grzywnowicz (1981) com modificações.

$$U = \frac{10^6 \times Abs}{\epsilon \times R \times t}$$

Equação 1

Onde:

Abs = Absorbância no comprimento de onda específico (nm);

ϵ = Coeficiente de extinção molar para cada substrato (L.mol.⁻¹.cm⁻¹);

R = Quantidade de extrato bruto (mL);

t = Tempo de reação (min).

Uma unidade U foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol.L⁻¹ de substrato por minuto. O resultado é expresso em U.mL⁻¹. A seringaldazina apresenta coeficiente de extinção molar $\epsilon = 525 \text{ nm} = 65000 \text{ L.mol.}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Após a produção, a enzima foi acondicionada em recipiente de vidro e guardada a 0 °C, para posterior utilização nos ensaios de hidrólise.

3.1.3. Produção de hemicelulases

Para a produção de hemicelulases optou-se por seguir o protocolo adotado por Faria (2011). A linhagem do fungo termofílico *Humicola grisea* var *thermoidea* utilizada no presente trabalho foi isolada de compostagem na Universidade Federal de Viçosa (MG) por Chaves (1982). Optou-se por esse fungo devido ao mesmo produzir um eficiente complexo de enzimas celulolíticas (endoglicanases, celobiohidrolases e β -glicosidases) e xilanolíticas (endoxilanases e β -xilosidase) com alta termoestabilidade quando cultivado em diferentes substratos lignocelulósicos (FARIA, 2011).

O fungo *H. grisea* foi mantido em meio Ágar Aveia (AA). Para a produção do meio AA utilizou-se farinha de aveia infantil (Quaker) 4,0 % (p/v) e Ágar 1,5 % (p/v). O fungo foi então semeado para a produção de esporos, incubado por 4 dias no escuro, a 42°C, e por mais 3 dias, na presença de luz, foi deixado à temperatura ambiente. Os esporos foram ressuspensos em solução salina 0,15 mol.L⁻¹ e contados em câmara de Neubauer.

Para a inoculação dos esporos do fungo o material lignocelulósico utilizado como substrato foi o farelo de trigo. Para o seu preparo, o farelo de trigo foi lavado em água corrente por 5 min, mantido submerso na água por 24 h. Ele foi então mantido a 50 °C por 3 h e posteriormente a 30 °C por 2 dias, para sua secagem. Após a secagem o substrato foi moído em moinho de facas e peneirado em peneira de 20 *mesh*.

Além disso, foi preparado o meio de cultura conhecido como Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et al.*, 1953). Para isso, fez-se uso dos seguintes reagentes: NaNO₃ a 0,6 % (p/v); KCl a 0,05 % (p/v); KH₂PO₄ a 0,15 % (p/v); ZnSO₄ a 0,001 % (p/v) e FeSO₄ a 0,001 % (p/v). O pH foi ajustado para 6,8.

Para a produção de enzimas foi utilizado 3,5 x 10⁵ de esporos /mL, inoculados em 100 mL de Meio Mínimo, acrescido de farelo de trigo a 3%, em enlenmeyers de 500 mL, a cultura foi mantida a 42 °C, sob agitação de 120 rpm por 24 h, para a produção da enzima ABFase e por 144 h para produção de xilanase. Após o período de agitação, o meio de cultura foi submetido a centrifugação por 20 min, a 4500 rpm e o sobrenadante de cultura coletado foi analisado quanto à atividade e xilanolítica pela metodologia de quantificação de açúcares reductores liberados pelo método DNS (MILLER, 1959). Para isso adicionou-se a 10 µL do sobrenadante enzimático a quantidade de 150 µL de DNS. As amostras foram então fervidas por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm.

A atividades da α -L-arabinofuranosidase foi determinada utilizando como substrato *p*-nitrofenil-L-arabinopiranosídeo (pNPA, Sigma N3641) e o *p*-nitrofenil-D-xilopiranosídeo (pNPX, Sigma N2132), respectivamente, na concentração de 5 mM. Os ensaios foram realizados em tampão citrato de sódio 50 mM, em pH 4,8. A mistura de reação, contendo 10 µL de sobrenadante de cultura, 100 µL de tampão e 40 µL de uma solução 5 mmol/L de pNPA ou pNPX, foi incubada por 5 min a 40 °C, a reação foi encerrada pelo resfriamento em banho de gelo e pela adição de 100 µL de uma solução de Na₂CO₃ 0,5 M, interrompendo a reação por deslocar o pH para o meio básico, onde as enzimas não apresentam mais atividade e por ser o pH onde o *p*-nitrofenol exibe coloração amarela.

Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de 4-nitrophenol/min, medida pela absorbância a 405 nm. A quantidade de *p*-nitrofenol (pNP) liberada foi determinada por leitura realizada por leitor automático de microplacas.

Após a determinação da atividade enzimática, as enzimas produzidas foram armazenadas para utilização nos ensaios de hidrólise.

3.1.4. Reações de hidrólise com cana energia (variedade #26)

A cana energia utilizada no experimento foi cedida pela empresa Vignis Bioenergia Ltda. Trata-se de uma variedade de cana energia desenvolvida pela empresa, que foi entregue já triturada, com a identificação #26. Mesmo assim, a cana passou por nova trituração em liquidificador doméstico, para diminuir o tamanho do substrato a ser hidrolisado.

Para que a cana energia fosse testada como substrato para a ação de lacase e hemicelulases, foi feito inicialmente um ensaio em duplicata. Para isso, foram propostos os seguintes tratamentos:

- 1 – Controle, sem a utilização de enzimas;
- 2 – Lacase;
- 3 – Hemicelulases (xilanase e ABFase);
- 4 – Lacase + Hemicelulases;
- 5 – Lacase e após um período de 24 h a adição de hemicelulases;
- 6 – Hemicelulases e após um período de 24 h a adição de lacase, conforme Tabela 1.

Para isso optou-se por utilizar 0,5 g de cana energia triturada, em um volume reacional de 5 mL, em uma proporção de 10 % de substrato de cana energia. Nas pesquisas com hidrólise de cana de açúcar geralmente trabalha-se com uma proporção de 3 % de substrato (como em FARIA, 2011). Porém, como o objetivo do trabalho é usar a cana energia, que tem um maior teor de lignocelulose, optou-se por elevar a concentração do substrato. O material a ser hidrolisado foi acondicionado em tubos falcon com tampa, com capacidade de 50 mL.

O volume de enzimas na reação foi determinado a partir da atividade enzimática de cada uma das enzimas. Além disso, foi utilizada como solução tampão o citrato de sódio (pH 4,8) a 50 mmol.L⁻¹ e água destilada, para completar o volume da reação.

Esta mistura foi colocada em shaker refrigerado para agitação a 120 rpm, a 36 °C, por 48 h. Porém, ao completar 24 h, a agitação foi cessada para a adição das enzimas lacase e hemicelulase, nos tratamentos em que foi proposto sua adição após o período de 24 h. Após adicionar as enzimas restantes, a agitação foi retomada sob as mesmas condições.

Tabela 1. Formulações enzimáticas utilizadas na hidrólise da cana energia

Ensaio	Substrato (cana energia #26) (g)	Enzima lacase (U/g de substrato)	Enzima xilanase (U/ g de substrato)	Enzima ABFase (U/ g de substrato)	Tampão (citrato de sódio) (%)	Água (mL – para completar o volume da reação)	Total (volume reacional (mL))
1 – Controle	0,5	0	0	0	10	4,5	5,0
2 – Lacase	0,5	200	0	0	10	4,382	5,0
3 – Hemicelulases	0,5	0	200	0,16	10	0,121	5,0
4 - Lacase + Hemicelulases	0,5	200	200	0,16	10	0,003	5,0
5 - Lacase (e após 24 h adição de hemicelulases)	0,5	200	200	0,16	10	0,003	5,0
6 - Hemicelulases (e após 24 h adição de lacase)	0,5	200	200	0,16	10	0,003	5,0

Terminado o período total de reação (48 h), os tubos falcon foram centrifugados a 4400 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi então analisado a partir das seguintes metodologias: DNS (Açúcares Redutores) e Teste de Glicose.

Para fazer a dosagem do teor de açúcares redutores totais (ART), foi feito ensaio pelo método DNS, incubando-se 50 μL da amostra, 450 μL de tampão citrato de sódio (pH 4,8, a 50 mmol.L^{-1}) e 750 μL de DNS a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min e realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm. Para a determinação do teor de ART, primeiro foi produzida uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL e de acordo com esta as absorbâncias foram convertidas em mg/mL de ART liberados.

Já o teor de glicose nas amostras foi determinado utilizando o kit de glicose oxidase (DOLES Reagentes $\text{\textcircled{R}}$) seguindo as orientações do fabricante. Para isso, as amostras, juntamente com as soluções padrões do kit de glicose foram incubadas por 5 minutos, a 36 $^{\circ}\text{C}$, e posteriormente feita a leitura espectrofotométrica a 510 nm. Para o cálculo da quantidade de

glicose no sobrenadante da hidrólise enzimática da cana energia, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de glicose (mg.dL}^{-1}\text{)} = (\text{Absorbância da amostra} / \text{média do padrão}) \times 100$$

Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas, definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto sobre as condições do experimento.

3.1.5. Reação de hidrólise em escala laboratorial

Para que o pré-tratamento enzimático fosse testado quanto ao potencial de produção de biogás, fez-se necessário repetir a hidrólise da cana energia, porém utilizando uma quantidade de substrato bem maior que a utilizada até então. Para isso, buscou-se apenas ajustar os volumes, obedecendo o padrão utilizado no primeiro experimento. Para isso, a hidrólise foi testada apenas na situação mais favorável, que consiste da adição da lacase e após 24 h adicionando-se as hemicelulases.

A quantidade de cana energia necessária para a próxima etapa experimental é de 15 g. o experimento então foi feito em triplicata, tomando por base essa quantidade de cana energia, mantendo-se as proporções fixadas. Assim, para 15 g de cana energia, considerando-se uma proporção de 10 % de substrato, o volume reacional foi alterado para 150 mL. Para isso as reações se processaram em erlenmeyers de 2 L. Além disso, foi acrescentado na reação o antibiótico ampicilina, para impedir a contaminação do material por bactérias. O antibiótico foi escolhido por apresentar rápida degradação, e desta forma não iria interferir na etapa subsequente da pesquisa. De acordo com Santos Júnior (2015), a ampicilina é moderadamente solúvel em água, dissolve-se em soluções diluídas de ácidos e de hidróxidos de metais alcalinos.

A reação ocorreu nas mesmas condições da anterior: após a mistura, os erlenmeyers foram colocados em shaker refrigerado para agitação a 120 rpm, a 36 °C, por 48 horas. Porém, ao completar 24 horas, a agitação foi cessada para a adição das hemicelulases. Após adicionar as enzimas restantes, a agitação foi retomada sob as mesmas condições. Terminado o período de reação, o material foi colocado em tubos falcon, para que se fizesse a centrifugação e separação da fração sólida e sobrenadante. Os tubos falcon foram centrifugados a 4400 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi então analisado a partir da metodologia de DNS (Açúcares Redutores).

A fração sólida foi separada para utilização no experimento que mede o potencial de produção de metano.

3.1.6. Experimento com AMPTS II

Foi realizado, nas dependências do IFG, o teste do potencial da produção de metano, utilizando o equipamento AMPTS II - *Automatic Methane Potential Test System*, utilizando como substrato para a produção de biogás a cana energia que sofreu hidrólise, nas condições já descritas anteriormente (Figura 11).



Figura 11: AMPTS II: *Automatic Methane Potential Test System*. Fonte: AMPTS II, 2014.

O AMPTS II é um equipamento desenvolvido para medições on-line da produção de biogás e biometano a partir da digestão anaeróbia de qualquer substrato biológico degradável (tanto na forma líquida ou sólida) em escala de laboratório, sendo capaz de registrar baixos fluxos de metano. O equipamento é composto por três unidades principais (AMPTS II, 2014).

A unidade A (unidade de incubação de amostra) é formada por uma caixa suporte para 15 frascos (com capacidade de até 400 mL, cada frasco) para amostras incubadas a temperatura controlada: 35° C (banho-maria). Cada frasco pode ter seu conteúdo misturado por um agitador de rotação lenta, ou não. O biogás produzido é medido de forma contínua em cada frasco. A unidade B (unidade de fixação de CO₂) é composta por frascos contendo uma solução alcalina (NaOH), de coloração azul. Conforme o biogás é produzido, ele passa pela

unidade A individualmente e ao passar pela unidade B são retidos os gases ácidos, O₂ e H₂S, permitindo a passagem somente de CH₄.

A medição do volume de gás metano ocorre na unidade C, na qual o gás liberado pela unidade B é mensurado através de um dispositivo que verifica o fluxo de gás úmido através de um arranjo de células de fluxo (15 células). Um pulso digital é gerado quando um determinado volume de gás flui através do equipamento e, um sistema de aquisição de dados integrado é usado para gravar, exibir e analisar os resultados. (AMPTS II, 2014).

Cada frasco da unidade A é conectado a um frasco da unidade B que por sua vez é conectado a uma célula da unidade C. Os dados são enviados para um computador que possui um programa que manipula os dados.

As condições e os parâmetros específicos, referentes aos ensaios em batelada com agitação semicontínua, foram controlados e monitorados de acordo com padrões dispostos na norma alemã VDI 4630 (2006). Segundo a norma VDI 4630, se considera estabilizada a produção de biogás, final do ensaio, no momento que a produção diária de gás torna-se igual ou inferior a 1% do volume total produzido. Como controle positivo para o inóculo foi utilizado Celulose monocristalina de alta pureza (Sigma-Aldrich).

Tanto o inóculo quanto as amostras de cana energia hidrolisada e de cana energia sem hidrólise foram analisados quanto aos seus teores de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) seguindo-se a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), a fim de determinar as proporções necessárias de substrato e inóculo, em cada frasco reator. A montagem do teste foi realizada em triplicata, usando frascos reatores com inóculo (Lodo da Heinz - Nerópolis) e substrato (cana energia hidrolisada), totalizando o volume útil de aproximadamente 400 mL. Além disso, foi montada uma triplicata para controle contendo apenas o inóculo. Após colocação dos materiais nos reatores, foi feita a medição de pH. Finalmente foi feita aspersão de nitrogênio gasoso para garantir a remoção de oxigênio do meio.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Produção de enzimas

As enzimas lacase, xilanase e ABFase foram produzidas de acordo com as metodologias propostas. Para avaliar se o processo ocorreu da forma que se esperava, procedeu-se

a determinação de suas atividades enzimáticas. Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U.mL⁻¹. Uma unidade U foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol.L⁻¹ de substrato por minuto. Os valores obtidos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Atividade enzimática das enzimas lacase, xilanase e ABFase, em U.mL⁻¹

Enzima	Atividade Enzimática (1 ^a produção)/U.mL	Atividade Enzimática (2 ^a produção)/U.mL
Lacase	850	441
Xilanase	26	51
Arabinofuranosidase	0,08	0,53

Os resultados são semelhantes a outras produções encontradas na literatura, o que indica que os procedimentos de produção foram realizados de forma satisfatória.

3.2.2. Caracterização do substrato

O resultado da caracterização da cana energia está resumido na Tabela 2. Foram realizados dois testes de caracterização. Os valores encontrados diferem em comparação com a cana de açúcar comum, cujos resultados se encontram entre 22,7 a 25,8 % de hemicelulose, 19,01 a 31,4 % de lignina e 38,4 a 45,0 % de celulose (PITARELO, 2007; GOUVEIA *et al.*, 2009, CANILHA *et al.*, 2011 e RABELO *et al.*, 2011). No entanto Ogata (2013), ao comparar esses teores em 207 genótipos de cana de açúcar com alto teor de fibra, obteve variações que se enquadram nos resultados obtidos nesse experimento. Ela obteve os seguintes resultados: hemicelulose - de 16,71 a 25,97 %; lignina – de 17,70 a 27,12 % e celulose – de 26,47 a 54,18 %.

Tabela 3: Composição lignocelulósica da cana energia

Fração	1º teste	2º teste
Hemicelulose	17,80 %	21,51 %
Lignina	48,15 %	23,65 %
Celulose	6,28 %	28,58 %

3.2.3. Hidrólise enzimática em pequena escala

Após a realização da hidrólise a partir do substrato cana energia (variedade #26), nas condições descritas, executaram-se os testes de DNS (açúcares redutores totais - ART) e Glicose.

Para a determinação do teor de ART, primeiramente foi realizada uma curva padrão de xilose nas concentrações de 0,3 a 4,2 mg/mL e de acordo com esta as absorbâncias foram convertidas em mg/mL de ART liberados. Os dados obtidos foram colocados em planilha para que fosse feito o cálculo de rendimento em função da produção de açúcares redutores a partir de cada tratamento. A partir dos resultados obtidos, foi possível estimar o rendimento relativo dos tratamentos enzimáticos utilizados. Esse rendimento representa a quantidade de açúcares liberados após a reação enzimática, o que indica qual tratamento conseguiu promover maior quebra dos componentes da parede celular. A Tabela 4 apresenta o rendimento de açúcar solubilizado após a hidrólise da cana energia variedade #26.

Tabela 4: Rendimento de ART e glicose após a hidrólise da cana energia variedade #26

Tratamento	Rendimento em mg de ART/ g de cana energia	Rendimento relativo (em comparação com os demais tratamentos)	Teor de glicose em g/g de cana energia
1 – Controle (sem enzimas)	0	0	0,0692
2 - Lacase	0	0	0,0418
3 – Hemicelulases (xilânase e ABFase)	15,30	35,69 %	0,0350
4 – Lacase + Hemicelulases (xilanase e ABFase) – reação simultânea	14,10	32,85 %	0,0170
5 – Lacase (e após 24 h adição de hemicelulases) – reação sequencial	42,90	100 %	0,1428
6 - Hemicelulases (e após 24 h adição de lacase) – reação sequencial	14,10	32,85 %	0,0520

Utilizando-se a curva padrão de xilose ($y = 0,492 X + 0,0012$, onde y representa a absorbância e x a quantidade de ART liberados, foi possível calcular quanto de hemicelulose foi solubilizado em açúcar redutor, considerando o teor de hemicelulose da amostra de 21,51%. O tratamento com maior quantidade de açúcar solubilizado ao final da hidrólise foi o de número 5, conforme Tabela 4, o que de fato faz sentido, pois de acordo com a estrutura da fibra vegetal, o que envolve as cadeias de celulose e hemicelulose é exatamente a lignina (Figura 5) (ROSSETO, 2012; SANTOS *et al.* 2012). Assim, desestruturando-se a lignina, a ação das hemicelulases foi otimizada. O segundo melhor tratamento foi o que utilizou apenas as hemicelulases, sendo, porém, seu rendimento bem inferior ao do tratamento de número 5.

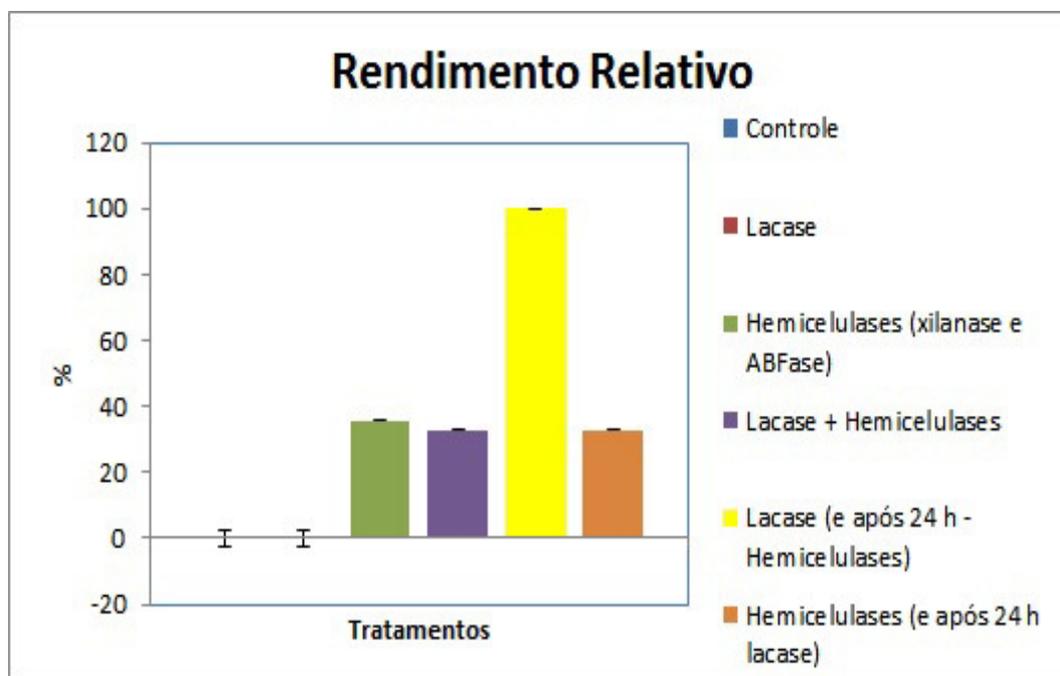


Figura 12: Rendimento relativo dos tratamentos

Já o teste de glicose oxidase obteve resultados muito baixos, o que indica que não ocorreu a hidrólise das fibras de celulose, o que não originou glicose livre no sobrenadante (Tabela 4). No entanto, convém destacar que em relação aos demais tratamentos, o uso de lacase (e após 24 h as hemicelulases) resultou em uma quantidade maior de glicose.

3.2.2. Hidrólise enzimática em escala laboratorial

Após verificar qual o pré-tratamento enzimático obteve melhor rendimento em ART, foi proposto que o mesmo fosse testado quanto ao potencial de produção de metano. Para essa etapa, necessitava-se de uma quantidade de cana energia hidrolisada equivalente a 15 g. Para isso, foi realizada uma hidrólise em triplicata, nas mesmas proporções utilizadas no primeiro teste de hidrólise enzimática. Ao realizar o experimento, passado o período de 24 h, ocasião em que a reação deveria ser parada para a adição das hemicelulases, verificou-se que os erlenmeyers estavam contaminados por alguma espécie de fungos não identificada, como mostra a Figura 13.



Figura 13: Erlenmeyers da hidrólise enzimática contaminados por fungo não identificado

A contaminação se deu apenas nos frascos cujo conteúdo não estava totalmente submerso. Isso por que faltava ainda adicionar as hemicelulases, momento em que o volume atingiria o valor proposto de 150 mL. O material foi então descartado, e procedeu-se nova hidrólise, agora com um volume reacional final de 200 mL. Os erlenmeyers utilizados agora foram o de capacidade de 1 L. Após 24 h de reação, verificou-se que o material não estava contaminado, prosseguindo-se então com o experimento.

Passadas as 48 h, o material foi retirado do shaker refrigerado, e seu conteúdo foi distribuído em tubos falcon de 50 mL, para que fosse realizada a centrifugação para a separação da fração sólida e do sobrenadante. A fração sólida foi então utilizada para a próxima etapa experimental: a avaliação do potencial de produção de metano.

Foram realizados os testes de DNS (ART) e glicose. Os resultados estão descritos na tabela 5. O resultado para Açúcares Redutores ficou bem abaixo do resultado encontrado na primeira hidrólise feita. Isso pode estar relacionado à mudança na escala do experimento, de modo que as enzimas não tenham conseguido solubilizar toda a matéria orgânica disponível. No entanto, pode-se afirmar que a hidrólise não foi bem sucedida. Já o teste de glicose (estava bem abaixo até no controle) mostrou valores bem parecidos com os da primeira hidrólise, confirmando que a hidrólise não liberou glicose no sobrenadante.

Tabela 5: Rendimento de ART e de glicose após a hidrólise da cana energia variedade #26

Tratamento	Rendimento em mg de ART/ g de cana energia)	Teor de glicose em g/g de cana energia
1 – Controle (sem enzimas)	0	0,0588236
2 – Frasco 1 - Hidrólise	1,22	0,319693
3 – Frasco 2 - Hidrólise	0,69	0,1150896
4 – Frasco 3 - Hidrólise	0,74	0,1329924

Outro fator a ser considerado é que, de acordo com Kumar *et al.* (2009), as hemiceluloses também contêm pequenas quantidades de não açúcares, como os grupos acetil que podem limitar a hidrólise enzimática. Sambusiti (2013) relata ainda como fatores limitantes da hidrólise enzimática a influência do conteúdo e da composição da lignina e da pectina. Todos esses condicionantes podem ter de alguma forma influenciado a hidrólise em grande escala.

A influência da lignina na biodegradabilidade anaeróbica de substratos lignocelulósicos é documentada por muitos autores que mostraram que o teor de lignina desempenha um papel importante na produção de metano, limitando o acesso às holocelulose (celulose e hemiceluloses). Buffiere *et al.* (2006) mostraram uma ligação entre o potencial de metano de vários resíduos lignocelulósicos e a soma de seus teores de celulose e lignina: quanto maior a soma de celulose e lignina, menor o potencial de metano. Assim, para obter altos rendimentos anaeróbicos de biodegradação, os substratos lignocelulósicos devem primeiro ser pré-tratados, de modo a quebrar a ligação entre polissacarídeos e lignina para tornar a celulose e hemiceluloses mais acessíveis aos microrganismos anaeróbicos. No entanto, isso não poderia explicar o que aconteceu no experimento de potencial de produção de biogás, uma vez que o controle não passou por qualquer pré-tratamento, e mesmo assim produziu mais biogás do que a cana energia hidrolisada.

Sambusiti (2013) sugere que a lignina pode ser considerada o parâmetro mais importante que afeta a produção de metano de substratos lignocelulósicos. Por isso, avaliar a ação somente da lacase pode ser um caminho na pesquisa sobre o pré-tratamento enzimático.

No entanto, há que se considerar a presença de outras características de composição ou estruturais, como a presença de pectinas (polímero de ácidos urônicos), a cristalinidade da celulose, a área de superfície acessível e os volumes de poros que podem afetar a produção de metano de substratos lignocelulósicos. De fato, a celulose possui partes cristalinas e amorfas e a parte cristalina impede a penetração de células vegetais por micro-organismos ou enzimas extracelulares. Monlau *et al.* (2012) descobriram que a biodegradação anaeróbica de materiais lignocelulósicos em metano não está apenas relacionada ao teor de lignina, mas a celulose cristalina também teve um impacto negativo na produção de metano, mas em menor grau do que a lignina. Zhu *et al.* (2010) mostraram que o teor de lignina e a cristalinidade da celulose são os dois parâmetros dominantes que afetam negativamente a digestibilidade dos substratos lignocelulósicos. Além disso, eles sugeriram que a cristalinidade da celulose poderia ter uma maior influência sobre a hidrólise do tempo curto, enquanto que o teor de lignina poderia ter um impacto maior na hidrólise de longa duração.

A lignina na sua forma sólida bloqueia o acesso à celulose, enquanto está em forma solúvel pode causar adsorção enzimática. Em qualquer das formas, é um agente que impede as enzimas de atingir suas alvos. Verificou-se que os substratos que contêm pouca ou nenhuma lignina apresentaram boa correlação entre as taxas iniciais de hidrólise, enquanto os substratos com maior teor de lignina demonstraram uma correlação fraca.

Deve ser destacado o fato do experimento não ter sido conduzido com a mesma cana energia utilizada na primeira hidrólise. Isso por que, mesmo sendo mantida sob refrigeração (a -8°C), depois de 6 meses a cana energia não obtém o mesmo rendimento de produção de biogás. Por isso optou-se por utilizar um material mais recente de cana energia, porém da mesma variedade (#26). Os resultados de glicose mostram que a estrutura da biomassa apresentou diferenças, entre a hidrólise em pequena escala e a hidrólise em escala laboratorial.

Outro fator a ser ressaltado é que a quantidade de cana energia hidrolisada, ficou abaixo da necessária para a realização do experimento com o AMPTS II, o que gerou a necessidade de ajustes nos cálculos de potencial de produção de metano.

3.2.3. Experimento com AMPTS II

Após a hidrólise enzimática, a fração sólida foi separada do sobrenadante, e utilizada no equipamento AMPTS II, que mede o potencial de produção de metano, em um ambiente anaeróbio. Após 42 dias de acompanhamento, o resultado obtido está relacionado na Figura 14. Na tabela 7 é mostrada a produção acumulada de biogás, por grama de matéria seca orgânica (MSO).

O pH das soluções dos reatores foram medidos antes do início e após o término do experimento. Inicialmente o pH ficou em torno de 6,8, não sendo feita qualquer correção desse valor. Após o término do experimento, verificou-se que esse pH pouco variou, chegando a 7,1 na cana energia hidrolisada, e permanecendo em 6,8 na cana energia sem pré-tratamento enzimático.

Percebe-se, a partir dos resultados apresentados, que o pré-tratamento enzimático não favoreceu a produção de biogás, uma vez que os valores obtidos estão abaixo da celulose cristalina e também da cana energia que não passou por tratamento enzimático. No entanto, a recomendação do equipamento é que seja monitorada a produção de biogás até pelo menos o 30º dia de experimento.

Tabela 7: Produção acumulada de biogás em NmL/g MSO

Dias	Cana 26# hidrolisada	Cana 26# não hidrolisada	Celulose
1	16,54	43,99	-0,81
2	17,41	55,95	37,34
3	17,61	66,96	86,86
4	21,67	73,67	121,50
5	30,42	78,00	154,71
6	37,07	81,38	195,35
7	41,62	85,09	230,63
8	45,23	89,98	251,11
9	47,74	96,01	265,60
10	50,19	102,94	278,67
11	51,90	109,92	289,56
12	53,61	116,93	298,82
13	55,18	123,67	307,37
14	56,29	129,69	315,13
15	56,96	135,37	321,66
16	57,47	140,18	326,48
17	57,67	144,37	330,00
18	57,95	148,18	332,34
19	58,20	151,69	334,04

Dias	Cana 26# hidrolisada	Cana 26# não hidrolisada	Celulose
20	58,67	155,20	335,23
21	58,68	158,55	335,84
22	58,80	161,66	336,21
23	58,55	164,38	336,26
24	58,68	167,07	336,26
25	58,20	169,13	336,12
26	58,45	171,64	336,19
27	58,34	173,62	336,17
28	58,14	175,45	336,15
29	57,76	176,91	336,18
30	57,33	178,14	336,15
31	57,26	179,29	336,22
32	57,33	180,26	336,07
33	58,04	181,05	335,97
34	58,99	181,64	335,72
35	59,39	181,97	335,24
36	60,05	182,17	334,88
37	60,54	182,37	334,42
38	60,75	182,53	333,86
39	60,79	182,67	333,35
40	60,67	182,78	332,86
41	60,31	182,86	332,34
42	60,03	182,72	332,00

Diversos fatores podem ser responsáveis por interferir na produção de biogás. Algumas substâncias podem diminuir ou retardar a biodigestão anaeróbia, tanto em baixas quanto em elevadas concentrações. Ao atingir a saturação do sistema com estes compostos, o nível de toxicidade pode ocasionar a interrupção do procedimento. Deve-se ainda evitar a sobrecarga do biodigestor com o substrato, uma vez que este pode ser composto de solventes, antibióticos, enzimas, herbicidas, sais, metais pesados e demais substâncias capazes de influenciar no metabolismo da biota microbiana (FRIEHE *et al.*, 2010).

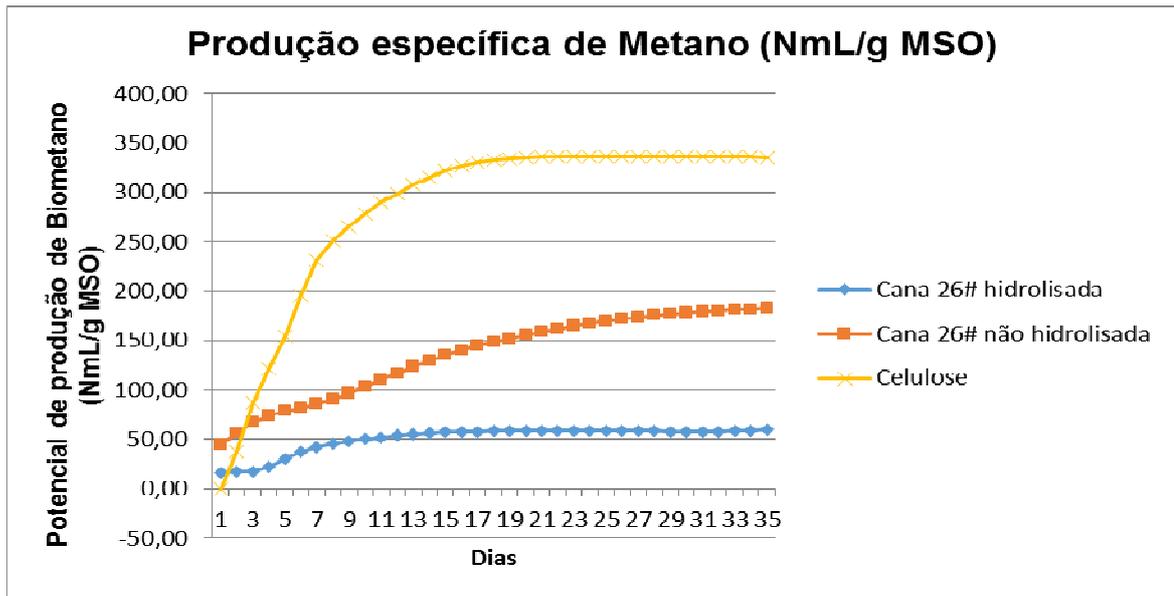


Figura 14: Produção Acumulada de biogás, após 35 dias de experimento

Na tabela 8 são apresentados alguns dos principais inibidores durante a digestão anaeróbia e suas concentrações limites de toxicidade.

Tabela 8: Inibidores e sua concentração tóxica em processos de digestão anaeróbia. Fonte: Adaptado de Friehe, 2010.

Inibidor	Concentração de inibição	Observação
Oxigênio	>0,1 mg/L	Inibição das arqueas metanogênicas anaeróbias obrigatórias.
Sulfeto de hidrogênio	>50 mg/L H ₂ S	Quanto menor o pH, maior o efeito inibitório.
Ácidos orgânicos voláteis	>2.000 mg/L HAc (pH=7,0)	Quanto menor o pH, maior o efeito inibitório. Alta adaptabilidade das bactérias.
Nitrogênio amoniacal	>3.500 mg/L NH ₄ ⁺ (pH=7,0)	Quanto maiores o pH e a temperatura, maior o efeito inibitório. Alta adaptabilidade das bactérias.
Metais pesados	Cu>50 mg/L Zn>150 mg/L Cr>100 mg/L	Só metais dissolvidos apresentam efeito inibidor. Descontaminação pela precipitação de sulfeto.
Desinfetantes e antibióticos	N.E.	Efeito inibitório varia com o composto.

Analisando-se os dados da tabela, alguns desses itens podem ser eliminados neste experimento: o equipamento de AMPTS II estava livre de oxigênio, assegurado pela inserção de nitrogênio gasoso, justamente para garantir um ambiente totalmente anaeróbio. A presença de sulfeto de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, nitrogênio amoniacal e metais pesados também é pouco provável. O único processo que não pode ser garantido, é a presença de antibióticos, uma vez que foi adicionado na hidrólise enzimática o antibiótico ampicilina. Porém, devido a sua rápida degradação, dificilmente ele iria interferir na produção de biogás. No entanto, é um ponto a ser considerado.

Os antibióticos possuem características químicas diversas. Eles são compostos polares, não voláteis, com estruturas químicas e reações de alta complexidade. Possui, em suas estruturas químicas, um grande número de grupos funcionais, como o ácido carboxílico, amida, amina, álcool, cetona, enol, fenol, tiazol, nitro composto, derivados halogenados, sulfonamida entre outros, caracterizando uma grande atividade química e biológica dessas substâncias (VASCONCELOS, 2011).

Ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamida]penicilânico) é um antibiótico semi-sintético muito estável em meio ácido, bem absorvido pelo organismo e efetivo a baixas concentrações para uma grande variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos (FERREIRA, 2004). A importância dos antibióticos semi-sintéticos, como a ampicilina, decorre de sua maior estabilidade, facilidade de absorção e do fato de originarem menos reações secundárias. No entanto, o fato de ter sido adicionado na hidrólise enzimática em escala laboratorial pode ter influenciado a produção de biogás.

Outro ponto a ser considerado é que o sobrenadante da hidrólise enzimática não foi adicionado no reator de biodigestão. Aparentemente, a falta do produto da hidrólise enzimática parece ter influenciado negativamente a ação das bactérias anaeróbias. Assim, faz-se necessário testar a produção de biogás com todo o produto da hidrólise enzimática, e não apenas a parte sólida.

Uma outra hipótese a ser considerada é a de que a adição das hemicelulases pode ter inibido a ação das bactérias metanogênicas. Isso por que a produção de biogás se dá a partir da necessidade das bactérias se alimentarem, degradando para isso a lignocelulose. Ao entrar com um substrato parcialmente degradado no biodigestor, isso teria feito com que as bactérias não precisassem secretar substâncias para hidrolisar os carboidratos complexos. De alguma forma isso parece ter interferido na produção de biogás, uma vez que ao se comparar com a

cana hidrolisada e com a celulose cristalina, percebe-se que os processos não foram alterados, produzindo biogás em quantidades compatíveis com o esperado.

O fato da hidrólise em grande escala não ter sido bem sucedida também pode ter influenciado o resultado de potencial de produção de biogás. Não é possível dizer que as condições da primeira hidrólise foram iguais as da hidrólise em grande escala. A proporção do volume reacional não pode ser mantida e a cana energia utilizada não foi a mesma do primeiro experimento. Aparentemente esses fatores contribuíram de forma negativa no processo de obtenção de biogás.

4 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo ainda não pode concluir efetivamente que a utilização de enzimas pode favorecer a hidrólise da cana energia. Apesar dos primeiros resultados terem indicado que o pré-tratamento enzimático poderia ser um diferencial positivo do processo de obtenção do biogás, o mesmo não se confirmou até o presente momento.

Há várias hipóteses a serem testadas, a fim de compreender se o pré-tratamento enzimático pode favorecer o processo de obtenção de biogás a partir da cana energia. O fato do sobrenadante da hidrólise não ter ido para o teste de avaliação de potencial de biometano é o primeiro desses fatores a serem considerados. Isso por que, aparentemente, a falta desse conteúdo parece ter influenciado negativamente a produção de biogás, uma vez que a cana energia que não passou por hidrólise enzimática produziu uma quantidade bem maior de biogás que a cana energia pré-tratada.

Há que se considerar ainda que a hidrólise em grande escala não teve o mesmo efeito da hidrólise em pequena escala, uma vez que a quantidade de ART foi significativamente menor na segunda hidrólise.

Além disso, há inúmeros fatores que podem ser variados para nortear essa pesquisa: pH, temperatura, tempo de hidrólise, volume de hidrólise, pré-tratamento químico antecedendo o pré-tratamento enzimático, tudo isso pode ser testado para avaliar a influência do uso de enzimas na produção de biogás.

Em continuidade à pesquisa, sugere-se testar novamente a condição de hidrólise com a lacase e as hemicelulases, porém levando junto o conteúdo do sobrenadante. É interessante ainda incluir uma hidrólise apenas com lacase, e verificar como fica o potencial de produção de biogás nessa condição. Além disso, pode-se incluir no estudo enzimático as pectinases, degradadoras de pectinas. Isso por que, mesmo que o conteúdo de pectina seja pequeno, seu papel na estrutura da fibra pode influenciar o processo de obtenção do biogás, como afirma Sambusiti (2013). Segundo a autora, o conteúdo de pectinas limita a acessibilidade enzimática a celulose. Pakirinen *et al.* (2012) sugerem que o uso de enzimas pectinases pode aumentar a hidrólise da celulose.

Além disso, para avaliar de forma mais completa o pré-tratamento enzimático, sugere-se ainda em continuidade da pesquisa analisar o sobrenadante da hidrólise enzimática, com relação aos oligossacarídeos que são formados durante a hidrólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar.** 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

ALEXANDRINO, A. M., FARIA, H. G., SOUZA, G. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007.

ALVES, A. L. **Produção, purificação e caracterização de uma lacase de *Phlebia rufa* (Pers.) MP Christ.** 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real 2011.

AMPTS II - **Automatic Methane Potential Test Syste: Operation And Maintenance Manual.** Bioprocess Control Sweden Ab. Sweden. Version 1.7, January 2014.

ANDRADE, H. O., PINHEIRO, G. D., PEREIRA, A.I.S., FERREIRA, J. C. S., BORGES, M. V. F. **Aspectos teóricos na produção de biogás e biofertilizante pelo mecanismo de biodigestão e geração de energia elétrica limpa através de um gerador específico.** In: VII CONNEPI- Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. Palmas, Tocantins, Brasil, 2012.

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica. **Projeto de P&D Estratégico nº 014/2012: Arranjos Técnicos e Comerciais para Inserção da Geração de Energia Elétrica a partir do Biogás oriundo de Resíduos e Efluentes Líquidos na Matriz Energética Brasileira.** Brasília, julho de 2012. Disponível em: < http://www2.aneel.gov.br/arquivos/PDF/PeD-2012-Chamada%20PE%2014_23-07-12.pdf> Acesso em: 22 fev. 2017.

ANEEL. **Matriz de energia elétrica.** Disponível em: < <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoCapacidadeBrasil.cfm>>. Acesso em 02 Nov. 2017.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. New York: APHA, WWA, WPCR, 20 ed. 2012.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600043&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 02 Nov. 2017.

BADSHAH, M., LAM, D.M., LIU, J. AND MATTIASSON, B. Use of an Automatic Methane Potential Test System for evaluating the biomethane potential of sugarcane bagasse after different treatments. **Bioresource Technology**. 114, 262-269. 2012.

BAPTISTA, N. M. de Q., SANTOS, A. C., ARRUDA, F. V. F., GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, 2012.

BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGT)**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

BARRETO, F., MOURA, I., SAMPAIO, M., LIBERAL, V., NASCIMENTO, W., LOPES, J. M. Uma visão sobre a região centro oeste na perspectiva do bionegócio. **Revista Diálogos & Ciências**, v. 1, n. 36, 2016.

BIELY, P. **Xylanolytic enzymes**. In: WHITAKER, J.R., VORAGEN, A.G.J., WONG, D.W.S. (Eds.) *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker, Inc. New York, p.879-916, 2003.

BISTRATINI, E. A. S. **Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzidas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA: estudo da produção extracelular, purificação e caracterização**. 2016. 213 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016.

BOCHMANN, G. & MONTGOMERY, L. F. R. **Storage and pre-treatment of substrates for biogas production**. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, 2013.

BORSCHIVER, S.; DA SILVA, A. L. R. Mapeamento tecnológico para purificação de biogás e seu aproveitamento: panorama mundial e iniciativas nacionais. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis, Santa Catarina. 2014.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2011.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal Biochemistry**. 72, 248–254,1976.

BRASIL, Lei n.º 12.305/2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**; altera a Lei n.º 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, 2010.

BRASIL. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental. Probiogás. **Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto** / Probiogás; organizadores, Ministério das Cidades, Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GmbH (GIZ), Brasília, DF: Ministério das Cidades, 183 f., 2015.

BRASIL. Ministério de Minas e Energias – MME. Portaria nº 538, de 15 de dezembro de 2015. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2015. Cria o programa de geração distribuída de energia elétrica – ProGD.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia – MME. Decreto nº 5.025, de 30 de março de 2004. Regulamenta o inciso I e os §§ 1o, 2o, 3o, 4o e 5o do art. 3o da Lei no 10.438, de 26 de abril de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília. 2004. Dispõem sobre o Programa de Incentivo às Fontes Alternativas de Energia Elétrica - PROINFA, primeira etapa, e dá outras providências.

BRITO, F. L. S. **Biodigestão anaeróbia em duplo estágio do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de biogás**. 2011. 184 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BRONDANI, J. C. **Biodigestores e biogás: balanço energético, possibilidades de utilização e mitigação do efeito estufa**. 2010. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

BUONAFINA, M.M.O. Feruloylation in grasses: current and future perspectives. **Molecular Plant**. 2: 861-872, 2009.

BUFFIERE, P., LOISEL, D., BERNET, N. AND DELGENES, J.P. 2006. Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. **Water Science and Technology**. 53(8), 233-241.

CANILHA, L., SANTOS, V. T., ROCHA, G. J., ALMEIDA E SILVA, J. B., GIULIETTI, M., SILVA, S. S., FELIPE, M. G., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M., CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CANTERI, M. H. G., MORENO, L., WOSIACKI, G., SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 22, n. 2, 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHAVES, V.M.G. **Algumas características fisiológicas e propriedades do complexo celulase de um fungo termófilo isolado de compostagem**. 1982. 107 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1982.

COELHO, A. C. D. **Bolsa de Resíduos: Portal de oportunidades em produção mais limpa**. Bahia, 2001. 67 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília: v. 3 - Safra 2016/17, n. 4 - Quarto levantamento, p. 1-77, abril 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_04_19_11_27_36_boletim_cana_p_ortugues_-_4o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2017.

CONCEIÇÃO, T. de A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos *Agaricomycetes* cultivados em resíduos agroindustriais do estado da Bahia**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

CORTEZ, L. A. B., LORA, E. E. S., GOMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2008.

COSTA, D. F. **Geração de energia elétrica a partir do biogás de tratamento de esgoto**. 2006. 194 f. Dissertação (Mestrado em Energia) – Programa Inter-unidades de Pós-Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2006.

CRIVELLARI, A. C. **Caracterização estrutural das hemiceluloses de paredes celulares de cana-de-açúcar**. 2016. 95 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

CYSNEIROS, C. S. S. FERREIRA, R. N., OLIVEIRA, M. A., FAVORETTO, A. O., ARNHOLD, E., ULHOA, C. J. Produção, caracterização e avaliação de enzimas fibrolíticas na digestibilidade da forragem de milho. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.14, n.4, p. 426-435, out./dez. 2013.

ELLENRIEDER J., SCHIEDER D., MAYER W. AND FAULSTICH M. Combined mechanical enzymatic pre-treatment for an improved substrate conversion when fermenting biogenic resources. **Engineering in Life Sciences**, 10, 6, 544–551. 2010.

FALKOSKI, D.L., GUIMARÃES, V. M., ALMEIDA, M. N., ALFENAS, A. C., COLODETTE, J. L., REZENDE, S. T. Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166: 1586-1603, 2012.

FARIA, R. de A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2010.

FARIA, S. **Análise de diferentes misturas enzimáticas do fungo *Hemicola grisea* var. *thermoidea* na hidrólise da fração de hemicelulose de bagaço de cana de açúcar**. 2011. 107 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós- Graduação em Biologia, Goiânia, 2011.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p.

FERREIRA, A. L. O. **Síntese enzimática de ampicilina em reator integrado**. 2004. 213 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos São Carlos, 2004.

FERREIRA, V.F., ROCHA, D. R., SILVA, F. D. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FREITAS, C. F. S. de. **Biocombustíveis avançados da cana: oportunidades, limites e características de uma indústria emergente**. 2013. 190 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

FREITAS JR., G. Fundadores da CanaVialis criam cana só para biomassa. **Valor Econômico**, São Paulo, 8 agosto 2011, Agronegócios, p. B11.

FRIEHE, J.; WEILAND, P.; SCHATTAUER, A. **Guia prático do Biogás – Geração e Utilização**. 5. ed. Cap. 2 - Fundamentos da fermentação anaeróbia. p. 20-30. (FNR), 2010.

FRIGON, J.C., MEHTA, P. AND GUIOT, S.R. Impact of mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass. **Biomass and Bioenergy**. 36, 1-11. 2012.

GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSOISSERB, B., HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, 30, 529–536, 2002.

GARCIA T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 90 f. Tese de doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GERBELLI, L. G. **Agronegócio: região centro-oeste é a que mais cresce no Brasil**. *Jornal Rural Pecuária. Jornal Estadão*. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,puxada-pelo-agronegocio-centro-oeste-e-a-regiao-que-mais-cresce-no-brasil-imp-,925096>> Acesso em: 26 nov. 2017.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 2008.

GOLDEMBERG, J.; MOREIRA, J. R. Política energética no Brasil. **Estudos avançados**, v. 19, n. 55, p. 215-228, 2005.

GOLVEIA, J. C. de S. **Indução de lacase de *Pycnoporus sanguineus* CCT 4518 induzida por resíduos agroindustriais e ensaio de biorremediação de estrogênio sintético (EE2)**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. D., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana de açúcar. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 abril 2017.

GUERI, M. V. D., BURATTO, W. G., RIBEIRO, C. B., SCHIRMER, W. N. Políticas Nacionais de Incentivo ao Uso Energético do Biogás e Biometano. **Acta Iguazu**, v. 5, n. 5, p. 160-171, 2016.

GUIMARÃES, C. M. M. & GALVÃO, V. **Produção e uso do biogás**. In: 8º Congresso Internacional de Bioenergia. São Paulo, 2013. Disponível em <https://www.researchgate.net/profile/Viviane_Galvao/publication/264470016_PRODUCAO>

E USO DO BIOGAS -

8 CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA SAO PAULO - SP -

05 A 07 DE NOVEMBRO DE 2013/links/53e0c3cc0cf2235f352700e8.pdf > Acesso em:

20 fev. 2017.

JARDIM, M. A. C. **Valorização Económica do Biogás: Geração Elétrica vs. Produção de Biometano para Injeção na Rede.** 133 f. Dissertação (mestrado) – Instituto Politécnico de Setúbal, Portugal, 2013.

KARLSSON, T., KONRAD, O., LUMI, M., SCHMEIER, N.P., MARDER, M., CASARIL, C. E., KOCH, F.F., PEDROSO, A.G. **Manual básico de biogás.** Lajeado: Editora Univates, 2014. 69 p.

KIPPER, E. **Tratamento enzimático e produção de biogás por resíduos sólidos de curtume.** 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

KUMAR, S., SINGH, P. K., SINGH, J. **Energy Cane: An Option for Sustainable Development of Sugar Industry.** In: International day for biological diversity: Biodiversity for sustainable development, maio de 2015. Disponível em: <<http://www.upsbdb.org/pdf/Souvenir2015/ch-27.pdf>> Acesso em 16 fev. 2017.

KUNZ, A.; OLIVEIRA, P. A. V. Aproveitamento de dejetos de animais para geração de biogás. **Revista de Política Agrícola**, v.15, n.3, p.28-35, 2006.

LACERDA, M. F. A. R. **Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngicas imobilizadas em fibras de *Luffa cylindrica*.** 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

LEONOWICZ A; GRZYWNOWICZ K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme Microbial Technol**, 3, 55–58, 1981.

LIMA, E. C. T. **Cana-energia como potencial fonte energética: Caracterização dos subprodutos (frações sólida, líquida e gasosa) provenientes da pirólise.** 2016. 113 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica. 2016.

LUCENA-NETO, A.D.S.; FERRERIA FILHO, E.X. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. thermoidea. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 86 – 90, 2004.

MANOCHIO, C. **Integração energética da produção de biogás em biorrefinarias de cana de açúcar integradas de 1ª e 2ª geração.** 73 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2015.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. **Fundamentos de metodologia científica.** São Paulo: Atlas, 2007.

MARQUES, S. M. A., MONTEIRO, M. K. D., SILVA JR., F. J., VENTURA JR. R. **Produção de biofertilizante, adubo orgânico e biogás para agricultura familiar.** Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria, Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET - V. 18 n. 3, 2014.

MARTINEZ, A., RUIZ-DUEÑAS, F., MARTINEZ, M., DEL RIO, J., & GUTIÉRREZ, A. **Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill.** Current Opinion in Biotechnology, 20:348-357, 2009.

MATSUOKA, S., BRESSIANI, J. A., MACCHERONI, W., FOUTO, I. Bioenergia da cana. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologia e perspectivas.** Suprema, Visconde do Rio Branco, p. 487-517, 2010.

MATSUOKA S., KENNEDY A. J., SANTOS, E. G.D., TOMAZELA, A. L., RUBIO, L. C. **S. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects.** Advances in Botany: Hindawi Publishing Corporation Advances in Botany, vol. 2014, 13 pages, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2014/597275/>> Acesso em 16 fev. 2017.

MELO, G. R. de. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Hemicella grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

MENEZES, C. R., SILVA, I. S. e DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Rev. Estudos Tecnológicos em Engenharia**, vol. 5, no. 1, pp. 68–78, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. 31, 426, 1959.

MONLAU, F., BARAKAT, A., STEYER, J.P. AND CARRÈRE, H. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. **Bioresource Technology**, 120, 241-247. 2012.

NOGUEIRA, AR de A. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. EMBRAPA-CPPSE, 2005.

NOVACANA, 2017. **Cana-de-açúcar em Goiás tem cenário positivo na safra 2017/18**. Disponível em <<https://www.novacana.com/n/cana/safra/cana-de-acucar-goias-cenario-positivo-safra-2017-18-111017/>> Acesso em: 02 nov. 2017.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT;
FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
OECD-FAO agricultural outlook 2014-2023. Rome: OECD; FAO, 2014. Disponível em: <http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2014_agr_outlook-2014-en#page173> . Acesso em: 20 fev. 2017.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana de açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

OLIVEIRA, R. D. **Geração de energia elétrica a partir do biogás produzido pela fermentação anaeróbia de dejetos em abatedouro e as possibilidades no mercado de carbono.** 98 f. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

PACHECO, S.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PAIVA, E.P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PAIVA, L. A cana é 2G. **Cana Online**, Ribeirão Preto, setembro 2014, n. 14, p. 41-48. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br/edicao/edicao14-portal-canaonlinesetembro2014.html>>. Acesso em: 09 fev. 2017.

PAIVA, L. Cana energia é realidade. **Cana Online**, Ribeirão Preto, agosto 2015, n. 24, p. 48-67,. Disponível em: < <http://www.canaonline.com.br/conteudo/cana-energia-ja-e-realidade.html> >. Acesso em: 09 fev. 2017.

PAKARINEN, A., ZHANG, J., BROCK, T., MAIJALA, P. AND VIKARI, L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. **Biore-source Technology**. 107, 275-281. 2012.

PARAWIRA, W. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 172-186, 2012.

PARENTI, A., MURGUEZA, E., IROZ, A. R., OMARINI, A., CONDE, E., ALFARO, M., CASTANERA, R., SANTOYO, F., RAMIREZ, L., PISABARRO, A. G. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. **Bioresource Technology**, 133, 142–149, 2013.

PASSARINHO, A. T. P. **Produção e caracterização de xilanases derivadas do gene xynA de *Orpinomyces* PC-2 e avaliação da eficiência para hidrólise de farinha e clarificação de**

suco. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

PEREIRA, L., RIBEIRO, W. R., PEREIRA, A. A., LIMA, R. E. V. **A Construção e o Papel Ambiental de um Biodigestor**. De Magistro de Filosofia, Anapólis, Ano V, nº. 09, 2012.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PETERSEN M. O., LARSEN J., THOMSEN M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, 33, 5, 834- 840, 2009.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via prétratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PONTECORVO, G., ROPER J.A., HEMMONS L.M., MACDONALD K.D., BUFTON A.W. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 5:141-238, 1953.

RABELO, S.C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v. 102, p. 7887-7895, 2011.

RABONI, M.; URBINI, G. Production and use of biogas in Europe: a survey of current status and perspectives. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 9, n. 2, p. 191-202, June 2014 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1980-993X2014000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 20 de fev. 2017.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.

RIZZONI, L. B., TOBIAS, A. C. T., DEL BIANCHI, M., GARCIA, J. A. D. Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1-20, 2012.

RODRIGUES, J. P. **Efeito da adição de óleo e lipase sobre a biodigestão anaeróbia de dejetos suínos**. 185 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Grande Dourados. 2012

RODRIGUES, R. S. **Produção, purificação e caracterização de celulasas e hemicelulasas do fungo da podridão branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2**. 146 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

ROMANO, R. T., ZHANG, R., TETER, S., MCGARVEY, J. A. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4564-4571, 2009.

ROSSETO, R. A bioenergia, a cana energia e outras culturas energéticas. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2012.

SAMBUSITI, C. **Physical, chemical and biological pretreatments to enhance biogas production from lignocellulosic substrates**. 2013. 224 f. Doctoral dissertation. DICA (Department of Civil and Environmental Engineering), Environmental Section Doctoral Program in Environmental and Infrastructure Engineering, 2013.

SANCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi**. **Bio-technol Adv** , 27 (2): 185-194, 2009.

SANTOS, F. A., QUEIROZ, J. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana de açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000500025&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 16 de jun. 2017.

SANTOS JÚNIOR, L. A. **Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de carbonização hidrotermal**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,

Escola de Engenharia Civil (EEC), Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente, Goiânia, 2015.

SILVA, E. A. **Atividade enzimática da lacase e crescimento micelial de três fungos amazônicos degradadores de madeira**. Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 112 p., 2006.

SILVA, A. P. M. **Lodo de Leito de Secagem (LLS): Caracterização, aproveitamento energético e avaliação do Ciclo de Vida**. 183 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Itajubá, Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Itajubá, 2016.

SILVEIRA, L. C. I. **Melhoramento genético da cana-de-açúcar para obtenção de cana energia**. 84 f. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica. Campinas, 2016.

SOUZA, A. R. de. **Caracterização estrutural e biofísica de duas proteínas relacionadas: β -1,3-1,4-glicanase de *Bacillus subtilis* 168 e α -L-arabinofuranosidase termoestável de *Thermotoga petrophila* RKU-1**. 2012. 97 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2012.

SZKLARZ, G. D., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L., LINKINS, A. E. Production of Phenoloxidas and Peroxidas by Wood-Rotting Fungi. **Mycology**, 81, 234-240, 1989.

TERRASAN, C. R. F. **Produção e caracterização do complexo xilanolítico de *Penicillium janczewskii***. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

TOLMASQUIM, M. T. **Energia Renovável: Hidráulica, Biomassa, Eólica, Solar, Oceânica**. EPE: Rio de Janeiro, 452 p., 2016.

VASCONCELOS, O. M. S. R. **Degradação do antibiótico amoxicilina em efluente de indústria farmacêutica**. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídrico), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

VÁZQUEZ, M., OLIVA, M., TÉLLEZ-LUIS, S. J., RAMÍREZ, J. A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. **Bioresour. Technol.**, 98, 3053– 3060, 2007.

VDI 4630. **Fermentation of Organic Materials e Characterization of the Substrate, Sampling, Collection of Material Data, Fermentation Tests.** Verein Deutscher Ingenieure (Association of German Engineers), Düsseldorf, Germany, 2006.

VIOLANTE, M. H. S. R. **Potencial de produção de cana-energia em áreas agrícolas marginais no Brasil.** 2012. 113 f. Dissertação (MPAGRO) - Escola de Economia de São Paulo, 2012.

ZANETTE, A. L. **Potencial de aproveitamento energético do biogás no Brasil.** 2009. 105 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

ZHU, L., O'DWYER, J.P., CHANG, V.S., GRANDA, C.B. AND HOLTZAPPLE, M.T. Multiple linear regression model for predicting biomass digestibility from structural features. **Bio-resource Technology.** 101(13), 4971-4979. 2010.