



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA: SISTEMAS ENERGÉTICOS E MEIO AMBIENTE

MÁRCIA ANDRÉA GOMES

**DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS VISANDO À
OBTENÇÃO DE ETANOL 2G**

Maceió – AL

2015

MÁRCIA ANDRÉA GOMES

**DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS VISANDO À
OBTENÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Engenharia Química da Universidade
Federal de Alagoas, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
mestre em engenharia química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Maceió
2015

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

G633d Gomes, Márcia Andréa.
Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol
2G / Márcia Andréa Gomes. – 2015.
94 f., il.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de
Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 82-94.

1. Material lignocelulósicos. 2. Pré-tratamento. 3. Destoxificação. 4. Inibidores.
5. Etanol 2G. I. Título.

CDU: 66.094.942

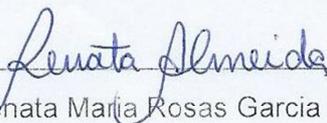
Márcia Andréa Gomes

DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS VISANDO À
OBTENÇÃO DE ETANOL 2G

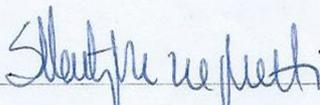
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 24 de fevereiro de 2015.

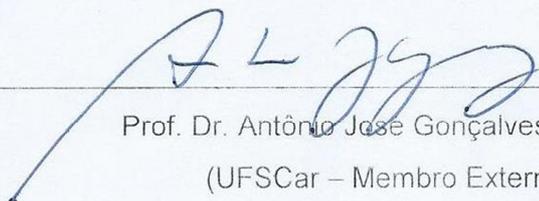
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(PPGEQ/UFAL - Orientadora)



Prof^ª. Dr^ª. Simoni Margareti Plentz Meneghetti
(PPGEQ/UFAL)



Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz
(UFSCar – Membro Externo)



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente *a DEUS*, por me dar saúde e coragem para continuar a realização desse sonho que não só pertence a mim, mas também a minha mãe Ednilza Maria Gomes (*in memoriam*).

Aos meus familiares, em especial *ao meu pai* que sempre esteve comigo me ensinando o verdadeiro sentido da vida, *ao meu irmão* por me encorajar a dar continuidade nessa batalha, *as minhas tias* Cristiane Gomes e Ednadjá Gomes por me orientar nessa luta constante de seguir em frente, *os meus tios* Luiz Carlos Gomes e Carlos Alberto Gomes pela orientação no seguimento da profissão.

Ao meu marido, pelas noites mal dormidas com luzes acesas e algumas renúncias feitas em nossa vida, em prol desse sonho.

Aos meus amigos, pelo carinho, amizade, companheirismo, paciência e ajuda durante toda a elaboração desse trabalho. Em especial, Martha Santos que mesmo tão distante se fez presente em todos os momentos difíceis.

A professora Renata Rosas, por aceitar me orientar neste trabalho e me dar a oportunidade de descobrir esse caminho acadêmico.

Ao professor Wagner Pimentel, pelo auxílio no tratamento dos dados e apoio ao longo dessa caminhada.

Aos professores da banca Simoni Meneghetti e Antônio Cruz pela disposição em avaliar o trabalho.

A equipe da UFSCar, pela atenção e acompanhamento no laboratório de engenharia bioquímica que me fez sentir super aquecida nos dias que passei em São Carlos;

Aos alunos do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos– LTBA, da UFAL, que me ajudaram com as metodologias; *A mestrandia* Margarete Cabral, que me tirou inúmeras dúvidas.

Por fim, a *CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar possui alto teor de material lignocelulósico, o que viabiliza o estudo para a produção do etanol de segunda geração, sendo necessária a aplicação de um pré-tratamento que promova a ruptura da fração fibrosa, para tornar os açúcares acessíveis para fermentação. Existem vários pré-tratamentos que visam essa quebra, e na busca pelo mais produtivo são aplicadas condições severas de temperatura e pressão. Isso propicia a formação de produtos indesejáveis ao processo de produção do bioetanol, sendo necessária a etapa de destoxificação para remoção dos inibidores. Nesse trabalho, foi empregado a etapa de destoxificação para dois pré-tratados ácido e hidrotérmico, na metodologia utilizada elevou-se o pH dos hidrolisados provenientes do pré-tratamento ácido para 7,0 com óxido de cálcio e em seguida o decaimento até pH 4,0 com ácido fosfórico, os hidrolisados do pré-tratamento hidrotérmico tiveram seu pH reduzidos para 4,0 com a adição do ácido fosfórico, ambos os pré-tratados foram submetidos a adsorção em carvão ativado (1% m/v, 100rpm, 30 minutos a 50°C), condições escolhidas após planejamento 2² com triplicata no ponto central. Avaliação da eficácia destes procedimentos foi feita quanto à remoção dos compostos tóxicos em função do rendimento fermentativo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, de hidrolisados com e sem destoxificação, avaliando a quantidade de açúcares liberados para conversão em etanol de segunda geração. De acordo com os resultados, a alteração de pH combinada a adsorção com carvão ativo propiciou maiores rendimentos fermentativos em ambos os hidrolisados pré-tratados ácido 38,51% e hidrotérmico 44,85%, quando comparados ao rendimento de amostras não destoxificadas, a esses resultados pode estar associado a interferência da lignina no bagaço, que pode formar produtos de condensação capazes de interferir na destoxificação. No entanto os melhores resultados foram encontrados no hidrolisado pré-tratado hidrotérmicamente com 87,94% de eficiência de fermentação e teor alcoólico de 7,41%, quando comparado ao hidrolisado pré-tratado com ácido de 75,50% e 5,11%, respectivamente.

Palavras-chave: material lignocelulósico. pré-tratamento. destoxificação. inibidores.

ABSTRACT

The sugarcane bagasse has a high content of lignocellulosic material, which enables the study for the production of second-generation ethanol, requiring the application of a pretreatment that promotes the rupture of the fiber, to make accessible sugars for fermentation. There are several pretreatments aimed at the break and in the search for the most productive one, it is applied severe conditions of temperature and pressure. This promotes the formation of undesirable products in the bioethanol production process, requiring detoxification step for removal of inhibitors. In this study, we used the detoxifying step for two pretreatments, hydrothermal and acid. The methodology raised the pH of the hydrolysates resulting from the acid pretreatment to 7.0 with calcium oxide and then decay to pH 4.0 with phosphoric acid. The hydrolysates of the hydrothermal pretreatment had its pH reduced to 4.0 by addition of phosphoric acid, both pretreated were subjected to adsorption on activated carbon (1% w /v , 100 rpm , 30 minutes at 50 ° C), conditions chosen after design 2² after triplicate with the center point. The evaluation of the efficacy of these procedures was made as to the removal of toxic compounds depending on the fermentation yield with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, hydrolysates with and without detoxification, assessing the amount of released sugars for conversion into second-generation ethanol. According to the results , the change of pH combined with activated carbon adsorption led to higher fermentation yields in both pretreated 38.51% acid and hydrothermal 44.85% hydrolyzed , when compared to the yield of samples not detoxified , these results may be associated with interference of lignin in the pulp, which can form condensation products able to interfere with the detoxification. However the best results were found in the hydrolysate hydrothermally pretreated with 87.94% efficiency and fermentation alcohol content of 7.41%, compared to the pre-treated hydrolysate with acid and 5.11% 75.05% respectively.

Keywords: lignocellulosic materials. pretreatment. detoxification. inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição Global do Cultivo Canavieiro. _____	16
Figura 2: Área Canavieira do Estado de Alagoas. _____	16
Figura 3: Representação de estrutura lignocelulósica. _____	19
Figura 4: Constituição geral dos materiais lignocelulósicos. _____	21
Figura 5: Estrutura da celulose. _____	22
Figura 6: Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. _____	23
Figura 7: Representação esquemática da hemicelulose. _____	23
Figura 8: Representação estrutural da lignina. _____	24
Figura 9: Alterações estruturais no ML determinadas pelo pré-tratamento. _____	25
Figura 10: Separação dos componentes lignocelulósicos. _____	27
Figura 11: Formação dos compostos inibitórios. _____	32
Figura 12: Fluxograma do Procedimento Experimental. _____	39
Figura 13: Moinho de Facas (Tipo Willey). _____	40
Figura 14: Peneira de aço inox AISI 304 com malha de 30mesh. _____	41
Figura 15: Determinador de Umidade Modelo ID50. _____	41
Figura 16: Etapas do pré-tratamento ácido. _____	42
Figura 17: Reator PARR. _____	43
Figura 18: Etapas do pré-tratamento hidrotérmico. _____	44
Figura 19: Caracterização química dos bagaços. _____	45
Figura 20: Mufla. _____	47
Figura 21: Extrator de Soxhlet. _____	48

Figura 22: Cartucho de Celulose. _____	48
Figura 23: Etapas de atividade enzimática. _____	49
Figura 24: Curva Padrão de Glicose. _____	50
Figura 25: Incubadora refrigerada com agitação TE-424 (TECNAL). _____	51
Figura 26: Curva Padrão de Glicose. _____	52
Figura 27: Refratômetro HI 96801. _____	53
Figura 28: Etapas de preparo do carvão ativado. _____	54
Figura 29: Etapas da destoxificação. _____	55
Figura 30: Curva de calibração do dicromato de potássio. _____	58
Figura 31: Gráfico das frações de celulose, hemicelulose e lignina presentes no bagaço in natura e após pré-tratamento. _____	62
Figura 32: Gráfico do ART obtido pós-hidrólise enzimática dos pré-tratados ácido e hidrotérmico. _____	64
Figura 33: Superfície de resposta do destoxificado do pré-tratado ácido. _____	67
Figura 34: Gráfico de comparação das amostras antes e depois da destoxificação dos pré-tratados ácido e hidrotérmico. _____	69
Figura 35: Ajuste ao Modelo Linear. _____	74
Figura 36: Superfície de Resposta. _____	75
Figura 37: Consumo de BRIX ao longo da fermentação – Pré-tratado ácido. _____	76
Figura 38: Consumo de BRIX ao longo da fermentação – Pré-tratado HDT. _____	76
Figura 39: Viabilidade celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> antes e depois da destoxificação. _	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração.	20
Tabela 2- Processos de pré-tratamento da biomassa.	26
Tabela 3 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental.	55
Tabela 4- Variáveis do Planejamento Experimental 2 ³	57
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas encontradas no bagaço da cana-de-açúcar in natura.	59
Tabela 6 - Quantidades finais de bagaço pré-tratado e rendimentos obtidos nos ensaios de pré-tratamento.	59
Tabela 7 - Constituição do bagaço de cana-de-açúcar in natura e pré-tratados após caracterização química com ácido sulfúrico 72%.	60
Tabela 8 - Fatores de conversão para celulose e hemicelulose.	62
Tabela 9 – Matriz de planejamento para o pré-tratado ácido.	65
Tabela 10 – Matriz de planejamento para o pré-tratado hidrotérmico.	65
Tabela 11 - Efeitos e combinação linear das interações para o pré-tratado ácido.	66
Tabela 12– Efeitos e combinação linear das interações para o pré-tratado HDT.	66
Tabela 13- Análise de Variância (ANOVA), para o pré-tratamento ácido.	68
Tabela 14 - Perdas de açúcares, após a destoxificação.	69
Tabela 15 - Valores médios de pH, BRIX e ART(g/L), antes e depois da destoxificação do pré-tratado ácido.	70
Tabela 16 - Valores médios de pH, BRIX e ART, antes e depois da destoxificação do pré-tratado HDT.	70
Tabela 17 - Matriz de planejamento fatorial 2 ³	71
Tabela 18 - Efeitos e combinação linear das interações.	72
Tabela 19 - Análise de Variância (ANOVA).	73
Tabela 20 - Resultados obtidos após as etapas de hidrólise enzimática, destoxificação e fermentação.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

aC: Antes de Cristo
AFEX: Ammonia Fiber Expansion
ART: Açúcares Redutores Totais
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
dC: Depois de Cristo
DNS: Determinação de Açúcares Redutores
HDT: Hidrotérmico
HMF: Hidroximetilfurfural
ML: Materiais Lignocelulósicos
MO: Microrganismo
MO's: Microrganismos
pH: Potencial Hidrogeniônico
PIB: Produto Interno Bruto
PID: Controlador Proporcional Integral
YPD: Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos.....	14
1.1.1	Geral	14
1.1.2	Específicos	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	A cana-de-açúcar	15
2.1.1	Bagaço de Cana-de-Açúcar na Produção do Bioetanol.....	18
2.2	Materiais lignocelulósicos	18
2.2.1	Celulose.....	21
2.2.2	Hemicelulose.....	22
2.2.3	Lignina	23
2.2.4	Cinzas e Extrativos	24
2.3	Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.....	25
2.3.1	Pré-Tratamentos por Métodos Físicos.....	27
2.3.2	Pré-Tratamentos por Métodos Químicos	27
2.3.3	Pré-tratamentos por Métodos Biológicos	29
2.3.4	Pré-tratamentos Associados.....	29
2.4	Hidrólise.....	30
2.4.1	Formação dos Inibidores.....	31
2.4.1.1	Produtos de Degradação dos Açúcares.....	33
2.4.1.1.1	Hidroximetilfurfural (HMF)	33
2.4.1.1.2	Furfural	34
2.4.1.2	Produtos de Degradação da Lignina.....	35
2.4.1.3	Compostos Derivados da Estrutura Lignocelulósica.....	35
2.4.1.4	Íons de Metais Pesados.....	36
2.5	Métodos de destoxificação dos hidrolisados.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Coleta e preparo da matéria-prima	40
3.2	Pré-tratamento.....	41
3.2.1	Pré-tratamento Ácido.....	42
3.2.2	Pré-tratamento Hidrotérmico.....	43

3.2.3	Caracterização Química da Biomassa	44
3.2.3.1	Determinação de Lignina Insolúvel na Fração Sólida.	45
3.2.3.2	Determinação de Lignina Solúvel	45
3.2.3.3	Determinação de Carboidratos, Ácidos Orgânicos, Furfural e Hidroximetilfurfural na Fração Líquida.....	46
3.2.3.4	Determinação de Cinzas.....	47
3.2.3.5	Determinação de Extrativos.....	48
3.3	Hidrólise enzimática	49
3.3.1	Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART)	51
3.3.2	Determinação do pH.....	53
3.3.3	Determinação de Sólidos Solúveis (BRIX)	53
3.4	Método de destoxificação	53
3.5	Fermentação	55
3.5.1	Avaliação dos Contaminantes na Fermentação Etanólica.....	56
3.6	Destilação.....	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Pré-tratamento.....	59
4.2	Hidrólise.....	63
4.3	Destoxificação.....	64
4.3.1	Matriz de Planejamento da Destoxificação	64
4.3.2	Avaliação das Condições de Destoxificação	69
4.4	Fermentação	71
4.4.1	Estudo da Fermentação em Meio YPD com Adição dos Contaminantes.....	71
4.4.2	Fermentação dos Hidrolisados	75
4.4.3	Viabilidade Celular da Levedura <i>S. cerevisiae</i>	77
4.4.4	Interpretação dos Resultados de Fermentação e Destilação.....	78
5	CONCLUSÕES.....	80

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o aumento das preocupações mundiais com os riscos de exploração das reservas de petróleo decorrente do investimento na exploração do pré-sal, a instabilidade dos preços e as consequências negativas ao meio ambiente têm dado ênfase ao estudo dos biocombustíveis. As tecnologias convencionais apresentam uma série de dificuldades para atingir os níveis desejados, o que desperta a necessidade de progressivos estudos e desenvolvimento de tecnologias avançadas e sustentáveis, como a produção de bioetanol, a partir de biomassa lignocelulósica (ROSA & GARCIA, 2009).

O uso destas matérias-primas para a produção de combustível diminui a dependência dos recursos fósseis e melhora a economia sustentável (XAVIER *et al.*, 2010). Uma grande vantagem na escolha da biomassa como matéria-prima se dá pelo fato de ser um resíduo de estrutura lignocelulósica, que não implica com a plantação de cereais e grãos (SANCHEZ & CARDONA, 2008). A biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de planta e consistem principalmente de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN *et al.*, 2007). Devido à resistência da estrutura do material lignocelulósico, se torna difícil atingir níveis elevados de rendimento de açúcares se a biomassa não for previamente pré-tratada. Essa matriz lignocelulósica precisa de um pré-tratamento para tornar disponíveis os açúcares fermentescíveis para a produção de etanol celulósico. O pré-tratamento é a etapa mais importante, uma vez que tem papel determinante e de forte influência nas etapas seguintes do processo, tanto na hidrólise quanto na fermentação, pois com a ruptura da matriz lignocelulósica há geração de contaminantes que influenciam na toxicidade da fermentação. Essa tecnologia vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção necessária para atender à demanda mundial de etanol (GALBE & ZACCHI, 2007).

O pré-tratamento tem como objetivo tornar a biomassa sólida mais acessível, o que dependendo do método escolhido gera diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas seguintes. A rota bioquímica a ser

escolhida vai depender da fração da biomassa a qual se deseja remover. (SUN & CHENG, 2005). Dentre os métodos de fracionamento estão:

- Métodos Químicos: Ácido, Alcalino, Organosolv, Líquidos iônicos e Sais orgânicos;
- Métodos Físicos: Moagem, Irradiação, Vapor, Pirólise e Extrusão;
- Métodos Biológicos: Fungos, Actinomicetes;
- Métodos Associados: Auto-hidrólise; Explosão a Vapor, Hidrotérmico e Fluidos Supercríticos.

Entre todos os métodos de pré-tratamento, a rota ácida tem sido amplamente estudada por ser eficaz e de baixo custo. Realizada a ruptura da matriz lignocelulósica a segunda etapa é a hidrólise que com ação do complexo enzimático hidrolisa a celulose, essa reação é catalisada por enzimas altamente específicas. Durante as etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são gerados uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais tanto da hidrólise quanto da fermentação. Esses potenciais inibidores são distribuídos em três categorias: derivados furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural - HMF), ácidos orgânicos fracos (como ácido acético) e derivados fenólicos que irão interferir na etapa subsequente, a fermentação responsável por converter os açúcares em etanol, afetando negativamente o metabolismo microbiano, prejudicando a conversão dos açúcares presentes no produto de interesse para posterior destilação onde ocorre separação dos componentes da mistura, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Segundo Marton (2005), a toxicidade destes subprodutos às leveduras assim como a diminuição do rendimento fermentativo, é conferida à alta concentração de compostos tóxicos no meio fermentativo bem como a interação sinérgica que agrega um potencial inibitório mesmo em baixas concentrações. Desta forma, diferentes procedimentos de destoxificação dos hidrolisados lignocelulósicos têm sido propostos para minimizar a toxicidade dos mesmos às células. Diversos métodos químicos e físicos têm sido empregados para a remoção de subprodutos presentes em hidrolisados lignocelulósicos, destacando-se a combinação de alteração de pH com adsorção em carvão vegetal ativado, adsorção em resinas de troca iônica e a utilização de polímeros vegetais.

Nesse sentido, esta dissertação busca determinar um método de destoxificação da matéria prima lignocelulósica (bagaço da cana-de-açúcar) quando realizado pré-tratamento por via ácida e hidrotérmica, para a obtenção de etanol de segunda geração. Dessa forma, pretende-se propor um aumento no rendimento fermentativo via redução dos contaminantes no meio reacional.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Estudar o processo de destoxificação de hidrolisados oriundo de biomassa lignocelulósica (bagaço da cana-de-açúcar) visando à redução do teor de inibidores para obtenção de etanol de segunda geração.

1.1.2 Específicos

- Realizar a caracterização físico-química da biomassa lignocelulósica;
- Realizar o pré-tratamento para tornar disponível a matriz lignocelulósica;
- Determinar e quantificar os principais inibidores presentes no processo;
- Determinar o método de destoxificação para os inibidores presentes;
- Realizar a fermentação antes e após a destoxificação;

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cana-de-açúcar

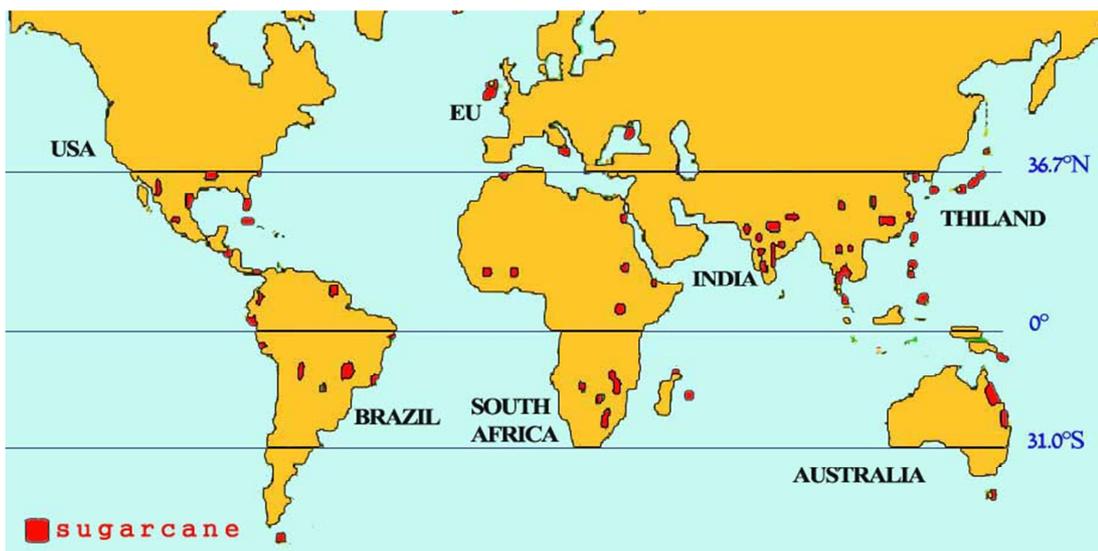
A problemática do aumento excessivo do preço do petróleo, da natureza finita dos combustíveis fósseis e da discussão mundial sobre a redução na emissão de CO₂ em consequência a diminuição do efeito estufa, vem há algum tempo trazendo preocupações no sistema energético internacional, uma vez que o sistema é fortemente dependente de combustíveis fósseis. Estudos relatam algumas alternativas viáveis para o uso dos biocombustíveis e o uso de energias renováveis, as quais ainda não atingiram padronização mínima e características de tecnologias plenamente desenvolvidas (KOHLHEPP, 2010).

Nessa abordagem, a troca de combustíveis fósseis por biocombustíveis, obtidos a partir de biomassa, tem sido uma alternativa cada vez mais buscada. No entanto, a crescente utilização das matérias primas como cana-de-açúcar e milho para produção de etanol poderia gerar um aumento de preços seguidos de uma diminuição da disponibilidade de alimentos. Por isso a necessidade no desenvolvimento de novas tecnologias capazes de trabalhar com uma produção de biocombustíveis de segunda geração utilizando o excedente de resíduos lignocelulósicos como matéria-prima, aparece como uma solução eficaz (BNDS, 2008).

A cana de açúcar é uma antiga fonte de energia para os seres humanos, energia que vem ganhando o espaço dentre os combustíveis fósseis. Inicialmente cultivada no Sudeste Asiático e Índia Ocidental. No período de 327 aC, era uma cultura importante no subcontinente indiano. Por volta de 647 dC, foi introduzida no Egito e um século mais tarde, na Espanha (NETAFIM, 2009).

Conforme a ilustração da Figura 1, ao longo do tempo a cana-de-açúcar foi se expandido por todas as regiões tropicais e subtropicais e por volta de 1552, o Brasil começou a monopolizar a produção mundial de açúcar deixando para Portugal e Espanha o restante do comércio. Mas tarde, os holandeses iniciaram a produção açucareira no Caribe e o mesmo foi feito por ingleses e franceses em suas colônias, com o intuito de diminuir a dependência do açúcar brasileiro. Assim a produção nas ilhas de Caribe e Antilhas cresceu e o Brasil perdeu a posição de grande fornecedor de açúcar (BRANDÃO, 1985).

Figura 1: Distribuição Global do Cultivo Canavieiro.



Fonte: NETAFIM, 2009.

Contemplado por terras férteis e favoráveis ao cultivo da cana-de-açúcar o estado de Alagoas tem como um dos principais fatores de formação e desenvolvimento regional a cultura canvieira, como mostra a Figura 2.

Figura 2: Área Canvieira do Estado de Alagoas.



Fonte: SINDAÇUCAR, 2009.

Até os dias atuais nota-se que o cenário socioeconômico alagoano é dominado pelo setor canavieiro, o qual norteia os rumos da economia do estado. A monocultura da cana-de-açúcar no estado de Alagoas concentra cerca de 27% do PIB estadual, sendo responsável por 120 mil empregos diretos e cerca de 270 mil empregos indiretos, um dos principais entraves da economia alagoana é criar novas oportunidades de empregos e renda para os cortadores de cana e aderir a implementação da colheita mecanizada (SANTOS, 2011).

A indústria sucro-alcooleira produz o açúcar e álcool hidratado e anidro, utilizado nos carros exclusivamente movidos a álcool ou então na proporção de 27% em volume, são adicionados à gasolina para os motores dos automóveis. A usina vem investindo bastante em novas tecnologias para utilização em totalidade da cana-de-açúcar, assim é conveniente citar os subprodutos gerados como bagaço e palha de cana-de-açúcar que se destacam amplamente pelo seu potencial energético, sendo o primeiro utilizado como combustível para geração de energia e assim manutenção dos equipamentos industriais e o segundo em crescentes estudos com perspectiva de ser utilizado com combustível economicamente viável (LEME, 2005).

Este bagaço excedente pode ainda suprir o abastecimento da indústria, proporcionando vantagens socioambientais e elevação do rendimento econômico do processo (GÁMES, *et al.*, 2006), pois de acordo com Rabelo (2010), o uso de processos e rotas mais eficientes está levando o setor a tornar-se um gerador de excedentes de energia elétrica, possibilitando assim a hidrólise do material lignocelulósico restante para produção de açúcares fermentescíveis (rota química e biológica) ou a gaseificação deste material seguida pela síntese de combustíveis líquidos (rota térmica).

No entanto, existem diversas utilizações para o bagaço de cana-de-açúcar, que vai desde a produção de energia térmica até a utilização como material alternativo na construção civil, à indústria de papel e celulose, passando pela alimentação animal e ainda o aproveitamento do bagaço para produção de etanol a partir de tecnologias de segunda e terceira geração, pois o bagaço apresenta alto teor de material lignocelulósico (MANZONO, 2000), sendo uma das alternativas o reaproveitamento como biomassa agroindustrial para a produção de etanol de segunda geração, corroborando com a reutilização do excesso de bagaço e a restrição gradativa da queima da palha no campo.

Assim estima-se a liberação de 30 a 50% do bagaço produzido para a utilização em recursos alternativos (DRABER, 2013).

2.1.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar na Produção do Bioetanol

O bagaço da cana-de-açúcar representa a maior quantidade de coprodutos agroindustriais no país. É um subproduto do último terno que compõe a moenda das usinas, e é composto por partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25mm, com aproximadamente 30% de massa de cana e 50% de umidade (SOUZA, 2003).

Em geral o processamento de uma tonelada de cana de açúcar gera cerca de 280Kg de bagaço com 50% de umidade e poder calorífico inferior da ordem de 7.500 kJ/kg, Dessa forma, cerca de 25% a 30% em peso da cana moída corresponde a bagaço, o que equivalente a algo 588,92 milhões de toneladas produzidos por ano no Brasil, equivalente a safra de 2012/13. Por se tratar de uma grande quantidade de biomassa disponível, devem-se buscar outras aplicações para este resíduo (MACEDO, 2002; CONAB, 2014).

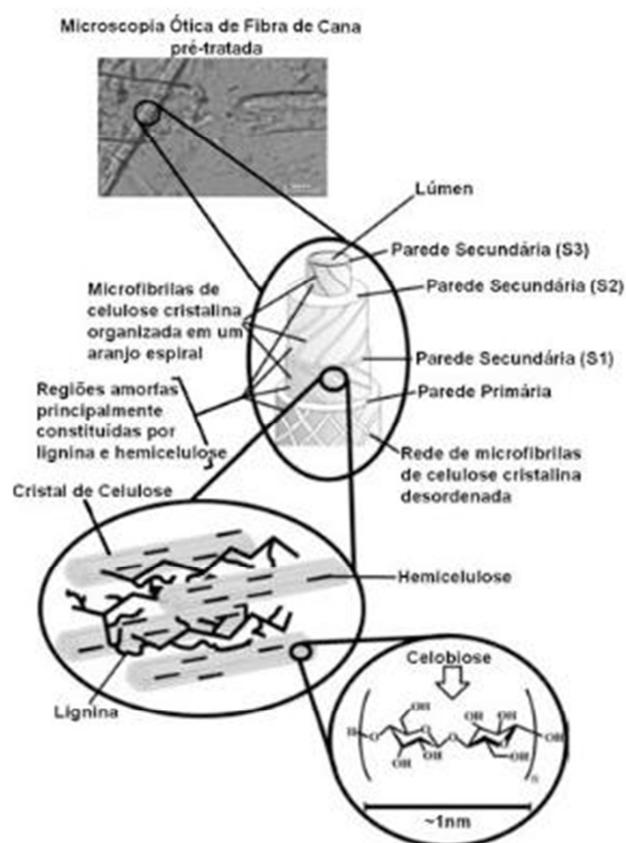
Segundo Gámez *et al.*, (2006), a utilização do bagaço excedente viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool para a produção do etanol lignocelulósico, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais, além de aumentar o rendimento do processo que passará a utilizar seu resíduo excedente como biomassa para geração do etanol de segunda geração.

2.2 Materiais lignocelulósicos

Segundo Salanti *et al.*,(2010), designa-se por materiais lignocelulósicos (ML) os diferentes tipos de biomassa de origem vegetal que têm como característica comum serem principalmente constituídos por polissacarídeos (40-50% celulose e 18-27% hemicelulose) e 18-27% de lignina como mostra a Figura 3. A quantificação dos constituintes pode variar de acordo o material, no caso de resíduos agroindustriais variam com a região, idade e período do ano da colheita do material. Os ML representam cerca de 50% da biomassa vegetal global e tem uma produção anual estimada de 10-50 mil milhões de toneladas (GARROTE *et al.*, 2004).

Os materiais lignocelulósicos compreendem resíduos agrícolas, florestais, urbanos e agroindustriais, conforme mostra a Tabela 1. Esses resíduos incluem uma variedade de materiais, como bagaço de cana, resíduos de papel, palhas, caules, talos, folhas, cascas, conchas e cascas de cereais como arroz, trigo, milho, sorgo e cevada, entre outros. (MUSSANATTO & TEXEIRA, 2010).

Figura 3: Representação de estrutura lignocelulósica.



Fonte: ANDREI, 2010.

No entanto, devido à sua composição química, com base em açúcares e outros compostos de interesse, podem ser utilizados para a produção de um número de produtos de valor agregado, tais como etanol, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, enzimas e outros. Nos últimos anos desenvolveu-se um crescente interesse pelos resíduos agroindustriais devido a essa disponibilidade de matéria-prima de baixo custo com elevado potencial de bioconversão, grande quantidade produzida anualmente e a possibilidade de valorização (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Fornagem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

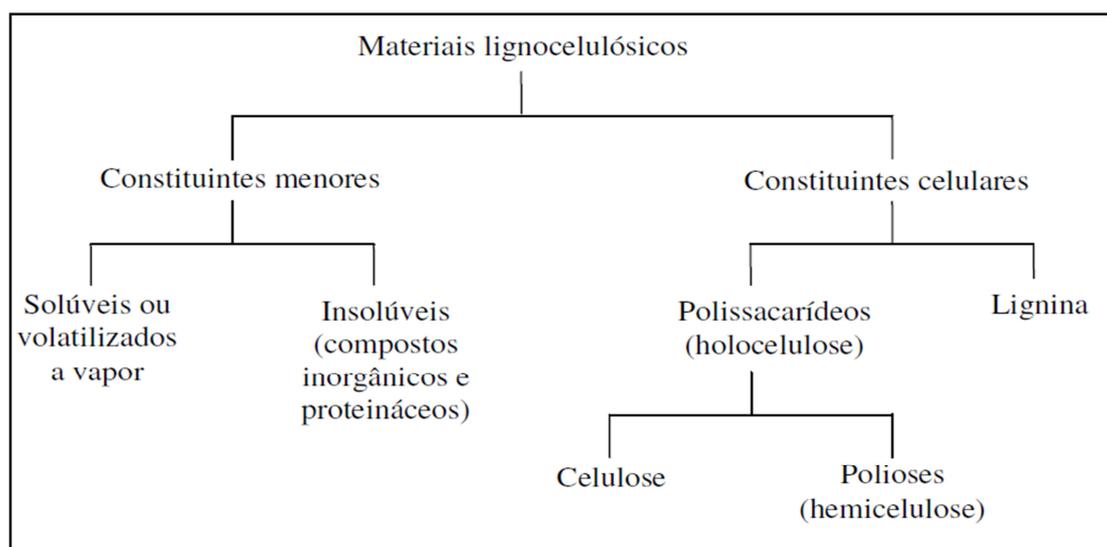
SANTOS *et al.*, 2012.

Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de tornar disponível a estrutura lignocelulósica presente nessa biomassa tornando disponíveis os açúcares fermentescíveis, tais tecnologias envolvem processos que podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação desses (GOLDEMBERG, 2010).

No entanto, devido à sua composição química, com base em açúcares e outros compostos de interesse, podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de um número de produtos de valor agregado, tais como etanol, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, enzimas e outros. Nos últimos anos desenvolveu-se um crescente interesse pelos resíduos agroindustriais devido a essa disponibilidade de matéria-prima de baixo custo com elevado potencial de bioconversão, grande quantidade produzida anualmente e a possibilidade de valorização (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

Além dos três principais constituintes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) presente na composição geral dos materiais lignocelulósicos. Destaca-se a presença de outros componentes que são chamados de extrativos (cinzas e compostos inorgânicos) vistos em pequenas quantidades, como mostra a Figura 4 (RUEDA, 2010).

Figura 4: Constituição geral dos materiais lignocelulósicos.



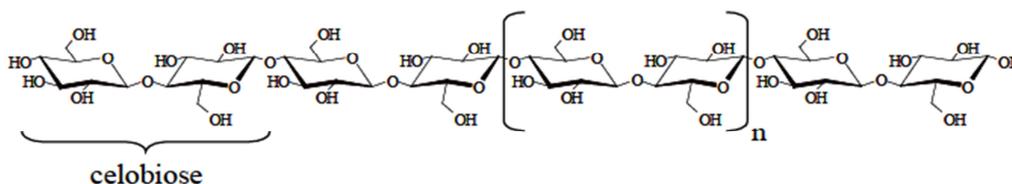
Fonte: RUEDA, 2010.

2.2.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante, está presente na estrutura básica das células de todas as plantas respondendo isoladamente por aproximadamente 50% de todas as reservas de carbono disponível na biosfera (NASCIMENTO, 2011). Este homopolímero de glicose com ligações β -Dglicosídicas que se ligam entre si através dos carbonos 1-4, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, como mostra a Figura 5. As cadeias de

celulose são formadas por fibrilas elementares compostas por duas regiões distintas, com ligações de pontes de hidrogênio intramolecular em regiões cristalinas e força de Van der Waals nas regiões amorfas, menos ordenadas e mais susceptíveis a hidrólise (RABELO, 2007).

Figura 5: Estrutura da celulose.



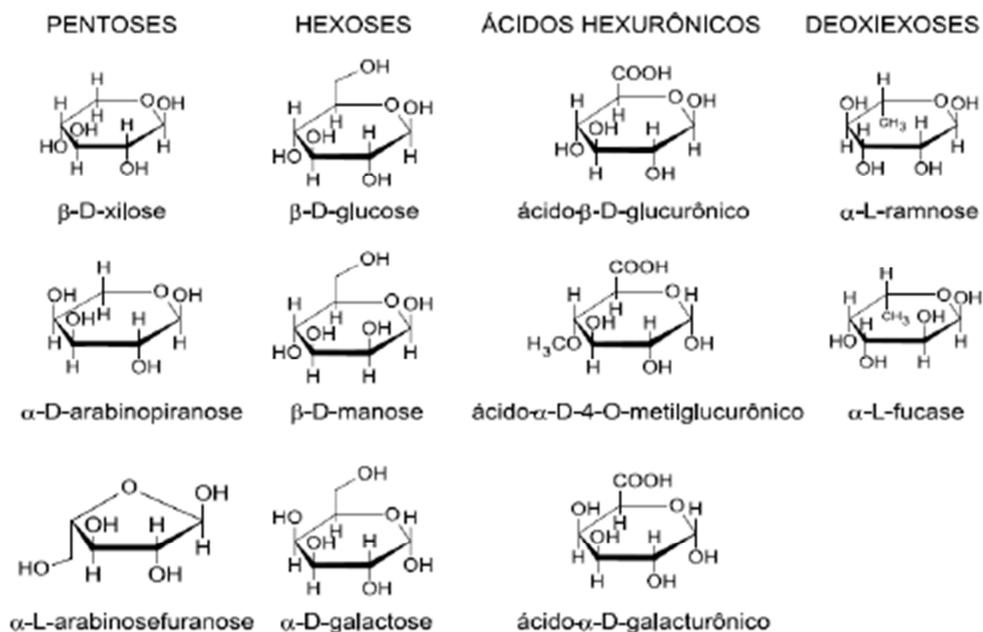
Fonte: TIMAR-BALAZSY E EASTOP, 1998.

2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são genericamente caracterizadas como uma família de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal aparece em proporções condensadas e de forma variada representando cerca de 20-40% em peso da biomassa vegetal. Apresenta estrutura amorfa devido à sua natureza ramificada, é mais parecida com a celulose do que com a lignina e suas cadeias laterais conseguem interagir mais facilmente com a celulose, proporcionando mais estabilidade e flexibilidade ao agregado (BALAT & BALAT, 2008).

É definida como um heteropolímero formado monossacarídeos como as pentoses: D-xilose, L-ramnose e L-arabinose; as hexoses: D-glucose, D-manose e D-galactose e ácidos urônicos como por exemplo: o ácido 4-O-metil-D-glucurônico e galacturônico, como mostra a Figura 6 (DRABER, 2013).

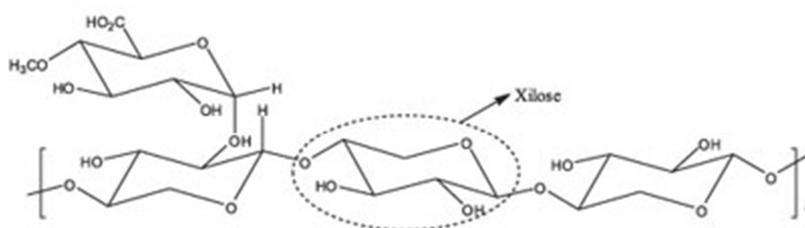
Figura 6: Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.



Fonte: MORAIS *et al.*, 2005.

A xilose é o componente que se apresenta em maior quantidade na hemicelulose, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (principal componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β-1,4), como mostra a Figura 7 (SANTOS, 2010).

Figura 7: Representação esquemática da hemicelulose.



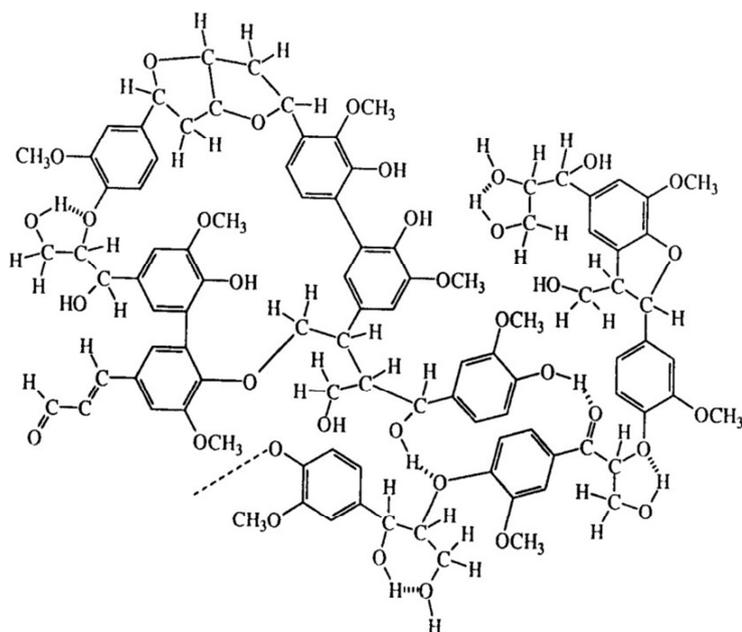
Fonte: Adaptado por RAMOS, 2003.

2.2.3 Lignina

A lignina é depois da celulose, o segundo mais abundante biopolímero terrestre e é responsável por aproximadamente 30% do carbono orgânico na biosfera. Derivado de moléculas fenólicas é formado a partir de três constituintes básicos, que são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Este heteropolímero amorfo é constituído de unidades

de fenilpropano (ácido coniferílico ou ferrúlico, ácido sinapílico e ácido p-cumarílico) conectadas, como mostra a Figura 8. Classificado como o mais importante componente não-carboidrato da biomassa vegetal e um dos principais componentes presente no bagaço de cana-de-açúcar (BOERJAN *et al.*, 2003; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Figura 8: Representação estrutural da lignina.



Fonte: ROSA & GARCIA, 2009.

Os álcoois aromáticos presentes na composição da lignina atribuem rigidez e força considerável no tecido lenhoso encontrados em plantas, o que aumenta a dificuldade na quebra da estrutura devido às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que confere maior resistência à celulose e dificulta à acessibilidade das enzimas às fibras da celulose (BOERJAN *et al.*, 2003).

2.2.4 Cinzas e Extrativos

Próximo à parede celular da biomassa lignocelulósica existe numerosas substâncias de baixo peso molecular, pertencente a classes muito diferente em termos de composição química e, portanto há dificuldades em se encontrar um sistema claro e compreensivo de classificação (KLASS, 1998).

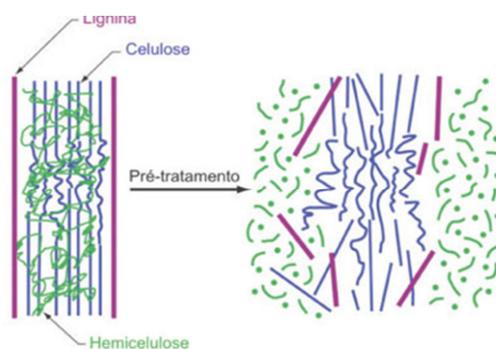
Inclui-se uma diversidade de substâncias onde pode ser feita uma classificação subdividindo estas substâncias em material orgânico e inorgânico. A fração orgânica é comumente chamada de extrativos onde estão inclusos carboidratos de baixo peso molecular, alcalólides e lignina solúvel. E a fração inorgânica é sumariamente obtida como cinzasem sua maioriasão sais e óxidos de cálcio, potássio e magnésio seguidos de manganês e sódio (MOUTTA, 2009).

2.3 Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos

A fabricação de biocombustíveis através da utilização de biomassa lignocelulósica, só será possível mediante uma separação de seus componentes principais. Para isto, o pré-tratamento é essencial, pois rompe a estrutura da biomassa tornando as moléculas de celulose mais acessíveis às enzimas que convertem os polímeros em açúcares fermentescíveis. O pré-tratamento tem a função de desorganizar a lignina e diminuir a cristalinidade da celulose (PEREIRA *et al.*, 2008). Um processo de hidrólise enzimática com uma prévia etapa de pré- tratamento tem o seu rendimento aumentado de 20% para 90% (NOJIRI, 2009).

O pré-tratamento deve ser seletivo e funcional garantindo a acessibilidade da celulose, ser eficiente em termos de rendimento, evitar a degradação de carboidratos, apresentar consumo reduzido de energia e insumos. O pré-tratamento é composto por uma série de operações que, aplicadas aos materiais lignocelulósicos de forma que desorganize a estrutura da biomassa celulósica, como mostra a Figura 9.

Figura 9: Alterações estruturais no ML determinadas pelo pré-tratamento.



Estas operações são responsáveis por adaptar o bagaço, às condições de transformação, para facilitar o trabalho das enzimas e ácidos que atuam na conversão de carboidratos em açúcares. Estas podem ser classificadas como físicas, químicas, biológicas e podem ser utilizadas associadas/combinadas, como mostra a Tabela 2.

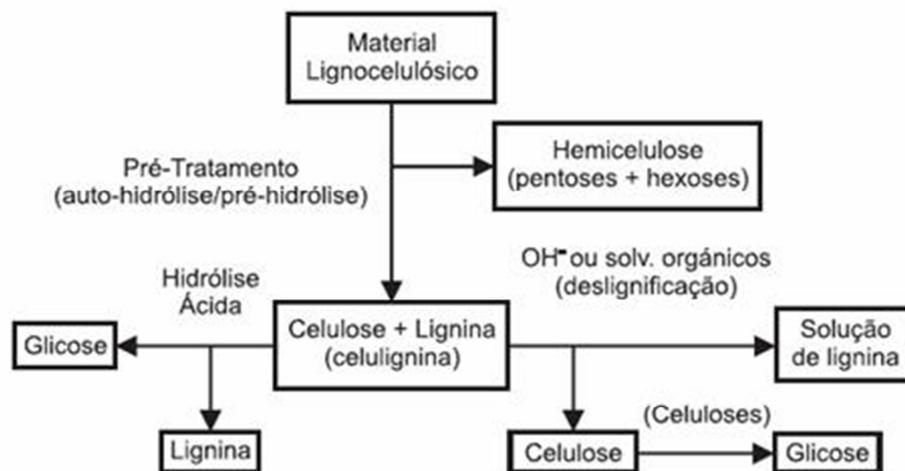
Tabela 2- Processos de pré-tratamento da biomassa.

PROCESSO	DESCRIÇÃO
Físicos	
Explosão de vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160°-260° C) seguido de uma rápida descompressão.
Termoidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose.
Químicos	
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentrados ou diluídos.
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio ou cálcio.
Organosolv	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose.
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos.
Combinados	
Explosão de vapor Catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose
Afex (<i>ammonia fiber explosion</i>)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão
Explosão de CO ₂	Similar à explosão de vapor

Fonte: BNDS e CGEE, 2008.

O pré-tratamento deve ser escolhido com bastante cautela, levando em consideração a biomassa (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). Visto que é etapa mais relevante, pois interfere nas etapas subsequentes do processo de geração de bioetanol, bem como a hidrólise da celulose e a formação de produtos inibidores à hidrólise enzimática e fermentação (RUEDA, 2010). A Figura 10 mostra a separação dos principais componentes dos materiais lignocelulósicos.

Figura 10: Separação dos componentes lignocelulósicos.



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2008.

2.3.1 Pré-Tratamentos por Métodos Físicos

Os métodos físicos permitem aumentar o tamanho dos poros e a área superficial disponível, diminuindo assim a cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização. Existem vários tipos de processos físicos como, por exemplo: o ultrassom, a irradiação, moinho de bolas, martelo de trituração e cilindros de moagem. O ultrassom é aplicado para desintegração da matéria-prima, atividade muito utilizada para a produção de biogás; A moagem permite alterar a estrutura e reduzir o tamanho; enquanto a irradiação permite a melhora na hidrólise enzimática pela ação de raios gama, feixe de elétrons ou micro-ondas. No entanto os efeitos causados pelos métodos físicos podem não ser eficazes o suficiente para o tratamento da biomassa, sendo necessário utilizá-los na maioria das vezes associado a outros tratamentos (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

2.3.2 Pré-Tratamentos por Métodos Químicos

O pré-tratamento químico consiste na utilização de uma substância química seja ela ácida ou básica visando solubilizar a hemicelulose e lignina. Dentre eles: ácidos diluídos e concentrados, hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, ozonólise e organosolv. No Brasil, os reagentes ácidos mais utilizados são ácidos sulfúricos,

clorídricos e nítricos (concentrados ou diluídos). Com o pré-tratamento ácido pode-se conseguir altas taxas de reação, no entanto esses processos podem ser diferenciados de acordo com as condições aplicadas de temperatura e concentração. A temperatura de 160°C é vista como referencial, podem ser utilizadas temperaturas mais altas, a fim de acelerar o processo e atingir taxas aceitáveis de conversão de celulose em glicose, fazendo uso do tratamento ácido se faz necessário o ajuste do pH antes da continuidade as etapas seguintes de hidrólise e fermentação, visto que com a elevada acidez pode dificultar o processo de fermentação (HAMELINCK *et al.*, 2005).

Rabelo (2007) realizou estudo de otimização da etapa de pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino em bagaço de cana não moído, obtido de cana queimada e colheita manual, tendo como objetivo a maximização da concentração de glicose após a hidrólise enzimática, e determinou as condições ótimas do pré-tratamento em 1h de reação, 25°C, 4g de bagaço de cana-de-açúcar não peneirado em 100mL de solução de peróxido de hidrogênio 7,355% (v/v) em pH 11,5.

Rueda (2010) estudou a produção de açúcares fermentescíveis a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com os ácidos sulfúrico e fosfórico diluídos e deslignificado com hidróxido de sódio (NaOH). Avaliando a influência do tempo de pré-tratamento (h), temperatura (°C) e concentração de ácido sulfúrico ou fosfórico. Depois do pré-tratamento ácido, o bagaço foi deslignificado por 1h a 100°C com 1%p/v. Os resultados mostraram que ambos pré-tratamentos podem levar a altos rendimentos de glicose na hidrólise enzimática. Os melhores resultados para o ácido fosfórico foram obtidos quando o bagaço foi pré-tratado a 140°C, 120 min e 0,5%p/v de ácido fosfórico. Quando o ácido sulfúrico foi usado, os melhores resultados foram obtidos para pré-tratamentos a 100°C por 15 min e com 0,5%p/v de ácido sulfúrico.

A aplicação do tratamento ácido pode ser em grande parte limitada tendo em vista a possibilidade de corrosão do equipamento, maior tempo de reação e consumo de energia, assim como a obrigação para a recuperação do ácido depois de tratamento. Durante o pré-tratamento, lignina e hemicelulose são solubilizados e decompostos na fase aquosa, enquanto que a celulose permanece na fração de sólida. Compostos aromáticos, como furanos e fenóis são propensos a sofrer reações de condensação à temperatura ambiente (BUCHERT *et al.*, 1990) e a altas temperaturas (KLINKE *et al.*, 2002; SHEVCHENKO *et al.*, 2000), resultando no precipitado escuro, o qual já pode ter

ocorrido a formação dos inibidores. Para produção de bioetanol não é um exemplo atrativo de pré-tratamento, pois é responsável pela formação dos inibidores devido às condições drásticas de processo, quando se utiliza ácido concentrado com elevadas temperaturas. Em contrapartida Nascimento (2011), ressalta as vantagens em se utilizar o tratamento ácido dentre eles a solubilização da hemicelulose e o custo acessível.

2.3.3 Pré-tratamentos por Métodos Biológicos

Os microrganismos (MO) também podem ser usados para pré-tratar a biomassa lignocelulósica e melhorar a hidrólise enzimática, são utilizados microrganismos semelhantes a fungos e bactérias responsáveis em degradar em torno de 40% de lignina e 80% de hemicelulose, e em menor quantidade a 20 e 30% de celulose. Durante o processo de deslignificação, os MO secretam enzimas extracelulares (peroxidases e lacases) as quais são responsáveis pelo processo. Este pré-tratamento requer menos energia e tem uma efetiva deslignificação, ainda podendo ser utilizado associado a outros métodos. No entanto um dos fatores que desfavorecem a utilização desse método é o tempo dispendioso de atuação dos MO's sobre a biomassa, o que retrata uma desvantagem a utilização do mesmo em relação ao custo-benefício (SUN & CHENG, 2002).

2.3.4 Pré-tratamentos Associados

Os processos físico-químicos incluem principalmente os processos hidrotérmicos, tais como hidrólise e a explosão com vapor. Estes métodos baseiam-se na utilização de água ou vapor, ou ambos, e calor para o tratamento da biomassa. No tratamento hidrotérmico, a pressão ($P > 5\text{MPa}$) é aplicada para manter a água no estado líquido à temperaturas elevadas de 170-230°C (WYMAN *et al.*, 2005). Nestas condições ocorre hidrólise dos grupos acetila das hemiceluloses (ZANDERSONS *et al.*, 2004).

Na explosão a vapor a biomassa é tratada com vapor de água saturado a elevada pressão sendo depois a pressão reduzida rapidamente o que faz com que o material sofra uma descompressão súbita e explosão. É comum a utilização da biomassa com diversos catalisadores químicos, como por exemplo, o ácido sulfúrico, dióxido de enxofre,

dióxido de carbono ou agentes alcalinos à base de amônia resultando no processo AFEX. Neste pré-tratamento, há extração de lignina e mudança na estrutura celulósica o que facilita a formação de novas ligações, permitindo assim que na hidrólise ocorra a formação de inibidores (SOKHANSANJ *et al.*, 2005; ADAPA *et al.*, 2010; SHAW, 2008). A eficiência do processo de explosão a vapor é afetada por vários fatores são eles: a temperatura, o tempo de residência, o tamanho de partícula e o teor de umidade (SUN & CHENG, 2002).

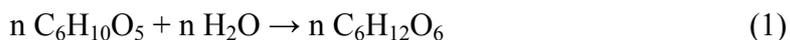
Segundo Schlittler (2006), alguns pré-tratamentos se processam sobre condições tão extremas que além de separar as frações e hidrolisá-las em seus monômeros, são capazes de degradar as moléculas em subprodutos indesejáveis. Isto é muito comum nos processos com temperaturas muito elevadas, por longos tempos de exposição ou com elevadas concentrações de ácidos. Esses subprodutos podem causar efeitos inibitórios nas etapas seguintes e por isso precisam de uma destoxificação.

A explosão a vapor permite aumentar significativamente a digestibilidade enzimática. Nestes processos, por apresentarem um pH moderado, os problemas de corrosão são muito reduzidos e os passos de reciclagem dos ácidos e dos precipitados poderão não ser necessário, reduzindo os custos. Esse método é comumente visto, porque é o que oferece uma menor geração de compostos inibitórios (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Um estudo realizado por Zheng *et al.*,(1998), compara os processos de explosão a vapor com dióxido de carbono e a explosão a vapor com amônia no pré-tratamento da mistura de papel reciclado e bagaço de cana. Os autores verificaram que explosão com dióxido de carbono foi mais eficaz em termos de custos e não ocorreu a formação de compostos inibidores que possam influenciar na hidrólise e fermentação.

2.4 Hidrólise

A hidrólise pode ocorrer tanto pela ação das enzimas como de ácidos. A hidrólise enzimática se mostra mais propícia por ser mais seletiva e necessitar de equipamentos menos rigorosos do que a hidrólise ácida, em ambos os processos de hidrólise, a celulose é convertida em glicose conforme a Equação 1 (SANTOS, 2014).



Essa reação é catalisada por enzimas altamente específicas, as celulases. Na verdade, trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases: as endoglucanases, as exoglucanases (subdivididas em celobiohidrolases e glucanohidrolases (GHs)) e as β -glucosidases (SILVA, 2010; ZHOU *et al.*, 2009).

2.4.1 Formação dos Inibidores

Os componentes tóxicos que são inibidores da fermentação podem ser classificados em dois grupos: inibidores centralizados na biomassa lignocelulósica que são aqueles facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento e os que dependem das condições operacionais empregadas no pré-tratamento. Os pré-tratamentos ácidos combinados a altas temperaturas são fortemente passíveis a produção de compostos tóxicos, da mesma forma aqueles realizados em condições severas de temperatura, tempo, pressão, pH e adição de catalisadores estes afetam diretamente as variáveis de processo da fermentação como:

- condições fisiológicas das células;
- concentração de oxigênio dissolvido;
- pH do meio.

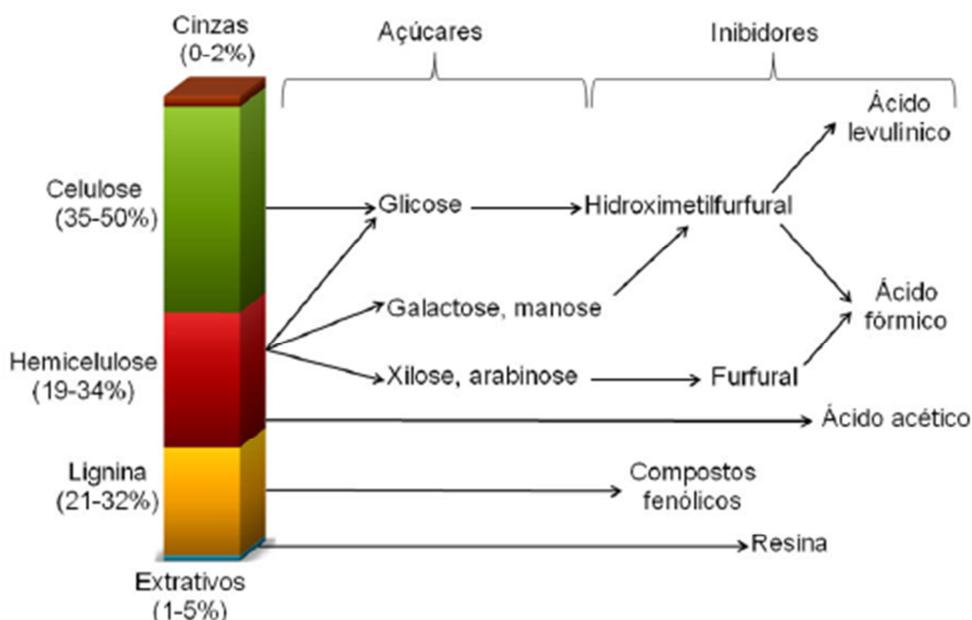
Os parâmetros são afetados pela toxicidade dos compostos inibitórios que interferem diretamente no metabolismo dos organismos fermentativos, reduzindo assim a eficiência na geração dos produtos desejados, como os açúcares (TAHERZADEH *et al.*, 2000).

Segundo Olsson e Hahn-Hägerdal (1996) e Parajó *et al.*,(1998), os compostos tóxicos oriundos dos pré-tratamentos podem ser divididos em quatro grupos: produtos de degradação de açúcares, produtos de degradação da lignina, compostos derivados da estrutura lignocelulósica e íons de metais pesados.

Os principais produtos e subprodutos gerados através da degradação da celulose são a glicose e a hemicelulose à xilose, arabinose, manose, galactose e ácido acético.

Sob altas pressões e temperaturas glicose e xilose são degradadas a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente. Ácido levulínico e ácido fórmico são gerados pela degradação de HMF e compostos fenólicos são gerados a partir da degradação parcial de lignina, como siringaldeído, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico, vanilina e ácido ferúlico (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). A Figura 11 mostra a procedência de cada um dos inibidores provenientes dos diferentes constituintes da biomassa.

Figura 11: Formação dos compostos inibitórios.



Fonte: Adaptado de PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000.

Dessa forma, os materiais lignocelulósicos quando pré-tratados/hidrolisados disponibilizam uma fração de hexoses resultante da celulose que é facilmente fermentescível por leveduras industriais como *Saccharomyces cerevisiae*, e uma fração de pentoses (xilose e arabinose), provenientes da hidrólise da hemicelulose, carboidratos estes não diretamente fermentescíveis a etanol. Assim há necessidade de utilizar microrganismos resistentes aos mecanismos e tolerantes ao estresse, sob as diversas condições a que eles são submetidos durante a fermentação alcoólica de hidrolisados lignocelulósicos (MENDES *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Produtos de Degradação dos Açúcares

2.4.1.1.1 Hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural é um dos principais compostos tóxicos estudado, originário da degradação das hexoses e que se decompõe em ácido levulínico e ácido fórmico. Seu efeito inibitório é semelhante ao furfural, porém considerado menos tóxico. Estudado por Palmqvist & Hahn-Hagerdal, (2000), sua concentração em hidrolisados hemicelulósicos é normalmente baixa devido a três fatores:

- (1) a baixa quantidade de hexose em hemicelulose;
- (2) as condições empregadas no processos hidrolíticos, que normalmente não se degradam hexoses em grandes quantidades;
- (3) e a alta reatividade deste composto.

Como relata Bellido *et al.*, (2011), no estudo realizado em palha de trigo pré-tratada em explosão a vapor e hidrolisada pela *Pichia stipitis*, as fermentações realizadas foram completamente inibidas por um efeito sinérgico devido à presença de 0,05 g/L de HMF; 0,15 g/L de furfural e 1,5 g/L de ácido acético.

Modig *et al.*, (2002), avaliaram a tolerância de linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, relatando a inibição HFM e furfural, na concentração de 1,0 g/L, o que acarretou em uma disfunção no crescimento da levedura devido a presença de 50% HMF e 90% de furfural.

Taherzadeh *et al.*, (2000), reportaram que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético foi inibido em 70% quando em presença de 4g/L de HMF, e em 89% quando em presença de 4g/L de furfural. Porém quando ambos foram avaliados na proporção de (2g/L) furfural e (2g/L) HMF, o crescimento deste microrganismo foi inibido completamente, sugerindo efeito sinérgico de inibição entre esses dois compostos.

Martinez *et al.*,(2000), observaram que a produção de etanol por *E. coli* a partir de hidrolisados hemicelulósicos do bagaço de cana foi afetada por HMF e furfural só quando as suas concentrações eram mais elevadas do que 0,9g/L. Individualmente, estes compostos foram apenas parcialmente responsáveis pela toxicidade do hidrolisado.

Mesmo sendo considerado menos tóxico que o furfural, o HMF tem sua toxicidade acentuada devido à presença de aldeídos (substâncias furânicas) que pode reagir com determinadas moléculas biológicas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e causar danos a membrana celular (TAHERZADEH *et al.*, 2000).

2.4.1.1.2 Furfural

As pentoses se degradam a furfural, um composto tóxico que dependendo da sua concentração no meio fermentativo, inibem as leveduras afetando a taxa específica de crescimento que reflete sobre a produtividade do etanol (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). Diferentes respostas são obtidas a influência do furfural e hidroximetilfurfural, isso se dá devido à variedade dos MO's.

Palmqvist & Hahn-Hagerdal, (2000), relata que a *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza o furfural sobre condições aeróbias e anaeróbias. De acordo com Allen *et al.*, (2010), asseguram que para a levedura sobreviver em presença de furfural, precisa reduzir o composto a sua forma alcoólica (furano metanol) menos tóxica. Os autores verificaram que a concentração de 25mM de furfural resultou em um aumento da fase lag de crescimento da levedura, e que em concentrações de 50mM o crescimento da levedura é totalmente inibido.

Nigam (2001), descobriu que uma concentração de furfural de 0,25 g/L no meio de fermentação não foi suficiente para reduzir o rendimento de etanol por *Pichia stipitis* e a produtividade, mas uma concentração tão alta como 1,5 g/L interferiu na respiração e o crescimento do microrganismo. Rendimento em etanol e produtividade foram reduzidos em 90,4 % e 85,1 %, respectivamente. O mesmo autor ainda testou três meios sintéticos, cada um contendo apenas um tipo de composto tóxico, e descobriu que as porcentagens de redução no rendimento e produtividade, foram, respectivamente, 30,2% e 59,6% para o meio com ácido acético, 7,0% e 12,8% para o meio com furfural e 14,0% e 44,7% para o meio com derivados de lignina. Assim, o efeito inibidor destes compostos é mais pronunciado quando combinados, devido ao seu efeito sinérgico.

2.4.1.2 Produtos de Degradação da Lignina

A partir da hidrólise da lignina são sintetizados vários compostos dentre eles os: aromáticos, poliaromático e fenólicos como siringaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanilínico, vanilina e ácido ferúlico. Os compostos fenólicos têm um efeito inibidor considerável durante a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, e aqueles com baixo peso molecular são os mais tóxicos. Os compostos fenólicos causam a perda da integridade de membranas biológicas, afetando a capacidade de atuarem como barreira seletiva das enzimas. Em consequência, tanto o crescimento celular e assimilação de açúcar são reduzidas (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Mussanato *et al.*, (2004), apontam que as concentrações de furfural e HMF presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, não são as principais responsáveis pela inibição do metabolismo de *Candida guilliermondii*, para a produção de xilitol, e que diminuição do rendimento pode estar ligado aos produtos derivados da lignina.

Parajó *et al.*,(1998), relataram que a degradação dos produtos da lignina são mais tóxicos para os microrganismos do que o furfural e hidroximetilfurfural, mesmo quando em baixas concentrações. Eles também relataram que o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolisados de madeira para produção de xilose foi totalmente inibido pela vanilina em concentrações de 5,0 ou 3,7g/L, respectivamente.

2.4.1.3 Compostos Derivados da Estrutura Lignocelulósica

Os extrativos da matéria-prima como resinas, taninos e terpeno, assim como o ácido acético, derivados do grupo acetila presentes na hemicelulose, são produzidos durante o processo de hidrólise. De acordo com McMillan (1994), os extrativos produzem menos inibição no crescimento microbiano do que os derivados de lignina e ácido acético.

A toxicidade do ácido acético varia de acordo com as condições de cultivo empregadas no processo fermentativo. Segundo Tong *et al.*, (2010), em meio YPD foi

adicionada com 0,5% de ácido acético em v/v, testando várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, resultou no menor crescimento apresentando um pH de 6,2.

Van Zyl *et al.*, (1991), utilizaram *Pichia stipitis* para produzir etanol a partir de bagaço de cana hidrolisado hemicelulósico e verificaram que o grau de inibição provocado por ácido acético não dependia apenas de sua concentração, mas também da concentração de oxigênio e do pH. O pH 6,5 e com concentrações de ácido acético acima de 4 g/L, a produção de etanol começou a diminuir, reduzindo-se para 50% quando a concentração de ácido atingiu 15 g/L.

2.4.1.4 Íons de Metais Pesados

Os íons de metais pesados como ferro, cromo, níquel e cobre surgem devido à corrosão do equipamento durante a hidrólise, e sua toxicidade inibe o metabolismo das enzimas. Watson *et al.*, (1984), avaliaram os efeitos de cátions metálicos no crescimento celular de *P. tannophilus* sobre a atividade da enzimas envolvidas no metabolismo da xilose em meio sintético empregando concentrações de cátions semelhantes aos encontrados em hidrolisados. A atividade microbiana foi ligeiramente reduzida quando os íons de cobre, níquel, cromo e ferro e estavam presentes em quantidades abaixo de 4, 5, 100 e 150 mg/L, respectivamente. Por outro lado, uma redução de 60% foi produzido por íons de níquel, a uma concentração de 100 mg/L.

2.5 Métodos de destoxificação dos hidrolisados

Segundo Taherzadeh *et al.*, (2000), existem quatro abordagens diferentes para minimizar a presença de inibidores de hidrolisados lignocelulósicos: (1) evitar formação de inibidores durante a hidrólise; (2) desintoxicar o hidrolisado antes da fermentação; (3) desenvolver espécies de MO's capazes de resistir a inibidores; (4) converter compostos tóxicos em produtos que não interfiram no metabolismo microbiano. Estes autores também relataram que novas espécies microbianas metabolicamente modificadas toleram os inibidores e podem diminuir a necessidade de desintoxicar hidrolisados. No entanto, no caso de alguns compostos há espécies que ganham resistência.

A etapa de destoxificação propõe transformar inibidores em compostos inativos ou reduzir suas concentrações. A eficiência do método de destoxificação vai depender do tipo de hidrolisado lignocelulósico e do tipo de MO utilizado, pois cada tipo de hidrolisado tem um diferente grau de toxicidade e cada espécie de MO tem um diferente grau de tolerância aos inibidores.

Os métodos de destoxificação se dividem em três classes: físicos (evaporação, separação por membranas), químicos (ajuste de pH, overliming, tratamento com carvão ativado e com resinas de troca iônica) e biológicos (uso de enzimas). A concentração do hidrolisado por evaporação á vácuo é um método físico que reduz significativamente a compostos voláteis como ácido acético, furfural e alguns compostos fenólicos como a vanilina (MOUTTA, 2009).

Dentre os mais utilizados estão: O ajuste de pH é geralmente associado a outros métodos, consiste na correção do pH do hidrolisado para um valor adequado ao crescimento microbiano. Em decorrência disso, pode acontecer o surgimento de um precipitado que contenha compostos fenólicos, metais pesados, furfural, acetato e terpenos que podem ser retirados por uma etapa posterior de filtração. Por si só não têm eficácia, por isso a necessidade de ser combinado a outro método.

Como exemplo de tratamento químico o overliming consiste na elevação de pH com hidróxido de cálcio para 9-12, seguido de ajuste de pH para a condição de fermentação com ácido sulfúrico e ácido fosfórico. Nestas condições, é favorecida a dissociação de ácidos fracos, como o ácido acético e a grande maioria dos compostos fenólicos, permitindo a sua remoção parcial. Outros solventes orgânicos como tricloroetileno e benzeno capazes de extrair o ácido acético (CARVALHEIRO *et al.*, 2005).

Fonseca (2009) fez o estudo de destoxificação do bagaço de cana utilizando métodos biológicos comparando as leveduras *Issatichenkia occidentalis* e *Issaticehnkia orientalis* capazes de metabolizar os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos. Ainda segundo estudos levantados por Fonseca (2009), adsorção em resina de troca iônica tem sido muito utilizada na destoxificação, entretanto o alto custo dessa técnica inviabiliza seu uso industrial.

Os carvões ativos vêm sendo utilizados para tratamentos como, purificação, destoxificação, desodorização, filtração, descoloração, declorificação, remoção ou modificação de sabor e concentração de uma infinidade de materiais e substâncias líquidos e gasosos. De acordo com Mussanato *et al.*, (2004), a descontaminação com carvão ativo têm se mostrado altamente eficientes na remoção de compostos que transmitem cor e odor, e na remoção de metais e compostos orgânicos de baixa massa molar.

Processos combinados são muito utilizados como Carvalho Júnior *et al.*, (2005) que obteve melhores resultados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço-de-cana, utilizando CaO e H₃PO₄, a diminuição do pH para 2,5 com H₂SO₄, além do emprego de menor concentração de carvão ativado (1%). Observaram uma remoção de 100% de furfural e HMF, além da remoção de aproximadamente 55 e 80% de ácidos e compostos fenólicos respectivamente.

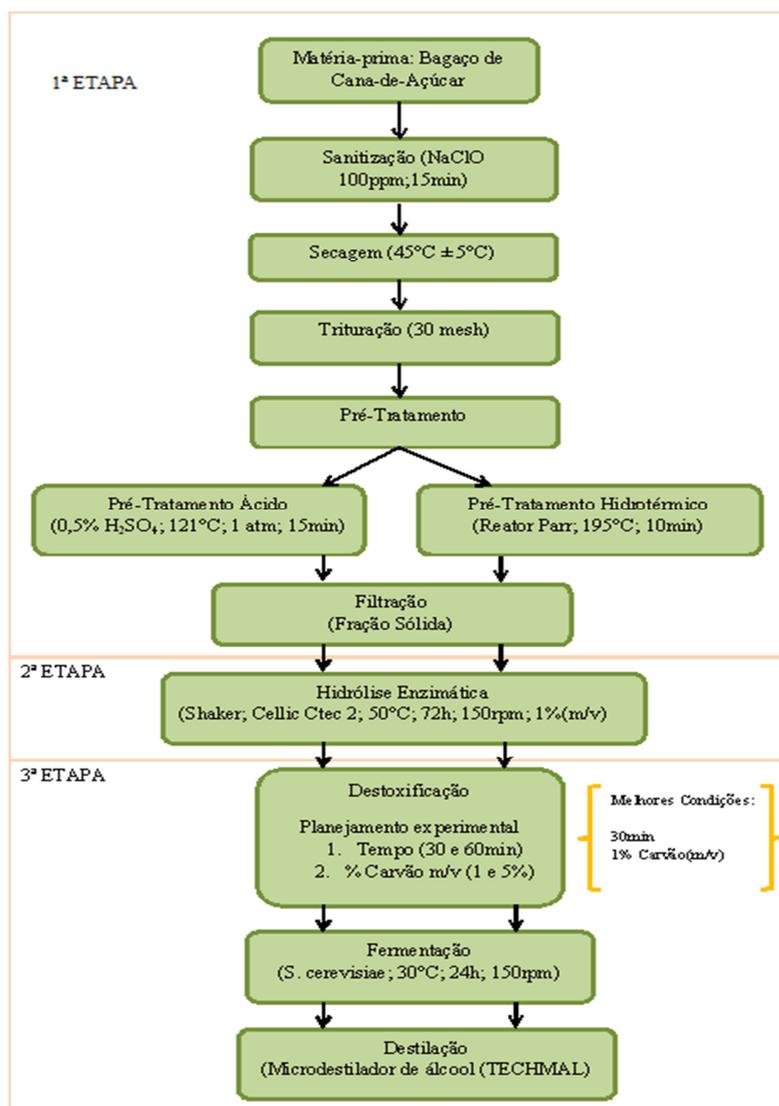
O processo de destoxificação com carvão ativado consiste em colocar o hidrolisado em contato com o carvão numa coluna empacotada de carvão, em geral num processo em batelada. Relatos da literatura referenciam modos de ativação do carvão com ácido, sendo necessária a caracterização do carvão utilizado (tempo de contato, granulometria do carvão, concentração do carvão ativado e temperatura), tais características podem influenciar na adsorção dos compostos, e sendo estimadas pode-se otimizar as condições de processo (CARVALHEIRO, 2005; PARAJO *et al.*, 1998; MUSSANATO *et al.*, 2004). Esse processo apresenta um baixo custo e de boa eficiência na remoção dos compostos inibitórios como compostos fenólicos, de derivados do furano (HMF e furfural), pigmentos e ácidos livres.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas e contou com a colaboração da infraestrutura dos seguintes laboratórios: Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Bebidas e Laboratório de Ensino em Engenharia Química. Em parceria com a Universidade Federal de São Carlos que disponibilizou as instalações do Laboratório de Engenharia Bioquímica e o Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos.

O trabalho foi dividido em três partes, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12: Fluxograma do Procedimento Experimental.



Na primeira etapa foi realizada o preparo da matéria-prima, realização do pré-tratamento e caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar. Na segunda etapa foi obtido o hidrolisado lignocelulósico do bagaço da cana-de-açúcar. Na terceira etapa foi realizada a destoxificação dos diferentes pré-tratados onde foi possível avaliar sua eficiência comparando distintas condições de tempo e concentração de adsorventes. As amostras obtidas nas melhores condições seguiram para fermentação e destilação.

3.1 Coleta e preparo da matéria-prima

O bagaço de cana de açúcar *in natura* utilizado nesse trabalho é um mix proveniente da moagem da Usina Coruripe na cidade de Coruripe localizada no estado de Alagoas. As amostras de bagaço levadas ao laboratório foram higienizadas com hipoclorito de sódio a 100ppm durante 15 minutos. Em seguida foram colocadas em estufa de circulação forçada a $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ para secagem até peso constante. Posteriormente o bagaço foi triturado em um moinho de facas, tipo Willey para obter-se uma granulometria de 30 mesh, conforme Figura 13 e 14.

Figura 13: Moinho de Facas (Tipo Willey).



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Figura 14: Peneira de aço inox AISI 304 com malha de 30mesh.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

O teor de umidade foi avaliado nas amostras empregando uma balança determinadora de umidade, modelo ID-50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) a 100°C em modo automático, como mostrado na Figura 15. Para cada amostra (in natura e pré-tratados), a determinação da umidade foi realizada em duplicata, usando-se o valor médio.

Figura 15: Determinador de Umidade Modelo ID50.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.2 Pré-tratamento

Para a realização do pré-tratamento, a metodologia é específica de acordo com o pré-tratamento utilizado. Foram realizados dois pré-tratamentos: com *solução de ácido diluído* que segundo Rueda (2010), apesar de algumas desvantagens como a necessidade de equipamentos especiais para realização do mesmo, o pré-tratamento

ácido gera altos rendimentos de glicose quando utilizado o bagaço de cana-de-açúcar; e *hidrotérmico*, que de acordo com Mochizuki *et al.*, (2002), O tratamento hidrotérmico que utiliza água à temperaturas de 170 a 220°C, tem sido aplicado como pré-tratamento de material lignocelulósico para tornar mais efetiva a ação enzimática para a conversão de celulose em glicose, o que proporciona uma menor degradação dos compostos solúveis existentes no hidrolisado. Ao final de cada ensaio de pré-tratamento foi realizada a filtração, e utilizado a fração sólida para proceder as demais etapas, a mesma foi lavada em água corrente até atingir a neutralidade. Foi determinado o rendimento mássico, a partir Equação 2.

$$\text{Rendimento mássico (\%)} = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

$m_{inicial}$ = massa inicial seca submetida ao pré-tratamento (g)

m_{final} = massa final seca após lavagem até a neutralidade (g).

3.2.1 Pré-tratamento Ácido

O pré-tratamento ácido foi realizado conforme proposto por Santos (2014), adotando as condições de reação na relação 1:10 (m/v) com bagaço *in natura* (massa seca) – H₂SO₄ 0,5%, tempo de contato de 15 minutos a 121°C a 1atm em autoclave. Ao atingir a temperatura e o tempo correspondente o material pré-tratado foi filtrado e a fração sólida mantida por 24 horas em capela de fluxo laminar, com o intuito de se obter um teor de umidade em torno de 10%, como mostra a Figura16.

Figura 16: Etapas do pré-tratamento ácido.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.2.2 Pré-tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado conforme descrito por SILVA *et al.*,(2010), onde é utilizado um reator PARR (Fabricante PARR Instrument Company Moline, Illinois, EUA), modelo 4580 HP/HT com capacidade de 5 L, e PID para controle de temperatura, como mostra a Figura 17.

Figura 17: Reator PARR.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

O bagaço *in natura* (massa seca) foi colocado no reator de aço inoxidável e misturado com a água na proporção de 1:10 (m/v) fixo, na rotação de 200rpm, nas condições de 195°C durante 10 minutos de reação, sendo essa condição de (temperatura/tempo) a melhor referenciadas por Santos (2014), em termos de açúcares obtidos após pré-tratamento. Ao término do pré-tratamento o material foi submetido à filtração com intuito de separar a fração sólida da fração líquida, a fração sólida foi recolhida e mantida em capela de fluxo laminar por 24 horas, para se obter um teor de umidade em torno de 10%, conforme a Figura 18.

Figura 18: Etapas do pré-tratamento hidrotérmico.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.2.3 Caracterização Química da Biomassa

As amostras dos bagaços *in natura* e pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e hidrotérmicamente foram caracterizadas segundo o procedimento descrito por Gouveia *et al.*, (2009), após o material ser triturado em moinho de facas para obter-se uma granulometria de 30 mesh. A amostra de bagaço *in natura* seguiu para a etapa de quantificação de extrativos para posterior caracterização.

Na hidrólise ácida, amostras de 2g (massa seca) de material lignocelulósico foram pesadas com precisão de 0,1mg e transferidas para um béquer de 100mL para serem tratadas com 10mL de H₂SO₄ 72% (v/v), sob vigorosa agitação com um bastão de vidro, em um banho termostático a 45,0 ± 0,5 °C por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50mL de água destilada, e a amostra transferida quantitativamente para um erlenmeyer de 50mL, e em seguida acrescentando 225mL de água destilada, que totaliza um volume de 275mL. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 minutos a 121°C.

Após a descompressão da autoclave, os erlenmeyeres foram resfriados à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico que contém o hidrolisado foi armazenado para posterior análise de carboidratos, conforme Figura 19.

Figura 19: Caracterização química dos bagaços.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.2.3.1 Determinação de Lignina Insolúvel na Fração Sólida.

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida foi lavado com 1500mL de água destilada, para remoção de ácido residual atingindo um pH próximo da neutralidade, e seco em estufa à temperatura de 100°C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina, conforme a Equação 3.

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (3)$$

Onde: L_{Ki} =Lignina Klason insolúvel; M_K =massa de lignina insolúvel seca; M_C =massa de cinzas; M_A =massa da amostra seca.

3.2.3.2 Determinação de Lignina Solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). Uma alíquota de 5mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi transferida para um balão volumétrico de 100mL e acrescentado 40 gotas de NaOH 6,5mol/L, com intenção de deixar o pH final próximo a

12. Em seguida o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 4.

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (4)$$

Onde: C_{lig} = concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T = absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; A_{pd} = ($c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2$) – absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ε_1 e ε_2 são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L/g.cm.

3.2.3.3 Determinação de Carboidratos, Ácidos Orgânicos, Furfural e Hidroximetilfurfural na Fração Líquida

O hidrolisado da etapa anterior foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Phenomenex), antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. Em seguida foram injetadas no cromatógrafo líquido soluções contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose, com intuito de construir as curvas de calibração dos carboidratos. A construção das curvas de calibração dos ácidos orgânicos foi realizada através da injeção de soluções contendo ácido acético e ácido fórmico. As condições das análises foram: coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad); fase móvel: H_2SO_4 0,005 mol/L; vazão de 0,6 mL/min; temperatura do forno: 45°C; em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A.

Construíram-se curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural injetando soluções padrões destes dois compostos, para determinar as concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural foram realizadas análises cromatográficas (CLAE). As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 μ m e analisadas. Condições experimentais: coluna C-18 (Waters, 3,9 x 300 mm), fase móvel solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de solução de ácido acético, vazão de 0,8

mL/min, temperatura do forno 25°C e detector UV/VIS (SPD-10A) a 274 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

3.2.3.4 Determinação de Cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel, a amostra juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente à 150°C por 30 min, 250°C por 20 min e mais 120 min a 800 °C, em uma mufla como mostra a Figura 20, (modificado de ROCHA *et al.*, 1997).

Figura 20: Mufla.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Na determinação das cinzas totais, pesou-se aproximadamente 1g (massa seca) do material em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 5.

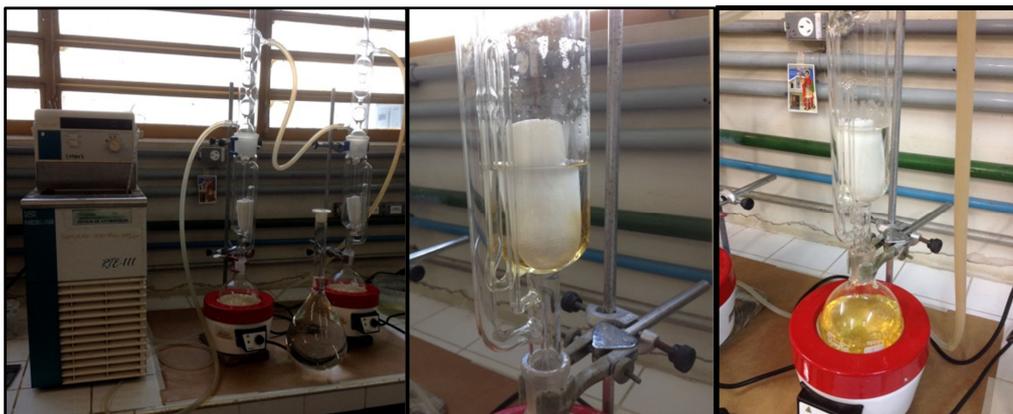
$$\%Cinzas = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (5)$$

Onde: % cinzas = percentual em massa de cinzas; M_c = massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_a = massa da amostra em base seca.

3.2.3.5 Determinação de Extrativos

Para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi determinado o conteúdo de extrativos baseada na norma NREL nº10 *Determination of Extractives in Biomass*. Pesou-se 7,0g (massa seca) de bagaço *in natura* e adicionou-se a um cartucho de celulose previamente seco em estufa a 100°C e colocou-se em um sistema de extração (Soxhlet -Diogolab), onde foi utilizado 500mL de etanol 95% que segundo Arantes *et al.*, (2009) solventes com maior caráter polar são compatíveis com flavonóides, cumarinas, taninos, e saponinas. Adicionou-se o solvente ao balão extrator de fundo redondo, ajustando o balão na manta aquecedora, e refluxou-se por 6 horas após o primeiro ciclo de lavagem da amostra, onde se pode observar a transparência da solvente ao redor do cartucho de extração, conforme a Figura 21.

Figura 21: Extrator de Soxhlet.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Por fim, colocou-se em uma placa de Petri, previamente, tarada e deixou-se na capela ligada até se obter massa constante, como mostra a Figura 22.

Figura 22: Cartucho de Celulose.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Calculou-se a massa de conteúdo extraído do bagaço *in natura*, conforme descrito na Equação 6.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{M_b - M_f}{M_b} \right) * 100 \quad (6)$$

F

Onde: M_b = massa de bagaço seco (g); M_f = massa do bagaço livre de extrativos (g).

3.3 Hidrólise enzimática

Para a realização dos experimentos foi utilizada enzima comercial Cellic CTec2 proveniente da empresa Novozymes Latin America. Inicialmente o complexo enzimático foi caracterizado conforme a metodologia proposta por Ghose (1987) que determina a atividade celulósica total das enzimas, visando assim verificar a quantidade utilizada nas hidrólises.

Em tubos de ensaio Folin Wu foram adicionados 1mL de tampão citrato 50mM pH 4,8. Em seguida foram adicionadas 0,5mL de enzima previamente diluída em tampão citrato e tiras de papel de filtro Whatman n°. 1 (1,0 x 6,0cm) como substrato. Os tubos foram incubados em banho termostatzado a 50°C por 60 minutos, como mostra a Figura 23.

Figura 23: Etapas de atividade enzimática.



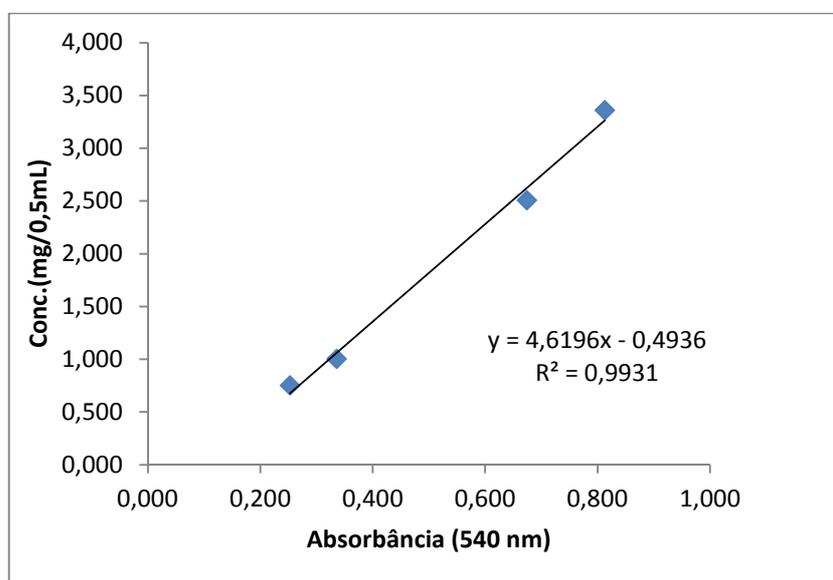
Fonte: Acervo do autor, 2014.

Após o período de incubação, adicionou-se 3mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico(DNS) a cada tubo e agitou-se para cessar a reação enzimática. Em seguida os tubos foram colocados em água fervente no banho-maria por 5 minutos sendo posteriormente resfriados até atingir a temperatura ambiente. Adicionou-se 20mL de água destilada e agitou-se, dando sequência a leitura em espectrofotômetro a 540nm.

Para preparar a solução de DNS usada nos ensaios de atividade enzimática foi pesado 1g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e dissolvido à temperatura ambiente em 20mL de hidróxido de sódio 2mol/L e 50mL de água destilada. Após completar a dissolução do DNS, adicionou-se 30g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle). Para facilitar a dissolução, a solução foi aquecida até no máximo 40°C. Após a adição do sal de Rochelle, completou-se o volume para 100mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro e mantida sob refrigeração.

A curva de glicose foi obtida com valores de concentração de glicose versus absorvância, como mostra a Figura 24.

Figura 24: Curva Padrão de Glicose.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Usando a curva de glicose, foi possível determinar a concentração liberada em cada reação enzimática. E a concentração de enzima foi estimada para exatamente 2,0mg de glicose liberada durante a reação enzimática, definida como Filter Paper Unity (FPU). Com a quantidade de glicose liberada na medida FPU a uma diluição crítica é 2mg, tem-se:

$$\begin{aligned}
 2\text{mg glicose} &= 2 / (0,18 * 0,5 * 60 \mu\text{mol. min}^{-1} . \text{mL}^{-1}) \\
 &= 0,37 \mu\text{mol. min}^{-1} . \text{mL}^{-1}
 \end{aligned}$$

Sendo assim, a quantidade de enzima que libera 2mg de glicose na reação, é definida pela Equação 7.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que realiza 2,0mg de glicose}} \text{ unidade mL}^{-1} \quad (7)$$

As amostras provenientes dos pré-tratamentos descrito nos itens 3.2.1. e 3.2.2., foram submetidas à hidrólise enzimática como adaptado de Silva (2011) utilizando 1% de carga de sólidos(gramas de bagaço/volume de solução). A solução para a hidrólise continha 40mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 1mL de enzima.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 250mL em incubadora refrigerada com agitação, a 150rpm e 50^oC por 72 horas, como mostra a Figura 25. Ao fim da hidrólise, foram determinados os açúcares redutores totais (ART), conforme descrito no item a seguir.

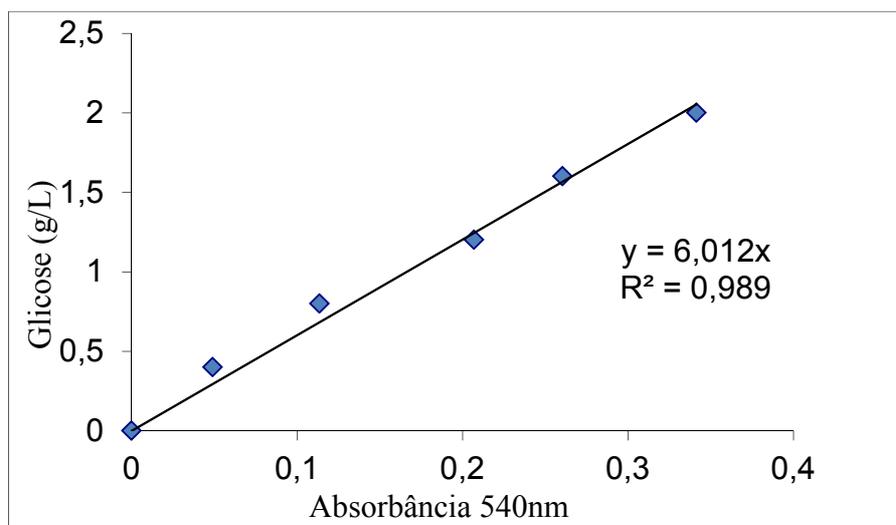
Figura 25: Incubadora refrigerada com agitação TE-424 (TECNAL).



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.3.1 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART)

Proposta por Miller (1959), a determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi feita pelo método espectrofotométrico com leitura a 540nm. Para tal determinação foi necessário o preparo da curva padrão de glicose e da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), conforme Figura 26.

Figura 26: Curva Padrão de Glicose.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

Para comparação, foi coletado 1mL da amostra antes e depois da destoxificação, sendo essas amostras hidrolisadas com 5mL de $H_2SO_4(1,5mol/L)$, levadas a banho fervente por 20min e agitando ocasionalmente a cada 5 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas e adicionaram-se 2 gotas de fenolftaleína para neutralização com NaOH (20%) até a coloração rosa e posteriormente adicionaram-se gotas de $H_2SO_4(1,5mol/L)$ para voltar a coloração transparente. Logo após, as amostras foram homogeneizadas e transferidas para uma proveta, completando o volume de 25mL com água destilada.

Em tubos de ensaio, coletou-se 0,25mL da amostra diluída junto a 0,5mL de água destilada e levou-se para banho fervente, onde foram acrescentados 0,25mL do reagente DNS e mantidas por 5 minutos. Posteriormente resfriaram-se em banho de gelo para bloquear a reação e completou-se com 4mL de água destilada. Na sequência, foi feita a leitura das amostras em espectrofotômetro a 540nm e determinado o ART conforme a Equação 8.

$$ART \left(\frac{g}{L} \right) = diluição * absorbância * fator da curva padrão \quad (8)$$

3.3.2 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido antes e depois da etapa de hidrólise, e também após a destoxificação, por um medidor de pH PHS-3B (pHTek).

3.3.3 Determinação de Sólidos Solúveis (BRIX)

A porcentagem em massa de sólidos dissolvidos em uma solução foi determinada com auxílio do refratômetro, como mostra a Figura 27. O índice de refração de uma solução é uma medida do teor de sacarose e seu conceito é estendido para indicar sólidos solúveis ou Brix em soluções impuras.

Foi utilizado o refratômetro digital, HI 96801 Refractometer, que já indica o valor na temperatura de 20°C. Para aferi-lo, fez-se necessário a leitura com água destilada, devendo a mesma apresentar índice de refração igual a zero.

Figura 27: Refratômetro HI 96801.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.4 Método de destoxificação

Para tratar o hidrolisado e diminuir a concentração dos compostos tóxicos como ácido acético, furfural, HMF e fenóis, provenientes da hidrólise, foi empregada combinação de ácidos e bases para o ajuste do pH do hidrolisado. Em seguida, realizou-se um procedimento de adsorção com carvão ativado comercial, que apresenta característica: pH_{pZC} igual a 8,5, densidade de $0,5g/cm^3$ e área superficial específica (A_{BET}) de $670m^2/g$, capaz de retirar as impurezas de um meio sem que estas interfiram em sua composição. Esse tipo de tratamento é comumente utilizado na descontaminação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (MARTON, 2005).

No ajuste de pH, os resíduos que passaram por tratamento com ácido sulfúrico tiveram seu pH elevados para 7 com a adição CaO (cal virgem) e em seguida o decaimento até pH 4,0, utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4). Os resíduos que sofreram tratamento HDT tiveram seu pH reduzidos para 4 com a adição do ácido fosfórico (H_3PO_4), por fim as soluções foram centrifugadas.

Em seguida, o carvão comercial foi macerado em pistilo e adicionado a um conjunto de peneiras de aço inox, a fim de classificar a granulometria das partículas em torno de $2 \pm 0,5$ mm, pois de acordo com os estudos realizado por Mussanatto (2004) o tamanho das partículas influencia diretamente na remoção dos compostos inibidores, visto que há uma melhoria das propriedades de adsorção, com aumento da área superficial de suas partículas, como mostra a Figura 28.

Figura 28: Etapas de preparo do carvão ativado.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Além da granulometria do carvão, as variáveis de tempo e porcentagem (massa de carvão/volume de hidrolisado) podem influenciar na etapa de destoxificação do hidrolisado em banho finito, segundo Silva (2011). Sendo assim inicialmente foi realizado um planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central, com intuito de estudar a quantidade de adsorvente e o tempo relevante nessa etapa. Foram atribuídos níveis máximos e mínimos como mostra a Tabela 3. O interesse do estudo foi avaliar a perda dos açúcares redutores totais presentes no hidrolisado após o processo de destoxificação. Para isso, inicialmente foi determinado o ART conforme descrito no item 3.4.1, da amostra hidrolisada original (HO), ou seja, que não passou pela etapa de destoxificação.

Tabela 3 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-)	Ponto Central (0)	Superior (+)
Adsorvente (%m/v)	1	3	5
Tempo (min)	30	45	60

Deve-se destacar que as escolhas dos níveis das variáveis seguiram critérios coerentes, relacionados com valores previamente conhecidos. Os níveis escolhidos de tempo e porcentagem de adsorvente foram com o intuito de abranger uma faixa de resultados já indicados na literatura (CHAUD, 2010). O planejamento foi realizado para ambos os pré-tratados, visto que cada pré-tratamento tem funcionalidade particular para garantir o acesso à celulose.

Por fim, com as melhores condições selecionadas do planejamento, foi realizada a destoxificação adaptado de Chaud (2010), em banho finito em que se manteve o hidrolisado em erlenmeyer sob agitação de 100rpm à 50°C em incubadora. Ao final da etapa de destoxificação as amostras foram filtradas e centrifugadas por 10 minutos à 2000rpm na CENTRIBIO 80-2B, como visto na Figura 29.

Figura 29: Etapas da destoxificação.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

3.5 Fermentação

O microrganismo utilizado para a fermentação etanólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de um fermento biológico FERMIX, cultivada em

meio líquido YPD contendo 20 g/L de glicose, 10g/L de levedura e 20g/L peptona. Para o preparo da suspensão as leveduras foram centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos e para lavagem das células o mesmo procedimento foi feito com água destilada estéril de forma a se obter uma densidade ótica a 540nm em torno de 0,6 o que representa concentração de células na ordem de 10^6 cél/mL.

Foi inoculado ao caldo nutrido com NH_3PO_4 (100ppm), MgSO_4 (100ppm) e CaCl_2 (10ppm), um volume de 1:10 (Vsuspensão:Vhidrolisada). A fermentação ocorreu conforme descrito por Wolf (2011), em incubadora à 30°C, 150rpm por 24 horas. Após essa etapa, o ART, viabilidade celular, rendimento e eficiência fermentativa foram determinados. A viabilidade celular foi determinada através de técnicas de contagem em câmara de Neubauer.

O rendimento da fermentação (R_f) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (g/L) e a quantidade de ART presente inicialmente (g/L), através da Equação 9. Já a eficiência da fermentação (E_f) foi determinada pela relação entre o rendimento real da fermentação (R_f) e o rendimento teórico de 0,51, conforme Equação 10 (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

$$R_f = \frac{\text{Etanol Produzido } (\frac{g}{L})}{\text{ART}_{\text{inicial}} (\frac{g}{L})} \quad (9)$$

$$E_f = \frac{\text{Rendimento real}}{\text{Rendimento teórico (0,51)}} \quad (10)$$

3.5.1 Avaliação dos Contaminantes na Fermentação Etanólica

Foi realizado um planejamento experimental 2^3 completo, com o objetivo de verificar a influência da presença de contaminantes nos rendimento do processo de produção de bioetanol. As seguintes etapas foram seguidas:

- ✓ Preparo do inóculo nos ensaios de fermentação utilizando-se o meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose), com a seguinte composição: 10 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de glicose; 20 g/L de peptona bacteriológica, tendo o pH ajustado para 5,0. Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, na forma de fermento seco.

- ✓ Ao meio de cultura foram adicionados dois dos principais contaminantes em diferentes proporções conforme mostra a Tabela 4. Os ensaios foram realizados em duplicata e as variáveis estudadas apresentando seus respectivos máximos e mínimos.

Tabela 4- Variáveis do Planejamento Experimental 2³.

Fatores	(-)	(+)
1: Fermento (g)	0,2	1,0
2: Ácido Acético (%)	1,0	5,0
3: Furfural (g/L)	1,0	4,0

- ✓ A escala de brix foi utilizada para determinar a concentração de açúcar no meio fermentativo, usando refratômetro portátil para a leitura, efetuando a devida correção de temperatura.
- ✓ O brix inicial, que é representado pelo meio antes da fermentação na ausência dos contaminantes, foi medido para determinar o rendimento reacional, sendo o brix final medido após a fermentação. O rendimento foi determinado conforme a Equação 11:

$$\% \text{ RENDIMENTO} = \frac{\text{Brix inicial} - \text{Brix final}}{\text{Brix inicial}} \times 100 \quad (11)$$

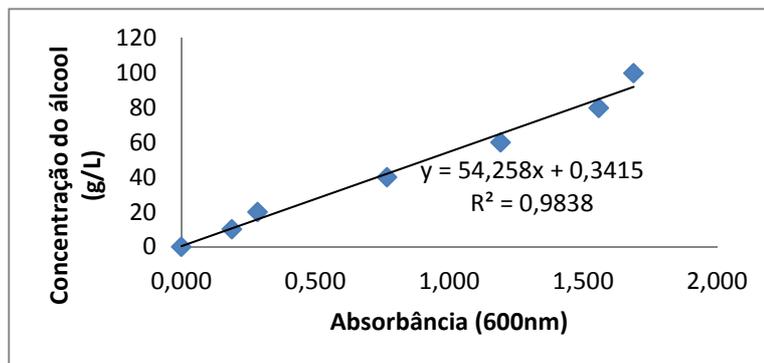
É importante destacar que a escolha dos níveis máximos e mínimos foi determinada de acordo com trabalhos revisados da literatura (TAHERZADEH *et al.*, 2000). Em seguida, as informações obtidas foram trabalhadas no programa Statistic sendo validadas pelos cálculos realizados conforme Bruns *et al.*, (2007).

3.6 Destilação

A destilação foi realizada conforme Abud (1997). Destilou-se cada amostra por 3 minutos, contados após o início da fervura, completando o volume para um balão de 50mL com água destilada. Transferiu-se 2mL deste destilado, o qual foi submetido a uma reação a 60° C por 30 minutos com 2mL de solução de dicromato de potássio e leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 600nm. O teor alcoólico foi determinado por destilação, utilizando-se o método espectrofotométrico a partir do

dicromato de potássio. A concentração de etanol foi determinada a partir de uma curva de calibração do dicromato de potássio, com amostras de etanol de concentração conhecidas, submetidas à mesma reação, como mostra a Figura 30.

Figura 30: Curva de calibração do dicromato de potássio.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

4 RESULTADOS

4.1 Pré-tratamento

Inicialmente, com algumas propriedades físico-químicas já relacionadas por Bispo (2014) do material em estudo, como mostra a Tabela 5, foi possível determinar os parâmetros necessários no preparo da amostra como descrito no item 3.1., onde o bagaço *in natura* foi preparado com o intuito de se obter um teor de umidade em torno de 10%.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas encontradas no bagaço da cana-de-açúcar *in natura*.

Amostra	Bagaço da cana
%Fibra	39,92
%Pectina	1,84
%Umidade	49,79
%Lipídeos	0,60
%Acidez	2,98

Fonte: BISPO, 2014.

Em posse do bagaço *in natura* preparado, a determinação da umidade foi feita em duplicata com valor médio obtido de 6,01%, base utilizada para a pesagem do material a ser pré-tratado De acordo com o procedimento descrito no item 3.2.1.o pré-tratamento ácido foi feito utilizando 20g (massa seca) e no item 3.2.2. e o pré-tratamento hidrotérmico foi feito utilizando 60g (massa seca). A Tabela 6, apresentada os rendimentos em percentual e massa dos pré-tratamentos.

Tabela 6 - Quantidades finais de bagaço pré-tratado e rendimentos obtidos nos ensaios de pré-tratamento.

Amostra	Rendimento (%)	Bagaço pré-tratado produzido (g)
Pré-tratado Ácido	63,13	12,62
Pré-tratado HDT	55,96	33,58

Após os ensaios de pré-tratamento, realizou-se o ensaio de caracterização para a amostra de bagaço *in natura* e para o bagaço pré-tratado. Os resultados da caracterização estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados.

	Bagaço <i>in natura</i> (%)	Pré-tratado Ácido (%)	Pré-tratado HDT (%)
Celulose	36,7±0,02	67,8±0,1	69,4±0,1
como Glicose	36,4	67,5	69,1
como HMF	0,3	0,3	0,2
Hemicelulose	22,2±0,1	12,8±0,2	5,1±0,1
como Xilose	16,9	11,6	4,8
como Arabinose	1,9	0,3	-
como Ác. Acético	1,2	-	-
como Furfural	2,1	0,7	0,3
Lignina Total	21,2±0,1	29,7±2,1	27,6±0,1
como Klason	16,9	25,9	24,5
como Solúveis	4,3	5,9	3,1
Extrativos	2,5	-	-
Cinzas	13,8	2,4	5,1
Total	96,4	112,7	107,2

A extração realizada no bagaço de cana *in natura* tem por finalidade a remoção de substâncias como terpenos, ceras e ácidos graxos com base na polaridade do etanol. Resultados encontrados por Wolf (2010) mencionam valores de 4,1% de extrativos em etanol para bagaço de cana. Carvalho (2011), relata que frações elevadas de extrativos são usualmente negativos para a maioria dos processos industriais. Na Tabela 7 observa-se para o bagaço *in natura* 2,5% de extrativos, valor que está próximo à faixa de 3,2 a 5,5% citada por Banerjee *et al.*, (2002).

Segundo Bianchi (1995), as cinzas são constituídas principalmente de sulfatos, oxalatos, carbonatos, e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, além de outros sais em quantidades menores, estão presentes em quantidades que variam de 1% a 10%. De

acordo com a Tabela 7 foram encontrados 13,8% de cinzas, essa variação segundo Rezende *et al.*, (2011) se dá pela composição de diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar que apresenta estudos nos quais chegaram a encontrar 20,9%. Segundo Carvalho (2011), grande parte do percentual de cinzas provém da sílica presente no bagaço de cana.

A fração de lignina total obtida com a caracterização química de 21,2%, apresenta-se um pouco abaixo do encontrado na literatura segundo Banerjee *et al.*, (2002) na faixa de 23-32%. Se tratando da lignina insolúvel (Klason) foram encontrados valores de 16,9% e de lignina solúvel 4,3%, valores próximos ao estudo realizado por Silva (2011) que apresenta valores de lignina de Klason e solúvel de 18,2% e 6,8% respectivamente.

A fração de celulose encontrada no bagaço *in natura* de 36,7% está de acordo com a literatura conforme Banerjee *et al.*, (2002), o qual relata um teor de 32-48% de celulose e Nascimento(2011) com um teor de 38,8%.

Em relação a fração de hemicelulose encontrada para o bagaço *in natura* de 22,2%, esse percentual encontra-se de acordo com estudos realizados por Banerjee *et al.*, (2002), que obteve valores entre 19-24% e Rabelo (2007), com o teor de 23,9% de hemicelulose.

Em estudos realizados por Silva (2010) e Chaud (2010), é possível encontrar a quantificação dos compostos tóxicos do hidrolisado. Após o pré-tratamento Silva (2011) faz menção a diminuição dos teores de HMF e furfural do pré-tatado em relação ao bagaço *in natura*, a mesma redução pode ser vista na Tabela 7, nos valores desses contaminantes. É importante ressaltar que essa concentração pode variar, de acordo com condições brandas ou severas adotadas no pré-tratamento da biomassa (SANCHES *et al.*, 2005).

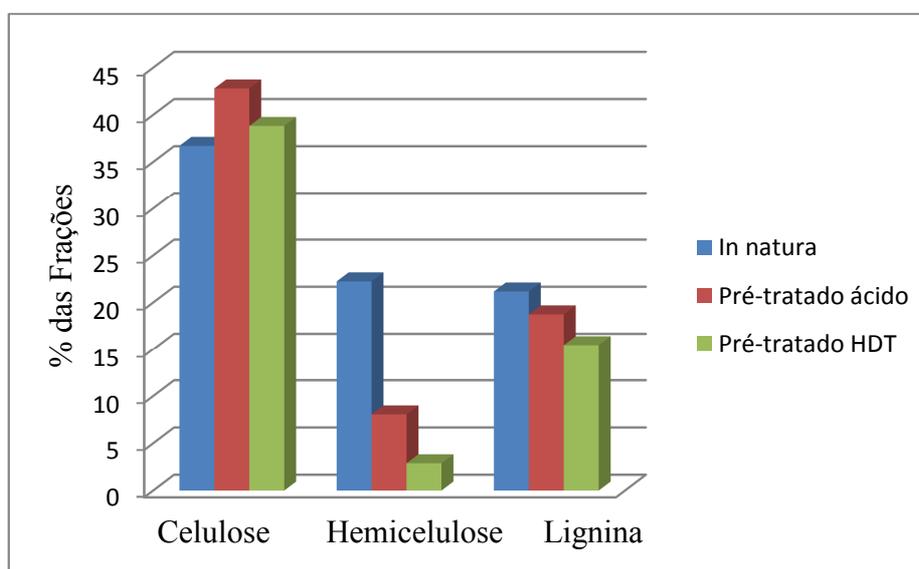
Para determinar os teores de celulose, hemicelulose e lignina total das amostras do bagaço *in natura* e pré-tratados foram utilizados os fatores de conversão que provêm da estequiometria da reação, como mostrado na Tabela 8:

Tabela 8 - Fatores de conversão para celulose e hemicelulose.

Componente		Fator de conversão
Celulose	Glicose	0,90
	HMF	1,20
Hemicelulose	Xilose	0,88
	Arabinose	0,95
	Ácido Acético	0,72
	Furfural	1,37

Fonte: Gouveia *et al.*, 2009.

Analisando a Tabela 7, com os valores multiplicados pelos respectivos rendimentos apresentados na Tabela 6, pode-se constatar que ambos os pré-tratamentos aumentaram o teor de celulose e reduziram os teores de hemicelulose e lignina, o que pode ser visualizado através da Figura 31.

Figura 31: Gráfico das frações de celulose, hemicelulose e lignina presentes no bagaço in natura e após pré-tratamento.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

No pré-tratado com ácido diluído, pode-se observar o aumento no teor de celulose de 16,6%, pois o pré-tratamento ácido solubiliza a hemicelulose para deixar

grande fração de celulose mais susceptível à ação das celulasas. De acordo com Rueda (2010) o tempo de contato do pré-tratamento tem mais influência do que a concentração de ácido. Os teores de hemicelulose e lignina foram reduzidos em 63,5% e 11,8% respectivamente. A diminuição significativa da hemicelulose deve-se ao fato de que durante as reações termoquímicas, o ácido sulfúrico atua como catalisador, clivando as ligações glicosídicas β -(1,4) e liberando os monômeros da hemicelulose (ALVIRA *et al.*, 2010).

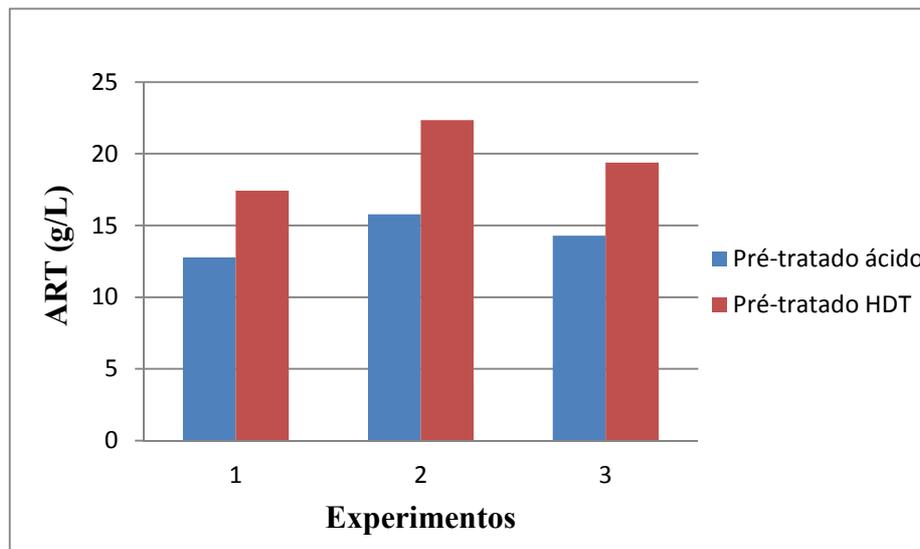
Analogamente aconteceu com o pré-tratado hidrotérmicamente, o aumento no teor de celulose foi de 5,72%, ainda assim menor quando comparado ao pré-tratado ácido. A redução nos teores de hemicelulose e de lignina foi de 86,9% e 26,9% respectivamente. A maior remoção da hemicelulose em relação ao pré-tratado ácido foi possível porque no pré-tratamento hidrotérmico a hemicelulose é extraída quase que integralmente do complexo lignocelulósico o que altera a estrutura física do material. Esse também é um pré-tratamento mais eficiente na remoção de lignina (SAITO, 2005).

4.2 Hidrólise

Levando em consideração os pré-tratamentos utilizados no desmembramento da matriz lignocelulósica, foi avaliada na fração sólida neutralizada a influência da rota convencional para geração do bioetanol, a hidrólise enzimática onde a especificidade da enzima minimiza a degradação da glicose (STANGHERLIN, 2013). Na caracterização do complexo enzimático utilizado obteve-se uma atividade enzimática de 245 FPU/mL para as celulasas totais, característico do complexo enzimático Cellic Ctec 2, assim como avaliado por Silva (2012).

Como mostra a Figura 32, a quantidade de açúcares totais encontradas nos experimentos na etapa que antecede a destoxificação, ou seja, após a hidrólise, no pré-tratado hidrotérmico foi superior ao ácido. Isso pode ser atribuído a maior remoção de hemicelulose e lignina conforme visto na Figura 31. Os resultados reportados na literatura mostram que a digestibilidade da celulose aumenta com a remoção destes constituintes (RABELO, 2010).

Figura 32: Gráfico do ART obtido pós-hidrólise enzimática dos pré-tratados ácido e hidrotérmico.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

O menor desempenho do hidrolisado do pré-tratamento ácido quando comparado ao HDT pode estar relacionado as condições mais brandas de processo, onde há uma menor degradação dos açúcares que possivelmente inibiriam o meio reacional. Outro fator relevante é a superdosagem de enzima no processo, pois no levantamento bibliográfico feito por Rabelo (2010), identifica fatores como: concentração de enzima, área superficial disponível de celulose e a atividade das β -glicosidase também interferem no desempenho enzimático. Dessa forma, a concentração de enzima na qual se desempenhou a hidrólise pode ter acarretado nessa redução, visto que 30FPU/g de celulose seria a dosagem apropriada segundo Santos, (2010).

4.3 Destoxificação

4.3.1 Matriz de Planejamento da Destoxificação

As Tabelas 9 e 10 apresentam as matrizes de planejamento da destoxificação do hidrolisado do bagaço pré-tratado com ácido e hidrotérmicamente, respectivamente. Foi utilizado um planejamento 2^2 , com os ensaios realizados em triplicata no ponto central. O teor de ART das amostras hidrolisadas originais do pré-tratado com ácido e pré-tratado hidrotérmico foi de: 41,8g/L e 13,8g/L, respectivamente.

Tabela 9 – Matriz de planejamento para o pré-tratado ácido.

Ensaio	Adsorvente (%m/v)	Tempo (min)	ART (g/L)			Média
1	-	-	34,7	33,9		34,3
2	+	-	31,1	30,7		30,9
3	-	+	30,2	29,7		29,9
4	+	+	24,4	24,7		24,5
5	0	0	32,9	32,5	31,2	32,2

Tabela 10 – Matriz de planejamento para o pré-tratado hidrotérmico.

Ensaio	Adsorvente (%m/v)	Tempo (min)	ART (g/L)			Média
1	-	-	11,6	11,2		11,4
2	+	-	10,8	10,2		10,5
3	-	+	10,0	9,8		9,9
4	+	+	10,1	10,2		10,1
5	0	0	6,5	6,4	6,7	6,6

As Tabelas 9 e 10, indicam que a melhor condição é a que apresenta os maiores teores de ART(g/L), com 34,3g/L para o hidrolisado pré-tratado ácido e 11,4g/L para o hidrolisado pré-tratado hidrotermicamente.

Em posse dos resultados foi possível determinar os efeitos principais e de interação para os planejamentos realizados. A Tabela 11 e 12 mostra os resultados para os efeitos e os seus respectivos erros padrões.

Para ambos os destoxificados dos pré-tratados ácido e HDT, a variável significativa foi o tempo, isso pode estar associado ao uma maior eficiência na aderência dos compostos tóxicos a superfície do carvão, visto que a medida que o tempo passa, essa eficiência não sofre alteração, isso para as condições de estudo.

Tabela 11 - Efeitos e combinação linear das interações para o pré-tratado ácido.

Media Global	30,54±0,09	Significativo
Efeitos Principais		
1 (Adsorvente)	-4,40±0,80	Significativo
2 (Tempo)	-5,35±0,80	Significativo
Efeitos de Interação		
12	-1,00±0,80	Não Significativo

Tabela 12– Efeitos e combinação linear das interações para o pré-tratado HDT.

Media Global	9,42±0,15	Significativo
Efeitos Principais		
1 (Adsorvente)	-0,325±0,30	Não Significativo
2 (Tempo)	-0,92±0,30	Significativo
Efeitos de Interação		
12	0,57±0,30	Não Significativo

Já se tratando da quantificação do adsorvente, essa se mostrou significativa apenas para o pré-tratado ácido, visto que a uma maior quantidade de compostos tóxicos gerados, a adsorção aumentou a medida que a quantidade de carvão comercial diminuiu, se mostrando eficiente para as condições de processo estudada. Enquanto que para o destoxificado pré-tratado HDT a %Adsorvente se mostrou não influenciar significativamente, assim como os efeitos interativos.

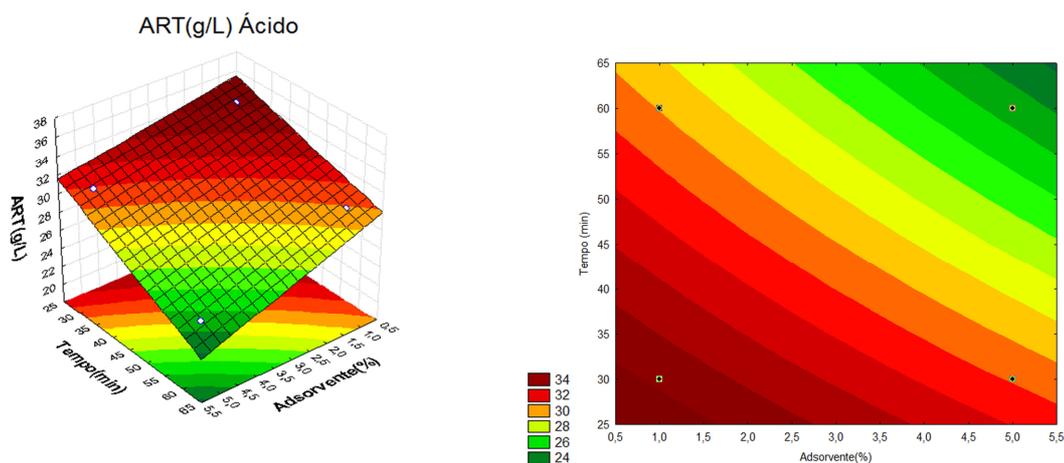
No tratamento dos resultados, foram utilizadas equações de cálculo dos parâmetros estatísticos com base em Bruns *et al.*,(2007). Nesse trabalho, o ajuste mais adequado aos dados do pré-tratamento ácido se deu por um modelo quadrático,

conforme Equação 12. Enquanto que para o pré-tratamento HDT, nenhum modelo (linear ou quadrático) se aplicou tendo em vista que só a variável tempo se mostrou significativa, dentro da faixa experimental investigada.

$$y(x_1x_2) = 30,54 - 2,20x_1 - 2,68x_2 - 1,14x_1^2 - 1,14x_2^2 \quad (12)$$

Na superfície de resposta, conforme Figura 33, para o pré-tratamento ácido, observou-se que os teores mais altos de ART(g/L) obtidos, foi utilizando 1% de carvão ativo por 30 minutos. Os resultados encontrados como mais eficiente em termos de ART, similarmente foram detectadas nos estudos de Marton (2002) e Chaud (2010) na destoxificação do bagaço de cana.

Figura 33: Superfície de resposta do destoxificado do pré-tratado ácido.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

Como mostrado na Tabela 12, à única variável que influenciou no pré-tratamento HDT foi o tempo. Dessa forma, no ajuste do modelo foi necessária à análise de variância (ANOVA) para o pré-tratamento ácido, como mostra a Tabela 13, para os coeficientes de regressão e correlação, bem como os erros padrão dos planejamentos experimentais, considerando-se 5% de significância.

Tabela 13- Análise de Variância (ANOVA), para o pré-tratamento ácido.

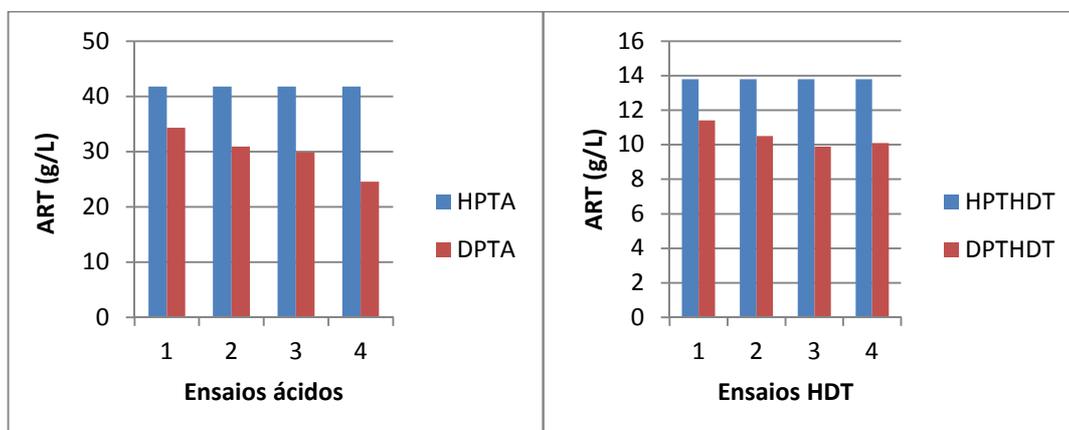
Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g. l.	Média Quadrática
Regressão	170,25	4	26,81
Resíduos	4,15	2	2,07
Falta de Ajuste	2,00	0	-
Erro puro	2,15	2	1,07
Total	178,55	6	
% de variação explicada: 96,27%			
% máxima de variação explicável: 98,07%			

É primordial que a escolha da metodologia a ser empregada na destoxificação, se baseie num conjunto de requisitos como eficácia e custo da técnica, e que ao mesmo tempo não leve à perda de açúcares durante o processo nem tão pouco ao impacto ambiental (ARRUDA, 2011). Os procedimentos de adsorção por carvão ativo para os hidrolisados apesar de proporcionar a remoção dos compostos tóxicos também apresentam o inconveniente da perda de açúcares (MARTON, 2002).

Tendo como proposta estudar as condições de destoxificação que acometa na maior quantidade de ART (g/L) e que quando comparado ao da amostra hidrolisada original resulte numa menor perda de açúcares totais, foi selecionada a melhor condição do planejamento, como mostra o Figura 34.

As amostras consideradas para o cálculo de perdas foram as que apresentaram os maiores teores de ART depois de destoxificada, conforme apresentada na superfície de resposta na Figura 33.

Figura 34: Gráfico de comparação das amostras antes e depois da destoxificação dos pré-tratados ácido e hidrotérmico.



Onde: HPTA=hidrolisado pré-tratado ácido; DPTA = destoxificado pré-tratado ácido; HPTHDT= hidrolisado pré-tratado HDT; DPTHDT = destoxificado pré-tratado HDT.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

Ambos os destoxificados dos pré-tratados apresentaram perda semelhantes em torno de 17,9% e 17,4% para o pré-tratado ácido e hidrotérmico, respectivamente, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14 - Perdas de açúcares, após a destoxificação.

	HART (g/L) _o	DART (g/L) _f	PERDA (%)
Pré-tratado ácido	41,8	34,3	17,9
Pré-tratado HDT	13,8	11,4	17,4

Onde: HART(g/L)_o = quantidade de açúcares totais no hidrolisado original; DART(g/L)_f = quantidade de açúcares totais no destoxificado.

4.3.2 Avaliação das Condições de Destoxificação

Em posse da melhor condição de 1% de carvão ativo durante 30 minutos, as amostras foram realizadas em triplicata para assegurar a confiabilidade dos dados. Foi medido o pH inicial para posterior ajuste conforme descrito no item 3.5., com a intenção de aumentar a efetividade da destoxificação, para que haja remoção dos compostos fenólicos e remoção dos íons metálicos (CHAUD, 2010).

As Tabelas 15 e 16 mostram as medições de pH, Brix(%) e ART(g/L) feitas nas amostras antes e depois da destoxificação, para ambos os pré-tratados.

Tabela 15 - Valores médios de pH, BRIX e ART(g/L), antes e depois da destoxificação do pré-tratado ácido.

	pH	BRIX (%)	ART (g/L)
Antes DETOX	4,84	6,33	13,70
Depois DETOX	4,26	6,30	13,27

Comparando-se as frações líquidas antes e depois da etapa de destoxificação observou-se que o Brix foi à característica menos afetada com redução de apenas 0,47%. Enquanto que o pH após passar pelo ajuste necessário ao procedimento acarretou uma diminuição de 11,98% do valor original. Nos açúcares totais houve uma redução de 3,14%.

Tabela 16 - Valores médios de pH, BRIX e ART, antes de depois da destoxificação do pré-tratado HDT.

	pH	BRIX	ART (g/L)
Antes DETOX	5,16	6,76	18,66
Depois DETOX	4,11	6,60	16,53

As amostras do pré-tratado HDT, apresentaram resultados mais expressivos com redução de Brix, pH e açúcares totais de 2,37%, 20,34% e 11,41% respectivamente.

A primeira etapa de ajuste de pH realizada no processo de destoxificação estar ocasionando à perda de açúcares, visto que a elevação de pH com CaO favorece há precipitações que posteriormente são removidas por centrifugação, e nessa fase devem ser arrastados frações de açúcares redutores que estariam presentes na amostra. Assim como na segunda etapa de adsorção no carvão ativo, partes destes açúcares redutores podem estar sendo adsorvidos na superfície do carvão (MOUTTA, 2009).

Podemos observar na Tabela 15, que no pré-tratado ácido ocorreu uma pequena redução nos teores de ART que é justificada com a pequena variação do Brix. Enquanto que na Tabela 16, no pré-tratado HDT mostra uma relação ART e BRIX compatível na

diminuição dos açúcares depois da destoxificação. O pH diminuiu em ambos pré-tratados, tendo menor variação no pré-tratado ácido, isso ocorre devido ao pH do pré-tratamento ácido já está próximo a faixa de ajuste da destoxificação.

4.4 Fermentação

4.4.1 Estudo da Fermentação em Meio YPD com Adição dos Contaminantes

A matriz de planejamento foi montada conforme a Tabela 17, com base no planejamento experimental 2^3 completo. A resposta obtida é em rendimento reacional determinado pelo Brix. O Brix antes da fermentação foi de 8,0.

Tabela 17 - Matriz de planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	Fermento (g)	Ácido Acético (%)	Furfural (g/L)	Rendimento (%)		Média
1	-	-	-	30	30	30
2	+	-	-	40	45	42,5
3	-	+	-	17,5	15	16,3
4	+	+	-	12,5	12,5	12,5
5	-	-	+	22,5	22,5	22,5
6	+	-	+	30	30	30
7	-	+	+	12,5	10	11,3
8	+	+	+	5	0	2,5

Com os resultados apresentados pode-se observar que o maior rendimento reacional foi no ensaio 2, onde se encontram os maiores níveis de fermento e os menores níveis de inibidores.

Em posse dos resultados foi possível determinar os efeitos principais e de interação para o planejamento realizado. A Tabela 18 mostra os resultados para os efeitos e os seus respectivos erros padrões.

Tabela 18 - Efeitos e combinação linear das interações.

Media Global	20,94±0,49	Significativo
Efeitos Principais		
1 (Fermento)	1,88±0,99	Não Significativo
2 (Ácido Acético)	-20,62±0,99	Significativo
3 (Furfural)	-8,75±0,99	Significativo
Efeitos de Interação		
12	-8,12±0,99	Significativo
13	-2,5±0,99	Significativo
23	1,25±0,99	Não Significativo
Efeitos de Interação		
123	0,0±,099	Não Significativo

No tratamento dos resultados, foram utilizadas equações de cálculo dos parâmetros estatísticos com base em Bruns *et al.*,(2007). O modelo estatístico usado para descrever as respostas do planejamento foi formulado em termos dos efeitos por unidade de variação dos fatores.

$$y(x_1, x_2, x_3) = 20,94 - 10,31x_2 - 4,38x_3 - 4,06x_1x_2 - 1,25x_1x_3 \quad (13)$$

Foi possível observar que o aumento da concentração de ácido acético causou uma diminuição no rendimento reacional, o mesmo acontece com o furfural. Isso acontece porque segundo Freitas (2011), a adição de concentrações crescentes de ácido acético afeta o crescimento da levedura, provocando um aumento da duração da fase de

latência e da fase exponencial, com redução do valor da taxa específica de crescimento. No caso do furfural, Taherzadh *et al.*, (2007) relata que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético é inibido em 89% quando em presença de 4 g/L de furfural, comprovando assim o efeito da diminuição do rendimento a medida que avaliamos os níveis máximos.

Já nos efeitos de interação entre o furfural e o ácido acético não mostram significância, na faixa estudada. Para a verificação da modelagem, é necessário adequá-lo a um modelo linear, quadrático ou até mesmo cúbico. Iniciando, pelo teste do modelo linear, onde se faz necessário a análise de variância (ANOVA), como mostra a Tabela 19.

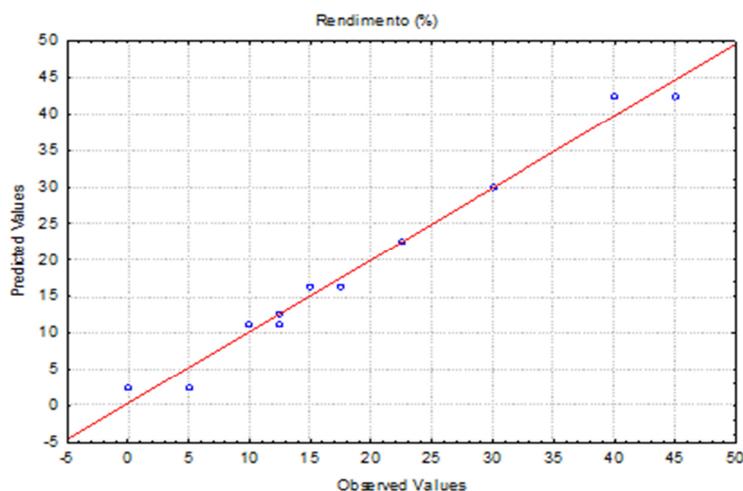
Segundo Box *et al.*, (1973), o teste F foi realizado onde se leva em conta os graus de liberdade apropriados, o mesmo é utilizado para realizar previsões no sentido da significância da Equação 13. A razão entre a média quadrática da regressão e a do resíduo deve ser maior que o ponto de distribuição F para que se tenha um maior grau de confiabilidade, se possível, dez vezes maior.

Tabela 19 - Análise de Variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g. l.	Média Quadrática
Regressão	2.296,88	4	574,22
Resíduos	51,56	11	4,69
Falta de Ajuste	20,31	3	6,77
Erro puro	31,25	8	3,91
Total	2.400,00	15	
% de variação explicada: 96%			
% máxima de variação explicável: 99%			

Assim, $MQR/MQr = 122,43 > (10 \times F_{4,11})$; $F_{4,11} = 3,36$ (para 95% de confiança), mostra que temos um ajuste altamente significativo. A Figura 35, nos mostra o ajuste realizado ao modelo linear, assim como os valores mostrados na ANOVA.

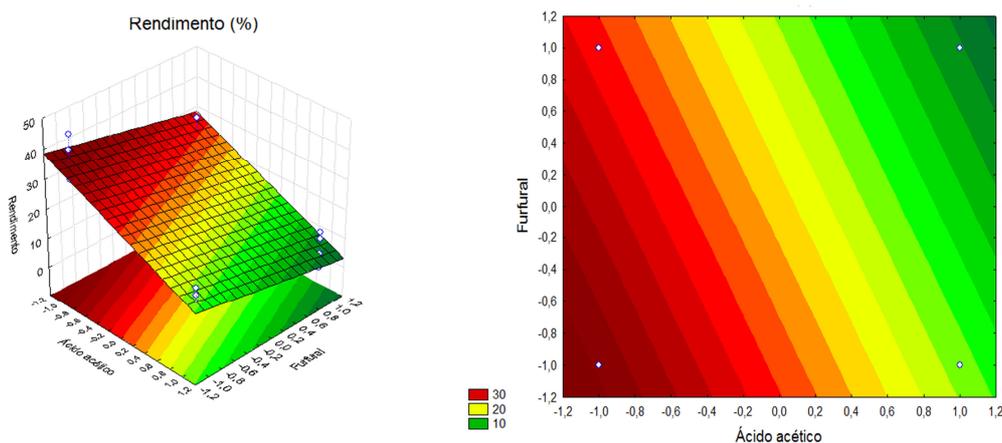
Figura 35: Ajuste ao Modelo Linear.



Fonte: Acervo do Autor, 2013.

A superfície de resposta foi gerada para o modelo linear, apresentada na Figura 36, que se adequou ao sistema, sendo desnecessária a busca por outro modelo. Através da superfície de resposta confirmamos o que foi apresentado, à medida que os fatores significativos ácido acético e furfural variam de um nível maior para um nível menor observamos um aumento significativo no rendimento reacional.

De acordo com Talcott *et al.*, (1999), à presença destes compostos tóxicos, quando o hidrolisado hemicelulósico é utilizado diretamente em processos de bioconversão, sem serem submetidos a um tratamento prévio de destoxificação, ocorre diminuição na eficiência do processo fermentativo que atinge baixo rendimento e produtividade. Logo, o resultado obtido é totalmente aceitável uma vez que diminuiu o rendimento reacional à medida que se atingia as maiores concentrações desses inibidores

Figura 36: Superfície de Resposta.

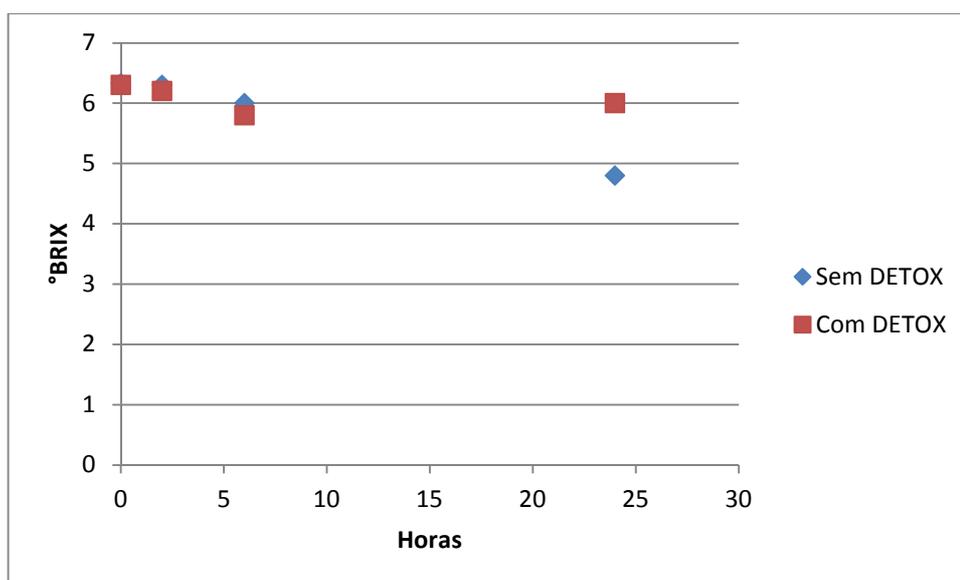
Fonte: Acervo do Autor, 2013.

4.4.2 Fermentação dos Hidrolisados

Os experimentos de ambos pré-tratados com e sem destoxificação seguiram para a fermentação. Os fatores avaliados para acompanhamento da fermentação foram: Brix, viabilidade celular, teor alcoólico, rendimento e eficiência de fermentação.

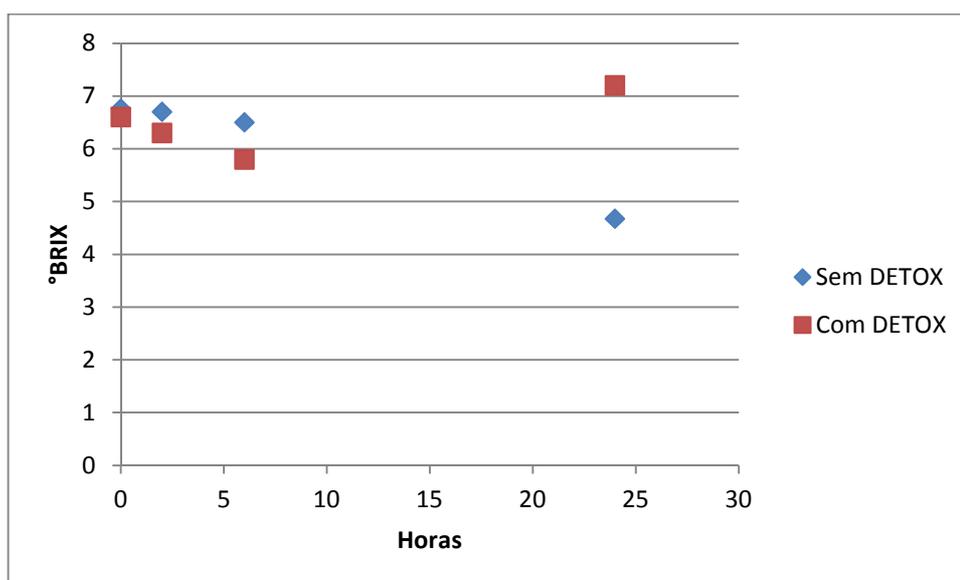
Durante a fermentação foi avaliado o consumo de °Brix nos pontos de 0, 2, 6 e 24 horas, das amostras com e sem destoxificação, para a construção da cinética do consumo de sólidos solúveis, como mostra o Gráfico 4 para o pré-tratamento ácido e o Gráfico 5 para o pré-tratamento HDT.

Na Figura 37, para a cinética de consumo de sólidos solúveis do pré-tratado ácido pode-se observar que durante as 24 horas de fermentação o °BRIX foi reduzido indicando consumo de açúcares pela levedura, tendo em vista que os valores de °BRIX inicial das amostras destoxificadas está com leve diminuição em relação as amostras não destoxificadas, devido a perda de açúcares na destoxificação. O último ponto da amostra destoxificada apresentou uma elevação no °BRIX. Isso se deve ao fato de que, possivelmente, o álcool que está sendo produzido interfira na leitura do refratômetro (SANTOS, 2014).

Figura 37: Consumo de BRIX ao longo da fermentação – Pré-tratado ácido.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

A Figura 38 mostra um consumo de açúcares em ambos os ensaios, porém no último ponto do destoxificado mostra uma elevação súbita de °BRIX, o que possivelmente seja álcool capturado na leitura. Para maior confiabilidade dos dados seria necessário adotar um ponto anterior ao da última leitura de °BRIX.

Figura 38: Consumo de BRIX ao longo da fermentação – Pré-tratado HDT.

Fonte: Acervo do autor, 2014.

4.4.3 Viabilidade Celular da Levedura *S. cerevisiae*

A viabilidade celular foi realizada conforme Antonini (2004) em Câmara de Neubauer espelhada, onde foram contados os quatro retículos centrais de cada um dos 25 campos, nos 2 quadrados maiores da lâmina, isto para cada amostra com e sem destoxificação de ambos pré-tratados. Após a fermentação, foi suspensa uma pequena porção da amostra de levedura em 1mL de solução de azul de metileno e transferido para a câmara de Neubauer, onde as células mortas são coradas de azul e as células vivas não. A viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* foi calculada de acordo com a Equação 14 e obtido o Gráfico 6.

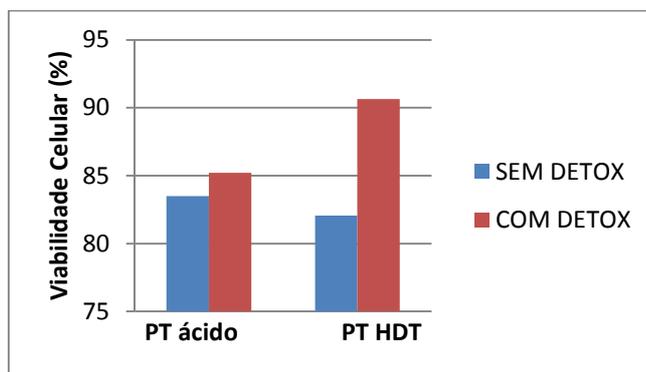
$$(\%) \textit{Viabilidade celular} = \left(\frac{\textit{Número de células viáveis}}{\textit{Número total de células}} \right) * 100 \quad (14)$$

Onde: Número total de células = Número células viáveis + Número células não viáveis

Como pode ser visto na Figura 39, a média dos resultados de viabilidade celular das amostras com e sem destoxificar de ambos pré-tratados, apresentou-se no pré-tratado ácido com aumento de 1,58% em comparação as amostras de fermentação do mesmo pré-tratado sem destoxificar. Enquanto que para o pré-tratado HDT observou-se um aumento de 9,49%, o que caracteriza uma eficiência significativa na remoção dos compostos tóxicos formados durante o pré-tratamento HDT da biomassa (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Pode-se notar que o pré-tratamento com ácido sulfúrico gera uma maior quantidades de contaminantes e uma menor extração da lignina, uma deslignificação poderia ser realizada com intuito de evitar redistribuir a estrutura química da lignina remanescente no bagaço, para assim aumentar a eficiência da destoxificação (RUEDA, 2010).

Figura 39: Viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* antes e depois da destoxificação.



Fonte: Acervo do autor, 2014.

4.4.4 Interpretação dos Resultados de Fermentação e Destilação

A Tabela 20 apresenta os resultados após as etapas de hidrólise enzimática, destoxificação e fermentação. As análises foram em relação aos açúcares totais presente nas amostras.

Tabela 20 - Resultados obtidos após as etapas de hidrólise enzimática, destoxificação e fermentação.

Condições	Concentração de ART _i (g/L)	Conversão Enzimática (%)	Etanol Produzido (g/L)	Rendimento da Fermentação (%)	Eficiência da Fermentação (%)
HAO	13,70	30,56	4,92	35,91	70,41
HAD	13,27	34,07	5,11	38,51	75,50
HHDTO	18,66	41,08	7,17	38,42	75,33
HHDTD	16,53	50,35	7,41	44,85	87,94

Onde: HAO=hidrolisado ácido original (sem destoxificação); HAD=hidrolisado ácido destoxificado; HHDTO=hidrolisado hidrotérmico original (sem destoxificação); HHDTD=hidrolisado hidrotérmico destoxificado.

Os resultados exibidos no pré-tratado ácido, mostram resultados muito próximos de eficiência fermentativa, mesmo se tratando de condições operacionais diferentes. A

essa pequena diferença pode-se conferir a quantidade de inibidores formados durante o pré-tratamento assim como mostra a Tabela 7, onde as concentrações de furfural e HMF são maiores quando comparada aos valores de concentração obtidos no pré-tratamento utilizado, sendo essa etapa influente sobre o desenvolvimento da fermentação (GALBE, 2006), sendo assim a etapa de destoxificação se mostrou pouco eficiente na remoção dos mesmos. Ainda se deve levar em consideração a alteração nos teores de compostos tóxicos devido à etapa de hidrólise, pois a celulose é quebrada pela ação das enzimas que mesmo em condições muito brandas podem liberar alguns subprodutos indesejáveis (RABELO, 2010).

Baixos rendimentos de hidrólise foram relatados Rueda (2010) na destoxificação do bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico, atribuindo esses resultados à condensação da lignina no bagaço pré-tratado em presença de ácidos. Em seus estudos, Sakakibara (1966) mostrou que as ligações α são muito mais suscetíveis à separação, sendo assim a lignina solúvel pode repolimerizar-se para formar produtos de condensação. Estes produtos são considerados indesejáveis. Visto que só foram reduzidos 11,8% de lignina no pré-tratamento ácido, a baixa conversão enzimática pode estar associada a condensação da lignina, assim como a super-dosagem da concentração enzimática. Segundo Rueda (2010), a melhor variação de carga enzimática está em torno de 30FPU/g de celulase, destacando que o aumento carga enzimática não é proporcional ao aumento da conversão de celulose (SANTOS, 2010).

Nota-se que os resultados apresentados pelo pré-tratamento HDT foram mais relevantes, utilizando água a altas temperaturas, expande rapidamente as estruturas celulósicas para tornar mais efetiva à ação enzimática na conversão de celulose em glicose. Como podemos observar, mesmo com uma pequena variação entre os ensaios com e sem destoxificação, este pré-tratamento apresentou melhor desempenho da metodologia de destoxificação em relação ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, visto que os destoxificados ainda apresentaram resultados superiores.

O pré-tratado HDT foi o que apresentou os melhores resultados a técnica de destoxificação empregada nesse trabalho, visto que ofereceu valores mais significativos de rendimento fermentativo. Apresentando menores frações de compostos inibidores conforme a Tabela 7, e um teor alcoólico de 7,41(g/L), valor maior que o encontrado no pré-tratado ácido.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Através de uma caracterização química foi possível avaliar a quantidade de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, oriundo de dois diferentes pré-tratamentos, sendo o pré-tratamento ácido mais severo no desmembramento da matriz lignocelulósica.
- ✓ Avaliou-se a rota de hidrólise enzimática na fração sólida neutralizada de ambos os pré-tratado, com menor desempenho do hidrolisado pré-tratado ácido quando comparado ao HDT isso pode estar relacionado há maior quantidade de compostos tóxicos liberados no pré-tratado ácido.
- ✓ Na destoxificação foi constatado que as condições operacionais acima de 1% de carvão ativo e 30 minutos, ocasionam uma maior perda de açúcares totais. Foi selecionada a condição que apresentou menor perda de açúcares redutores nos ensaios realizados.
- ✓ Na fermentação em meio YPD, foi possível avaliar a diminuição do rendimento reacional com a presença dos contaminantes furfural e ácido acético.
- ✓ Na fermentação dos hidrolisados o consumo de sólidos solúveis foi observado, assim como se observou uma maior viabilidade da levedura *S. cerevisiae* nos ensaios que passaram por destoxificação, Houve um aumento na viabilidade celular de 9,49% para hidrolisados pré-tratados hidrotérmicamente.
- ✓ Nota-se a partir do rendimento fermentativo do pré-tratado ácido com e sem destoxificação, que os parâmetros adotados na destoxificação não foram capazes de remover os compostos tóxicos a ponto de mostrar resultados significantes. A pequena redução do pré-tratamento de 11,8% de lignina pode ter acarretado em uma condensação da mesma e reorganização na estrutura.

- ✓ Já o pré-tratado HDT com destoxificação apresentou maiores rendimentos quando comparado ao pré-tratado HDT sem destoxificação.
- ✓ É importante ressaltar que ambos os pré-tratados apresentaram rendimentos superiores nos ensaios com destoxificação. Assim como o etanol produzido pelas amostras destoxificadas do pré-tratado ácido 5,11g/L e do pré-tratado HDT 7,41 g/L.
- ✓ Ao fim do trabalho foi possível avaliar a influência dos compostos tóxicos, apresentando interferência desde a conversão enzimática até a fermentação. Alguns fatores podem ser relacionados para melhoria da eficiência da etapa de destoxificação, como a combinação de uma etapa de deslignificação/destoxificação, visando assim à remoção da lignina presente do hidrolisado hemicelulósico objetivando uma maior superfície de contato do adsorvente com os compostos indesejáveis no processo de geração de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ABUD, A.K.S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica de amiláceos**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo.
- ADAPA, P.; TABIL, L. G.;SCHOENAU, G. Grinding performance and physical properties of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, 2010.
- ALLEN *et al.* Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**. 2010.
- ALVIRA *et al.* Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ANDREI, M. **Isolamento e visualização por afm de microfibras nanoestruturas do bagaço processado de *Saccharum officinarum* L.** Campinas. 2010.
- ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade de São Carlos – Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural- Centro de Ciências Agrárias. Araras, 2004.
- ARANTES *et al.* **Estudo preliminar de extrativos do bagaço de cana-de-açúcar**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Departamento de Físico-Química, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP. 2009.
- ARRUDA, P. de. V. **Avaliação do Processo Tecnológico de obtenção de Xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana- de açúcar**. 163f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Federal de São Paulo. 2011.

BADHAN *et al.* Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504- 510, 2007.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 104, p. 1238, 2002.

BELLIDO *et al.* **Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipites***. Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Valladolid, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid, Spain Elsevier 2011.

BIANCHI, MARIA LUCIA. **Polpação da palha de milho, utilizando-se diferentes processos organosolv**. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Mestrado).

BISPO, V. G. Pré-tratamento de bagaço e de palha de cana de açúcar visando a deslignificação da celulose para produção de etanol. Relatório de iniciação científica, 2014.

BNDS e CGEE, **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: BNDS, Novembro. 2008, 315p.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology** v. 54: p. 519-546. 2003.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report 9**, 1973.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar, álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil**. Brasília: Horizonte Editora, 1985.

BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.. **Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora Unicamp, 3º edição, 2007.

BUCHERT *et al.* Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. **Process Biochem Int** p. 176–180. 1990.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**.v. 67: p. 849-864. 2008.

CARVALHEIRO *et al.* Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. **Process Biochemistry**. v. 40: p. 1215-1223. 2005.

CARVALHO, D. M. de. **Caracterização físico-química e polpação etanol soda por bagaço e palha de cana-de-açúcar**. Viçosa, MG, 2011. 150f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa. 2011.

CARVALHO *et al.* Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n.18, p.48-55, 2005.

CHAUD, L. C. S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. Lorena, 2010, 97f. Dissertação (Mestre em ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

Disponível em <<http://conab.gov.br/>> Acesso em: 18 de março de 2015.

Disponível em <<http://sindicucar-al.com.br/>> Acesso em: 23 de agosto de 2014.

DRABER, K. M. M. **Etanol de segunda geração já é realidade**. Monografia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 54f. 2013.

FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras – *Issatichenkia occidentalis* e *Issaticehnkia orientalis***. Lorena – 2009. 110f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração – Microbiologia Aplicada) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2009.

FREITAS, C. S. S. **Utilização da citometris de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisiológica da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em presença de ácido acético na produção de bioetanol**. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia de Sistemas Bioenergéticos, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 76f. 2011.

GALBE, M.; ZACCHI, G.; **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol** v. 41: p. 108, 2207.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74: p.78-88, 2006.

GARROTE, G. et al. Antioxidant activity of by products from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, v.15: p.191-200, 2004.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59: p. 257- 268, 1987.

GOLDEMBERG, J. Empresa de Pesquisa Energética: **A matriz energética brasileira**. 3 p. São Paulo, 2010;

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de

metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32: N°.6, p. 1500-1503, 2009.

HAMELINCK, C. N. et al. Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28: p. 384-410, 2005.

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

KLASS, D. L. “Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals.” Academic Press, San Diego, CA. 1998.

KLINKE, HB., AHRING, B. K., SCHMIDT, A. S., THOMSEN, A. B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresour Technol** 82:15–26. 2002.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil**. Estudos Avançados, 24 (68): 223–253. 2010.

LEME, R.M. **Estimativa das emissões de poluentes atmosféricos e uso de água na produção de eletricidade com biomassa de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Energia – Faculdade de Engenharia Mecânica – Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MACEDO, I. C. **Energia da cana-de-açúcar no Brasil**. In: Sustentabilidade na geração de energia no Brasil: os próximos 20 anos, Unicamp, Campinas. 2002.

MANZONO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S; GOMES, J. D. F. et al., Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratados com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.29, n.4, p. 1106-1204, jul./ago. ISSN 1516-3598. 2000.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L.O. Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnol. Bioeng.** 69, 526–536. 2000.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Química de Fitobiomassas, Curitiba, 2005.

MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MARTON, J. M. **Avaliação de um sistema contínuo composto por colunas de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2005. 131 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel ME, Baker JO, Overend RP (eds) **Enzymic conversion of biomass for fuels production**. Washington: American Chemical Society, p. 292–324, 1994.

MENDES *et al.* Tolerância a inibidores e alto teor de sólidos por leveduras na produção de etanol de 2ª geração. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agroenergia Department of Food Sciences – University of Nottingham (UK). **Cobeq 2012**.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959;

MOCHIDZUKI, K.; SAKODA, A; SUZUKI, M. Liquid-phase thermogravimetric measurement of reaction kinetics of the conversion of biomass wastes in pressurized hot water: a kinetic study. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 421-428, 2003.

MODIG T, LIDEN G, TAHERZADEH MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal** N°.363, p. 769–776, 2002.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis, **Sociedade de Investigações Florestais**, R. Árvore, Viçosa-MG, v. 29: N°.3, p. 461-470, 2005.

MOUTTA, R. de O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol**. Dissertação de Mestrado. LORENA-SP. 101f. 2009.

MUSSANATTO, S. I.; TEXEIRA, J. A. 2010. **Lignocellulose as raw material in fermentation processes**. *Formatex*. IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar-Portugal. 2010.

MUSSATTO, S. I., ROBERTO, I. C. **Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24: p. 094-100, 2004.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NAOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação de Mestrado, UFSCar, São Carlos – SP. 138f. 2011.

NETAFIM. Cana-de-açúcar. Disponível em <<http://ethanolfcrop.com/>> **Acesso: 23 de fevereiro de 2014.**

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **J. Biotechnol.** 87, 17–27. 2001.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: UNESP/Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2005. Disponível em:

<<http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/aguardente/Aguardente.pdf>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2015.

NOJIRI, N. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP2009159904-A **2009**. (CA 151:175883).

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microbial technology**, v. 18, p. 312 - 331, 1996.

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

PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technol.** 66, 25–40. 1998.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**, v.2, 1ed, 2008.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 414p. Tese (Doutorado). 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 150p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de processos químicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, 2007.

RAMOS, L. P.; **Quim. Nova** **2003**, 26, 863.

REZENDE *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility.

Biotechnology for Biofuels, v.4, p.54, 2011

ROSA, S.E. S.; GARCIA, J.L. F.; **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**. Revista do BNDES, 32, dezembro, 2009.

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas – SP. 110f. 2010.

SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu, 111f, 2005.

SAKAKIBARA, A., TAKEYAMA, H., MOROHOSHI, N. **Holzforchung**, v.20, p.45, 1966.

SALANTI *et al.* Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58:10049-10055. 2010.

SANCHES, O. L., CARDONA, C. A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtencion a partir de diferentes materias primas. **Interciencia**. V.30, p.671-678, 2005.

SANCHEZ, O. J.; C. A. CARDONA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Vol. 99, No. 13, pp. 5270-5295, ISSN 0960-8524. 2008.

SANTOS, J. B. **Processo de solubilização, hidrólise e degradação de celulose e derivados em presença de catalisadores metálicos a base de Sn(IV)**. Dissertação de Mestrado. UFAL, Maceió – AL, 74f. 2010;

SANTOS, V. T. de. O. **Composição enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. Lorena. 2010. 101f.

Dissertação (Mestre em ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

SANTOS, S.S. **O cultivo de cana-de-açúcar nos estado de Alagoas: Uma análise comparativa dos efeitos da mecanização no estado de São Paulo**. 104f. Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília - Brasília, 2011.

SANTOS *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 15, N°.00, p. 1-7, 2012;

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré-tratamento de palha e sabugo de milho – visando a produção de etanol de 2G**. 77p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

SCHLITTLER, L.A.F.S. **Engenharia De Bioprocesso para Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 174 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

SHAW, M. D. **Feedstock and process variables influencing biomass densification**. MSc Dissertation, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada, 2008.

SHEVCHENKO *et al.* Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips. **Appl Biochem Biotechnol**72:207–211. 2000.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. Dissertação de mestrado, UFSCar, São Carlos – São Paulo, 2011.

SILVA, L. da. **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Do Paraná - Curitiba. 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação de mestrado – Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, O. de O. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (Ananas comosus L., Merrill) para produção de biotecnologia de xilitos**. Viçosa, MG, 2011. 121f. Tese (doutorado) Universidade Federal de Viçosa. 2011.

SOKHANSANJ *et al.* Binderless pelletization of biomass; **ASAE annual International Meeting**, Tampa Convention Centre, Tampa, Florida; July 17-20, Paper Number 056061, 2950 Niles Road, St. Joseph, MI 49085-9659 USA. 2005.

SOUZA, Z. J. **Geração de energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: entraves estruturais e custos de transação**. 278p. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

STANGHERLIN, S. C. **vantagens e desvantagens das hidrólises enzimáticas e químicas na produção de bioetanol a partir do bagaço da cana de açúcar**. Trabalho de Iniciação Científica. Universidade Salvador – UNIFACS. 2013.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technol.* 83:1–11. 2002.

SUN, Y. & CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606. 2005.

TAHERZADEH, M., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.** 9, 1621-1651. 2008.

TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology Bioengineering**, v. 69, p. 330–338, 2000.

TAHERZADEH *et al.* Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53,p.701-708, 2000.

TALCOTT, S.T.; HOWARD, L.R. Phenolic Autoxidation Responsible for Color Degradation in Processed Carrot Puree. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, p.2109-2115, 1999.

TIMAR-BALAZSY, A.; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

TONG, X. L., MA, Y., LI, Y. D., 2010. Biomass into chemicals: conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes. **Appl. Catal. A-Gen.** 385, 1–13.

VAN ZYL., C., PRIOR, B. A., du PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme Microb. Technol.** 13, 82–86. 1991.

WATSON *et al.* Factors an acid treated bagasse inhibiting ethanol production from Dxylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme Microb. Technol.** 6, 451–456. 1984.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-deaçúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** 148 p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

WYMAN *et al.* Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Biores. Technol.**96, 1959-1966. 2005.

XAVIER *et al.* Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. **Bioresource Technology**, v. 101, N°.8, p. 960-8524, 1873.

ZANDERSONS *et al.* Carbon materials obtained from selfbinding sugar cane bagasse and deciduous wood residues plastics. **Biomass Bioenergy**; v. 26: p. 345-360. 2004.

ZHENG, Y.Z., LIN, H.M., TSAO, G.T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnol.** v. 14, p. 890– 896. 1998.

ZHOU *et al.* Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **BioresourTechnol**, v. 100, p. 819-825, 2009.