Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a
sua utilização como substrato na produção biológica de
hidrogênio”.**

Patrícia Lorencini

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a
sua utilização como substrato na produção biológica de
hidrogênio”.**

Patrícia Lorencini

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof. Dra. Valeria Reginatto Spiller

RIBEIRÃO PRETO -SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lorencini, Patrícia

Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio - Ribeirão Preto, 2013.

74 p. : 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Departamento de Química.

Orientadora: Reginatto, Valéria.

1. Bagaço cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento ácido. 3. Hidrólise enzimática. 4. Biohidrogênio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorencini, Patrícia

Título: Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof. Dra. Valeria Reginatto Spiller

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cristina e Luís,
e aos meus irmãos, Marcelo Henrique e Luís
Fernando, por todo amor, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por estar sempre guiando os meus passos pelo melhor caminho. A minha mãe, Cristina, por sempre estar ao meu lado, apoiando, ajudando e incentivando, sem ela este sonho não teria se tornado realidade. Ao meu pai, Luís e aos meus irmãos, Marcelo Henrique e Luís Fernando, por todo o carinho e amizade.

A professora Valéria por ter sido a minha orientadora no mestrado e por todos os conhecimentos transmitidos, toda a ajuda, todo o apoio, toda a amizade e por toda a dedicação e incentivo com que me ajudou a realizar este trabalho. A professora Délia pelos ensinamentos e pela ajuda que possibilitou a conclusão deste projeto.

Aos técnicos, Mércia do HPLC, Rodrigo do MEV e Janaína e aos estagiários, Ana Cláudia Covaes, Luiz Gustavo Lotto e Daniel Baltiere Favoretto pelos trabalhos nos quais me auxiliaram. Agradeço também aos meus amigos, companheiros de laboratório, Juliana Higino, Franciele Lamaison, Bianca Maníglia, André Riul, Roberta Lopes de Paula, Aline Brito, Wellington Leite, Stella Lima e João Paulo San Gregório, pela amizade e pelo apoio.

Ao Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto e a CAPES pela bolsa concedida.

*“Provai e vede que o Senhor é bom; bem-aventurado o
homem que Nele confia.”*

Salmos 34:8

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiii
NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O Bagaço de Cana de Açúcar.....	4
2.1.1 A Celulose.....	5
2.1.2 A Hemicelulose.....	7
2.1.3 A Lignina.....	7
2.2 Pré-tratamentos do Bagaço da Cana de Açúcar.....	8
2.3 A Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana.....	12
2.4 A Produção Biológica de Hidrogênio	15
2.5 Materiais Lignocelulósicos como Substratos para a Produção Biológica de Hidrogênio.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Bagaço de Cana de Açúcar.....	21
3.2 Planejamento Experimental para o Pré-tratamento do Bagaço de Cana de Açúcar com Ácido Diluído.....	21
3.3 Análise estatística.....	23
3.4 Determinação de Açúcares Redutores Totais.....	25
3.5 Determinação de monossacarídeos e potenciais inibidores da fermentação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
3.6 Hidrólise Enzimática do Bagaço após o Pré-Tratamento Ácido.....	25

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço.....	26
3.8 Ensaio de produção de biohidrogênio com Cultura Mista.....	27
3.8.1 Análise da composição do biogás.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana.....	29
4.2 Análise estatística dos resultados de pré-tratamentos do bagaço com ácidos.....	34
4.3- Hidrólise Enzimática dos Bagaços após Pré-Tratamento Ácido.....	47
4.4-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos Bagaços.....	53
4.5- Produção biológica de H ₂ por cultura mista usando o hidrolisado de bagaço de cana como substrato.....	57
5 CONCLUSÕES.....	62
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXO 1.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura de uma fibra vegetal fibra vegetal.....	5
Figura 2-Representação da cadeia linear da celulose, formada de varias unidades consecutivas de celobiose.....	6
Figura 3-Representação das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose.....	6
Figura 4-Representação esquemática da lignina.....	7
Figura 5-Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....	8
Figura 6-Reações que ocorrem durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos.....	11
Figura 7- Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.....	13
Figura 8- Componentes estruturais básicos da hemicelulose e as enzimas responsáveis pela degradação de diferentes ligações.....	15
Figura 9- Via metabólica do <i>Clostridium sp</i> para a produção de H ₂	17
Figura 10- Etapas da digestão anaeróbia de carboidratos e de produção de H ₂ por cultura mista.....	18
Figura 11- Gasômetro do tipo frasco invertido.....	28
Figura 12-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl,fixando-se a concentração de ácido em 4,0%.....	39
Figura 13-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se o tempo de reação em 240 minutos.....	39
Figura 14- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl ,fixando-se a temperatura em 80°C.....	40
Figura 15-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se a concentração de ácido em 4,0%.....	40

Figura 16- Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se o tempo de reação em 240 minutos.....	41
Figura 17- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se a temperatura em 80°C.....	41
Figura 18-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl	42
Figura 19-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl.....	43
Figura 20- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl.....	43
Figura 21-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H ₃ PO ₄	44
Figura 22-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H ₃ PO ₄	45
Figura 23-Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H ₃ PO ₄	45
Figura 24-Concentração de ART determinadas durante os ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados com H ₃ PO ₄ e HCl nas condições do ensaio 8 (Tabela 1) e do bagaço <i>in natura</i> , ao longo de 28 horas.....	48
Figura 25- Concentração de ART nas etapas de pré-tratamento ácido e tratamento enzimático e o total (soma) de ART dos 2 tratamentos. Concentração total de inibidores obtida a partir dos bagaços pré-tratados com H ₃ PO ₄ e com HCl nas condições do ensaio 8 (Tabela 1).....	51
Figura 26- Vista geral da superfície do bagaço de cana <i>in natura</i> obtida por MEV,mostrando a estrutura de fibras e de medulas (setas F e M).....	53
Figura 27-(a) Amplificação sobre a superfície da fibra do bagaço <i>in natura</i> , (b) amplificação sobre a superfície da medula do bagaço <i>in natura</i>	54

Figura 28- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana pré-tratadas com ácido. (a) Vista geral da amostra do bagaço tratado com H_3PO_4 (ensaio 8), mostrando a estrutura de fibras e de medulas, (b) amplificação na superfície da fibra do bagaço tratado com H_3PO_4 (ensaio 8), (c) vista geral da amostra do bagaço tratado com HCl (ensaio 8), mostrando a estrutura de fibras e de medulas, (d) amplificação na superfície da fibra do bagaço tratado com HCl (ensaio 8).....	55
Figura 29- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana pré-tratado com ácido e com posterior hidrólise enzimática. (a) Vista geral da amostra do bagaço pré-tratado com H_3PO_4 (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, mostrando a estrutura de fibras , (b) amplificação na superfície da fibra do bagaço pré-tratado com H_3PO_4 (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, (c) vista geral da amostra do bagaço pré-tratado com HCl (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, mostrando a estrutura de fibras, (d) amplificação da superfície da fibra do bagaço pré-tratado com HCl (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática.....	56
Figura 30- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana in natura que sofreram o ataque enzimático. (a) Vista geral da amostra, mostrando a estrutura de fibras e medula e a superfície danificada da parede celular, (b) amplificação na superfície danificada da parede celular do bagaço.....	57
Figura 31 - Volume de H_2 e de N_2 produzidos nos ensaios de fermentação em 45 horas, com o hidrolisado 8HCl e o controle (glicose 14,0 g/L), como substratos.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Planejamento fatorial completo 2 ³ com pontos axiais e centrais, do pré-tratamento ácido do bagaço de cana com HCl e H ₃ PO ₄	22
Tabela 2-Concentração de glicose (gli), xilose (xil) e arabinose (ara), soma das concentrações destes monossacarídeos (total mono), concentração de açúcares redutores totais (ART) e de potenciais inibidores nos hidrolisados de bagaço de cana com HCl, obtidos segundo as condições estabelecidas na Tabela 1.....	30
Tabela 3- Concentração de glicose (gli), xilose (xil) e arabinose (ara), soma das concentrações destes monossacarídeos (total mono), concentração de açúcares redutores totais (ART) e de potenciais inibidores nos hidrolisados de bagaço de cana com H ₃ PO ₄ , obtidos segundo as condições estabelecidas na Tabela 1.....	33
Tabela 4-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de monossacarídeos totais do hidrolisado com HCl.....	35
Tabela 5-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de ART do hidrolisado com HCl.....	36
Tabela 6-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de inibidores do hidrolisado com HCl.....	36
Tabela 7-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de ART do hidrolisado com H ₃ PO ₄	37
Tabela 8-Concentração dos monossacarídeos glicose, xilose e arabinose, ART e ácido acético, após a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados e <i>in natura</i>	49

NOMEMCLATURA

ART-Açúcares Redutores Totais.

CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CLAE-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento.

DNS- ácido 3,5 dinitritrosalicílico.

et al. – termo latim ‘e colaboradores’.

FFCLRP – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

HMF- hidroximetilfurfural.

HPLC -High-performance liquid chromatography.

MEV-Microscopia Eletrônica de Varredura.

UDOP –União dos Produtores de Bioenergia.

RESUMO

LORENCINI, P. Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio. 2013.74p. Dissertação de Mestrado (Química). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Departamento de Química. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

O bagaço de cana de açúcar é um resíduo lignocelulósico que, após a sua hidrólise, pode ser utilizado como substrato para a produção de hidrogênio (H_2) por fermentação. O objetivo deste trabalho foi realizar pré-tratamentos do bagaço de cana com os ácidos clorídrico (HCl) e fosfórico (H_3PO_4) para a solubilização de carboidratos, produzindo o mínimo de inibidores, bem como para tornar a sua estrutura mais suscetível à hidrólise enzimática. Além disso, foi verificada a possibilidade de utilização dos hidrolisados na produção biológica de H_2 por uma cultura mista de micro-organismos. A otimização das condições de pré-tratamento com os ácidos foi feita por meio de um planejamento experimental, variando-se a concentração entre 0,64 e 7,36 % (m/v), a temperatura de 63,20 a 96,80°C e o tempo de 38,40 a 441,60 min. Nos hidrolisados obtidos foram determinadas as concentrações de açúcares redutores totais (ART) e de monossacarídeos, tais como a glicose, a xilose e a arabinose, além de potenciais inibidores de fermentação, o furfural, o hidroximetilfurfural (HMF) e o ácido acético. As condições de pré-tratamento do bagaço, nas quais foram obtidas as maiores concentrações de ART (13,88 g/L) foi utilizando 6,0 % (m/v) de HCl, em 360,00 min., a 90°C. Entretanto, sob estas condições, também foram detectadas as concentrações mais elevadas dos inibidores. A condição ótima para a hidrólise com o HCl, obtida através da análise estatística, na qual a concentração de inibidores foi minimizada e a de ART maximizada foi de 96,80°C, 441,6 min e 7,36 % (m/v) de ácido. Para o pré-tratamento com o H_3PO_4 , as condições ótimas foram as mesmas encontradas para o HCl, obtendo-se 4,98 g/L de ART. Os bagaços pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática com a enzima Celluclast® e um extrato enzimático bruto com atividade de xilanases. A maior concentração de ART (20,98 g/L) obtida pelas duas hidrólises (ácido/enzimática) foi no bagaço pré-tratado com HCl no tempo de 360,00 min., 6,0 % (m/v) de ácido a 90°C, o qual também apresentou a maior concentração de inibidores (total de 1,23 g/L). O hidrolisado obtido com HCl que apresentou maior concentração de ART foi utilizado em ensaios de fermentação para a produção de H_2 por cultura mista.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática, biohidrogênio.

ABSTRACT

LORENCINI, P. Optimization of acid pretreatment of sugarcane bagasse for use as substrate in biological hydrogen production. 2013.74p.Dissertação de Mestrado (Química). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Departamento de Química. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

Sugarcane bagasse is a lignocellulosic residue that can be used as substrate to produce hydrogen (H_2) by fermentation after hydrolysis. This study aimed to optimize the pretreatment of sugarcane bagasse with hydrochloric acid (HCl) and phosphoric acid (H_3PO_4), to solubilize carbohydrates and produce the minimal amount of inhibitors as well as make its structure more susceptible to enzymatic hydrolysis. In addition, we verified the possibility of using hydrolysates in the biological production of H_2 by a mixed culture of microorganisms. We optimized the conditions for bagasse pretreatment with acids using an experimental design—we varied the concentration between 0.64 and 7.36% (w/v), the temperature from 63.20 to 96.80 °C, and the time from 38.40 to 441.60 min. In the hydrolysates, we determined the concentrations of total reducing sugars (TRS); monosaccharides such as glucose, xylose, and arabinose; and potential inhibitors of fermentation like furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), and acetic acid. The conditions of bagasse pretreatment 6.0% (w/v) HCl, 360 min. and 90 °C led to the highest TRS concentrations (13.88 g L^{-1}), but also to the highest concentrations of inhibitors. Statistical analysis revealed that the optimum conditions for the hydrolysis of sugar cane bagasse with HCl that minimized the concentration of inhibitors while maximizing the TRS concentration were: 96.80 °C, 441.6 min, and 7.36% (w/v) of acid. The optimum conditions for pre-treatment with H_3PO_4 were the same as those found for HCl; which yielded 4.98 g L^{-1} TRS. We subjected the pretreated bagasse to enzymatic hydrolysis with Celluclast® enzyme and to a crude enzyme extract with xylanase activity. For both hydrolyses (acid and enzymatic), the highest TRS concentration (20.98 g L^{-1}) was achieved with the bagasse pretreated with HCl 6.0% (w/v) at 90 °C for 360.00 min., which also furnished the highest concentration of inhibitors (total 1.23 g L^{-1}). The hydrolysate obtained with HCl contained higher TRS concentration was used as substrate in fermentation assays for the production of H_2 by mixed culture.

Keywords: sugarcane bagasse, acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, biohydrogen.

1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural, além de serem fontes esgotáveis de energia, geram poluentes em sua combustão, tais como o monóxido e o dióxido de carbono, um dos responsáveis pelo aquecimento global (WANG e WAN, 2009).

Como alternativa a estes combustíveis, o hidrogênio tem sido considerado a energia limpa do futuro, pois a sua combustão resulta somente em água (WANG e WAN, 2009).

O hidrogênio pode ser produzido quimicamente, eletroquimicamente, pelo processamento de petróleo ou do carvão ou ainda biologicamente pelo uso de microrganismos. Dentre os processos citados para a produção de hidrogênio, as reações que utilizam o gás natural ou frações leves do petróleo compreendem 90% do processo de produção atual (DAS e VEZIROGLU, 2008). Tais métodos consomem combustíveis fósseis, tornando a produção de hidrogênio por processos térmicos e eletroquímicos não sustentáveis.

Por outro lado, os processos biológicos são operados, na maioria das vezes, são operados à temperatura e pressão ambiente, demandando menos energia, além de poderem utilizar fontes renováveis como matéria-prima. Os processos biológicos de produção de hidrogênio podem ser classificados em três sistemas: os fotoquímicos (biofotólise e fotodecomposição), o fermentativo e o processo híbrido ou misto (MATHEWS e WANG, 2009).

Uma das vias que tem sido vista como bastante promissora para a produção de biohidrogênio é a fermentação escura, assim denominada, por não depender da presença da luz. Os carboidratos são os substratos preferidos para a produção de hidrogênio por fermentação. Porém, para uma produção sustentável de hidrogênio por fermentação, o substrato empregado deve obedecer a alguns critérios. Este substrato deve conter principalmente carboidratos, ser produzido a partir de recursos renováveis, encontrar-se em concentração suficiente para que a fermentação e a recuperação da energia sejam energeticamente favoráveis e que, se algum tratamento prévio for necessário, este seja de baixo custo. Por isto, nos últimos anos têm-se realizados estudos utilizando substratos

alternativos, como os resíduos sólidos e líquidos contendo carboidratos na sua composição, tais como os resíduos de natureza lignocelulósica (REN et al, 2009).

Resíduos lignocelulósicos são matérias-primas viáveis para a produção em grande escala de H_2 , por ser este um dos recursos orgânicos mais abundantes na natureza (REN et al., 2009). Dentre estes resíduos, o bagaço de cana é o representante de maior abundância no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, pela grande concentração de indústrias sucroalcooleiras nesta região. Dos 350 milhões de toneladas de cana de açúcar produzidos no Estado de São Paulo (UDOP, 2012), estima-se que foram gerados cerca de 87 milhões de toneladas de bagaço. A destinação mais comum para o bagaço de cana é a produção de energia pela sua queima, a qual, também gera problemas ambientais devido à emissão de dióxido de carbono como produto de sua combustão. Portanto, o Brasil como o maior produtor mundial de cana de açúcar deve possuir alternativas de utilização do bagaço de cana para a produção de energias menos poluentes.

Todavia, a viabilidade de utilização do bagaço como substrato em processos biotecnológicos requer o desenvolvimento de métodos de pré-tratamento que visem eliminar ou diminuir os efeitos da lignina e hemicelulose para disponibilizar os carboidratos (TEIXEIRA et al., 2007).

Dentre os métodos mais utilizados na literatura para o pré-tratamento do bagaço de cana destacam-se os tratamentos químicos por ácidos (ALTERTHUM et al., 1998, NEUREITER et al., 2002, PATTRA et al., 2008). O tratamento mecânico por moagem também é bastante utilizado em combinação com o pré-tratamento químico, ou ainda a combinação do tratamento químico com o enzimático (REN et al., 2009).

Os pré-tratamentos com ácidos diluídos, apesar de serem descritos na literatura como os mais apropriados, possuem o inconveniente de produzirem compostos, tais como o furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, que podem provocar efeitos inibitórios sobre microrganismos fermentativos.

Com vista ao acima exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- Otimizar as condições de pré-tratamento do bagaço de cana por planejamento experimental, quanto as variáveis tempo, temperatura e concentração dos ácidos clorídrico e fosfórico, visando a maior concentração de açúcares redutores totais (ART) e a menor concentração de inibidores de fermentação nos hidrolisados;
- Caracterizar quimicamente os hidrolisados quanto a sua concentração de ART, de monossacarídeos e dos potenciais inibidores de fermentação;
- Verificar o efeito dos pré-tratamentos ácidos do bagaço sobre a hidrólise enzimática dos mesmos;
- Verificar o efeito dos pré-tratamentos ácidos e enzimático do bagaço sobre a sua estrutura com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Utilizar os hidrolisados de bagaço de cana como substrato para a produção de hidrogênio por cultura mista de microrganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *O Bagaço de Cana de Açúcar*

A Cana de açúcar é considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil e, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a estimativa da produção nacional destinada à indústria para a safra 2012-2013 é de 595,13 milhões de toneladas, superando a produção da safra passada em 6,2 %. Para cada tonelada de cana de açúcar processada, estima-se que são gerados cerca de 250 Kg de bagaço (UDOP, 2012). Estes valores fazem com que o bagaço seja o resíduo agroindustrial, de natureza lignocelulósica, mais abundante no Brasil.

A destinação mais comum para o bagaço de cana é a produção de energia pela sua queima, a qual gera problemas ambientais, devido à emissão de dióxido de carbono como produto de sua combustão (PATTRA et al., 2008).

Além da vantagem de sua abundância, o bagaço apresenta alta concentração de carboidratos na sua constituição (PANDEY et al., 2000).

Similarmente a outras plantas, o bagaço de cana é formado principalmente por dois carboidratos, a celulose e a hemicelulose, embebidos em uma matrix, denominada de lignina (REZENDE et al., 2011). A celulose compõe aproximadamente 40 % do bagaço, enquanto a hemicelulose e a lignina correspondem a 35 e 15 %, respectivamente (TEIXEIRA et al., 2008). Entretanto, sua constituição química depende de diversos fatores, entre eles, o tipo de solo, variedade da cana, as técnicas de colheita e o manuseio empregado (RODRIGUES e CAMARGO, 2008).

A Figura 1 mostra o arranjo típico da celulose, hemicelulose e lignina em uma fibra vegetal. Cada fibra lignocelulósica tem uma estrutura de camadas complexas; constituída por uma parede primária fina, formada durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária. A parede secundária é constituída por três camadas (S1, S2 e S3), onde a camada intermediária (S2) determina as propriedades mecânicas da fibra e consiste em uma

série de microfibrilas, helicoidalmente formadas por longas cadeias de celulose e organizadas no sentido da fibra. Tais microfibrilas têm o diâmetro de 10 a 30 nm e são resultantes do empacotamento de 30 a 100 cadeias de celulose estendidas (SILVA et al.,2009).

Figura 1- Estrutura de uma fibra vegetal. Fonte: SILVA et al. (2009).

2.1.1 A Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo constituído por unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) formando uma cadeia linear. As ligações glicosídicas são formadas pela eliminação de uma molécula da água, envolvendo os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 de duas glicoses adjacentes. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose, representado na Figura 2, e é considerado a unidade estrutural básica da celulose.

Figura 2- Representação da cadeia linear da celulose, formada de várias unidades consecutivas de celobiose. Fonte: (TÍMAR-BALÁZSY e ASTOP, 1998).

A estrutura da celulose não é totalmente uniforme ao longo de sua extensão, existindo regiões ordenadas (redes cristalinas) e regiões de baixa ordem (amorfas). As regiões ordenadas são mantidas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, representadas na Figura 3, que tornam a celulose altamente resistente a tratamentos químicos e biológicos, enquanto a parte amorfa da celulose é mais suscetível a tais tratamentos (SILVA, 2010).

Figura 3-Representação das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose. Fonte: SANTOS et al.(2012).

2.1.2 A Hemicelulose

A hemicelulose ocorre em associação íntima com a celulose e a lignina e contribui para a rigidez da parede celular das plantas em tecidos lignificados. Tem uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares, dependendo do tipo de planta, como a xilose, a manose, a arabinose e a galactose. Em plantas perenes, como a cana de açúcar, as principais hemiceluloses são as xilanas (GURGEL, 2010).

2.1.3 A Lignina

A lignina, o componente mais importante não-carboidratado da biomassa lignocelulósica, é um polímero derivado de grupos fenilpropanóides, os quais são altamente condensados e muito resistentes à degradação. As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Portanto, a lignina é um heteropolímero amorfo constituído de unidades de fenilpropano conectadas por diferentes ligações (SILVA, 2010), como está representado na Figura 4.

Figura 4-Representação esquemática da lignina. Fonte: SANTOS et al. (2012)

2.2 Pré-tratamentos do Bagaço da Cana de Açúcar

A viabilidade de utilização do bagaço de cana como substrato em processos biotecnológicos requer o desenvolvimento de métodos de hidrólise, a fim de tornar os carboidratos, componentes da celulose e hemicelulose, disponíveis aos micro-organismos (TEIXEIRA et al., 2008). Para isso, faz-se necessária uma etapa de pré-tratamento do material, para diminuir a recalcitrância do mesmo e aumentar o rendimento de uma posterior hidrólise enzimática. Diferentes métodos de pré-tratamento possuem diferentes ações sobre o material lignocelulósico. Tais métodos podem diminuir a cristalinidade da celulose e/ou o seu grau de polimerização, ou remover seletivamente a hemicelulose e a lignina do material lignocelulósico (SILVA, 2010, REZENDE et al., 2011). A Figura 5 representa, de forma generalizada, a ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.

Figura 5- Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico. Fonte: (MOSIER et al., 2005)

Dentre os pré-tratamentos existentes, destacam-se os físicos, os biológicos e os químicos, que podem estar associados entre si. Os pré-tratamentos físicos são baseados no uso de irradiação (TAHERZADECH e KARIMI, 2008) ou na redução do tamanho das partículas,

através da moagem e da peneiração, aumentando a área superficial do material (OGEDA e PETRI, 2010). Os tratamentos físico-químicos incluem explosão a vapor (LASER et al., 2002; SASAKI, ADSCHIRI, ARAI, 2003), explosão a vapor com amônio (GLOLLAPALLI, DALE, RIVERS, 2003), o uso de solventes orgânicos e fluídos supercríticos (MATSUMURA et al., 2006), o uso de ácidos e/ou bases diluídos (BETANCUR e PEREIRA, 2010). Os pré-tratamentos biológicos lançam mão da capacidade de alguns fungos e bactérias (actinomicetes) produzirem enzimas como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover a lignina da matrix lignocelulósica (OGEDA e PETRI, 2010).

Apesar de existir uma grande variedade de métodos de pré-tratamento do material lignocelulósico, a escolha deste deve contemplar à minimização da degradação dos carboidratos e produção de inibidores e produtos tóxicos aos micro-organismos fermentativos (REZENDE et al., 2011). Neste sentido, os principais métodos de pré-tratamentos estão representados junto aos pré-tratamentos alcalinos e ácidos, associados à temperatura (BETANCUR e PEREIRA, 2010). Estes pré-tratamentos diferem nos tipos de agentes químicos utilizados e, conseqüentemente, nos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular.

Em pré-tratamentos catalisados por bases, parte da lignina é removida e a hemicelulose pode ser subsequentemente hidrolisada pelo uso de enzimas (OGEDA e PETRI, 2010).

Os pré-tratamentos catalisados por ácidos tem sido considerados um dos mais efetivos, além de economicamente viáveis (REZENDE et al., 2011). Estes pré-tratamentos podem ser conduzidos com ácidos concentrados ou diluídos, mas a utilização de ácidos concentrados tem sido evitada devido à formação de compostos inibidores (ALVIRA et al., 2010). Por este motivo, o uso de ácidos diluídos é o método mais favorável de pré-tratamento para a utilização industrial e tem sido usado em uma série de resíduos lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010). Neste tipo de pré-tratamento, principalmente a hemicelulose é hidrolisada, produzindo uma fase líquida rica em xilose, com mínimas quantidades de derivados de lignina. As modificações estruturais promovidas pelo pré-tratamento ácido tem efeito

bastante positivo sobre uma subsequente hidrólise enzimática do material lignocelulósico. Portanto, a combinação destas duas hidrólises tem sido muito utilizada para aumentar o rendimento da sacarificação de materiais lignocelulósicos (GEDDES et al.,2010; SANTOS et al.,2011; GÓMEZ et al.,2010).

Os ácidos mais utilizados nos pré-tratamentos são o clorídrico, o sulfúrico, o nítrico e o fosfórico, sob elevadas temperaturas (GEDDES et al., 2009, FANGKUM e REUNGSANG, 2010) ou sob temperaturas moderadas (sem a utilização de pressão).

No tratamento ácido, além de sua concentração, a temperatura é fator determinante no controle da degradação de açúcares e formação de produtos tóxicos. Em temperaturas elevadas, as pentoses da hemicelulose e, numa menor extensão, as hexoses, são rapidamente degradadas, produzindo ácido acético e furfurais, potenciais inibidores da fermentação (OGEDA e PETRI, 2010). Furfural é produto da desidratação de pentoses, hidroximetilfurfural (HMF) é produto da desidratação de hexoses e o ácido acético é gerado a partir da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose (GÁMEZ et al., 2004).

Como pode ser observado na Figura 6, os principais produtos de degradação dos carboidratos provenientes da hidrólise da celulose e hemicelulose são os furfurais e ácidos fracos, tais como o fórmico e o acético. Os efeitos inibitórios destes compostos são mais estudados sobre leveduras, devido ao interesse na utilização de hidrolisados de resíduos lignocelulósicos como substratos para a produção de etanol.

Figura 6-Reações que ocorrem durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos.

Fonte: PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL (2000).

A inibição causada por ácidos fracos sobre microrganismos fermentativos, em geral, depende do pKa do ácido e do pH do meio que se encontram. Ácidos fracos não dissociados são lipossolúveis e podem se difundir através da membrana celular e entrar no citosol, diminuindo o pH intracelular da célula (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Diferentes microrganismos, respondem diferentemente à presença de furfural e hidroximetilfurfural. Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), em artigo de revisão reportam que o furfural é metabolizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições aeróbias, e anaeróbias. Entretanto, em publicação científica mais recente Allen et al. (2010) relataram que a levedura, para sobreviver em presença de furfural, necessita reduzir o composto a sua forma alcoólica menos tóxica, de furano metanol, para se proteger de eventuais danos causados pelo seu metabolismo. Os autores verificaram que a concentração de 25 mM de furfural resultou num aumento da lag fase de crescimento da levedura, e que em concentrações de 50 mM o crescimento da levedura é totalmente inibido. Os autores creditam este efeito à formação de espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo do furfural.

2.3 A Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana

Tendo em vista a heterogeneidade da composição química e a complexidade estrutural de materiais lignocelulósicos, descritos no item 2.1, se pode entender que a sacarificação destes materiais por via enzimática depende de uma variedade de atividades enzimáticas, cujo sinergismo é essencial para que os carboidratos sejam hidrolisados.

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas e sua classificação, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010; OGEDA e PETRI, 2010).

As endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4), denominadas também de endocelulases, atuam de forma aleatória nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4) liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. Pela ação desta enzima novos pontos terminais são criados, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente) (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

O grupo das exoglucanases é constituído principalmente por celobio-hidrolase e glucano-hidrolase, capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) ou 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase participa da hidrólise primária da fibra e promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às outras celulases (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

A celobio-hidrolase (CBH) pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que tem ação hidrolítica em terminais redutores, e a do tipo II (CBH II) que hidrolisa

terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

O último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glicosidase, ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21) que hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (DE CASTRO e PEREIRA JR, 2010; OGEDA e PETRI, 2010).

Além destas enzimas, outras proteínas como as expansinas e as swolleninas têm sido reportadas como capazes de afrouxar a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação (CARVALHO et al., 2009)

A Figura 7 apresenta uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 7- Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose. Fonte: CARVALHO et al (2009)

Para a hidrólise de hemicelulose há outras enzimas específicas, como as xilanases ou mananases. Hemicelulases são produzidas por muitas espécies de bactérias e fungos, assim como por várias plantas. Muitos microrganismos produzem um padrão múltiplo de hemicelulases para degradar o material vegetal eficientemente. Hoje, preparações de hemicelulases comerciais são obtidas a partir dos fungos *Trichoderma* ou *Aspergillus*

geneticamente modificados (WYMAN et al., 2005). Devido à sua natureza complexa, a hidrólise enzimática da xilana é mais complicada do que a maioria dos polissacarídeos vegetais, por causa das ramificações das cadeias. Tipicamente, as ramificações das xilanas são removidas e depois o esqueleto é despolimerizado. Conforme os substituintes são removidos, a xilana pode se tornar menos solúvel e formar agregados que impedem estericamente a continuação da degradação (OGEDA e PETRI, 2010).

Assim como na celulose a hidrólise enzimática da hemicelulose ocorre pela ação combinada de diversas endoenzimas, exoenzimas e enzimas auxiliares. Por exemplo, a hidrólise da xilana envolve a ação de pelo menos dois grupos de enzimas, endo 1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), atuando na cadeia principal. Dependendo do tipo de xilana, podem ser também necessárias enzimas auxiliares para a clivagem das cadeias laterais, como a α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.131), acetil-xilana-esterases (EC 3.1.1.72), α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), entre outras (SHALLOM e SHOHAM, 2003; CARVALHO et al., 2009), como está representado na Figura 8.

Current Opinion in Microbiology

Figura 8- Componentes estruturais básicos da hemicelulose e as enzimas responsáveis pela degradação de diferentes ligações. Fonte: SHALLOM e SHOHAM (2003).

2.4 A Produção Biológica de Hidrogênio

O H_2 tem sido considerado a energia limpa do futuro, pois sua combustão resulta somente em água. O H_2 pode ser produzido quimicamente, eletroquimicamente, pelo processamento de petróleo ou do carvão ou ainda biologicamente pelo uso de microrganismos (DAS e VEZIROGLU, 2008).

Sabe-se que 95% da produção atual do hidrogênio ocorre a partir de combustíveis fósseis, o que libera gases de efeito estufa para o ambiente e sustenta a dependência do petróleo e de outras fontes não renováveis (MUCCILLO, 2007). Além disso, as tecnologias tradicionais de produção de H_2 necessitam de energia como calor, luz ou eletricidade, de

forma que se inicie o processo (SANTOS e SANTOS 2007). Neste contexto, a produção biológica é considerada muito promissora, visto que demanda menos energia, pois é realizada a temperatura e pressão ambientes, além de poderem utilizar fontes renováveis como matéria-prima (substrato).

São conhecidos três processos distintos de produção biológica de H_2 : o fotoquímico (biofotólise e fotodecomposição de compostos orgânicos), a fermentação “escura” e o processo híbrido ou misto. Os processos fotoquímicos necessitam da presença de luz (energia) e de atmosferas pobres em oxigênio, pois este inibe irreversivelmente as enzimas hidrogenase e nitrogenase, responsáveis pela produção bioquímica de H_2 . A fotodecomposição é realizada por bactérias fotossintetizantes, na presença de luz, que utilizam preferencialmente ácidos orgânicos como substratos. O processo denominado de híbrido ou misto é a combinação da fermentação, que produz ácidos orgânicos como produtos, os quais servem de substrato para a próxima etapa, que é a fotodecomposição (DAS e VEZIROGLU, 2008).

A via fermentativa de produção de H_2 , processo conhecido como fermentação “escura”, apresenta algumas vantagens sobre os demais processos biológicos, quais sejam: não necessita da presença constante de luz, pode ser conduzida à pressão e temperaturas ambientes, permite a utilização de resíduos agroindustriais ricos em carboidratos como substrato. Deste modo, a fermentação escura é considerada o método biológico mais promissor para a produção de H_2 (LEVIN; PITT; LOVE, 2006).

A produção biológica de H_2 por fermentação ocorre a partir da oxidação de carboidratos em ácidos orgânicos, dióxido de carbono e H_2 . Este processo de degradação de compostos orgânicos gera elétrons e a formação de H_2 ocorre como forma de dissipar o excesso de elétrons da célula, permitindo ainda a geração de energia adicional ao metabolismo celular (MATHEWS e WANG, 2009).

Como pode ser observado na Figura 9 em micro-organismos estritamente anaeróbios, como o gênero *Clostridium sp*, por exemplo, o piruvato é convertido a acetil-CoA e CO_2 , pela enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFOR). A oxidação do piruvato necessita da

responsáveis pela degradação de material orgânico em metano e dióxido de carbono (metanogênese). Como pode ser observado na Figura 10, a produção de H_2 por cultura mista e a metanogênese compartilham a maioria das etapas, mediadas por diferentes grupos de microrganismos. A degradação anaeróbica de materiais orgânicos é desenvolvida por uma sequência de reações realizadas por diferentes grupos de bactérias. Pode-se distinguir quatro fases distintas e subsequentes catalisadas por diferentes grupos de bactérias, quais sejam; a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (CHERNICARO, 1997), conforme pode ser observado na Figura 10. Tem-se, então, uma cadeia sucessiva de reações bioquímicas, onde inicialmente acontece a hidrólise ou quebra das moléculas orgânicas (matéria orgânica) que são convertidos em ácidos orgânicos e álcoois até a formação dos produtos finais, essencialmente, gás metano e dióxido de carbono (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994).

Figura 10- Etapas da digestão anaeróbica de carboidratos e de produção de H_2 por cultura mista. Fonte: Adaptado de VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, (2009).

Porém, o sucesso da produção de H_2 por cultura mista requer a inibição das reações que consomem H_2 , tais como a conversão de CO_2 e H_2 em acetato, pelas bactérias homoacetogênicas e a produção de metano a partir de CO_2 e H_2 , pelas metanogênicas hidrogenotróficas (CHERNICARO, 1997). Além disso, o H_2 ainda pode ser usado como doador de elétrons para a redução de nitratos e sulfatos, por bactérias redutoras de nitrato (desnitrificantes) e sulfato redutoras, gerando amônia ou gás nitrogênio (N_2) e sulfetos, respectivamente (VALDEZ-VAZQUEZ e POGGI-VARALDO, 2009). Portanto, a utilização de ácido nítrico ou sulfúrico para a hidrólise de materiais lignocelulósicos introduz nitrato e sulfato no meio, aumentando a competição entre as bactérias da cultura mista pelos substratos doadores de elétrons.

2.5 Materiais Lignocelulósicos como Substratos para a Produção Biológica de Hidrogênio

Materiais lignocelulósicos são matérias-primas viáveis para a produção em grande escala de hidrogênio, por serem estes os recursos orgânicos mais abundantes na natureza (REN et al., 2009).

Tanto para a produção biotecnológica de etanol, como de H_2 a utilização de materiais lignocelulósicos requer uma etapa prévia de hidrólise para tornar os carboidratos, celulose e hemicelulose, biodisponíveis. Entretanto, para a produção de etanol é necessário que os polissacarídeos sejam hidrolisados a monossacarídeos, pois a levedura é incapaz de metabolizar oligossacarídeos. Já para a produção de H_2 , principalmente quando se utiliza cultura mista, os oligossacarídeos podem ser hidrolisados pelos próprios microrganismos que compõe a cultura mista a monossacarídeos, tornando a etapa de hidrólise mais acessível (REN et al., 2009).

Várias são as matérias-primas de natureza lignocelulósica estudadas para a produção de hidrogênio, sendo os hidrolisados de sabugo de milho (CAO et al, 2009), casca de arroz e

mais recentemente o bagaço de cana (FANGKUM e REUNGSANG, 2011), os mais citados na literatura.

Hidrolisados lignocelulósicos são compostos, principalmente, por uma mistura de hexose (glicose) e xilose (pentose). Alguns microrganismos produtores de H_2 , tal como o *Ethanoligenens harbinense* B49 (WANG et al., 2007) não é capaz de metabolizar pentoses. Mas van Niel et al. (2002) e Kadar et al. (2004) demonstraram que o microrganismo termofílico *Clostridium saccharolyticus* pode produzir H_2 a partir de mono e dissacarídeos. Datar et al. (2007) relataram que lodo de esgoto doméstico usado como cultura mista termicamente tratada foi capaz utilizar uma mistura de pentose e hexoses para a produção de H_2 . Esta mistura de hexose e pentose, utilizada pelos autores, foi obtida a partir de sabugo de milho pelo processo de explosão a vapor. Poucos microrganismos possuem a capacidade de degradar diretamente a celulose e produzir hidrogênio. Wang et al. (2008) relataram que o *Clostridium acetobutylicum* X9 realizou a hidrólise da celulose e gerou H_2 a partir de celulose microcristalina como substrato. Estes autores também constataram que a cepa de *C. acetobutylicum* X9 foi capaz de utilizar sabugo de milho pré-tratado com ácido acético e explosão a vapor para produzir hidrogênio. Levin et al. (2006) demonstraram que a cepa de *Clostridium thermocellum* 27405 produziu H_2 com rendimento de 1,6 mol H_2 mol/mol glicose usando fibra de madeira deslignificada como substrato.

Entretanto, a grande maioria dos microrganismos necessita de uma preparação do material lignocelulósico para a sua utilização como substrato na produção de biohidrogênio. O grau de pré-tratamento depende do(s) microrganismo(s) utilizado(s) como inóculo (REN et al, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bagaço de Cana de Açúcar

O bagaço da cana, utilizado nos ensaios, foi cedido pela usina São Martinho, localizada em Pradópolis-SP. O bagaço foi lavado com água a fim de retirar o açúcar residual do processamento da cana. A lavagem foi realizada com água até verificar-se a completa remoção de açúcares redutores totais (ART) na água de lavagem (sobrenadante), através do teste com o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1950). Depois de lavado, o bagaço foi seco em estufa a 100°C, moído em moinho de facas (SL 31) e peneirado em uma peneira de 35 mesh.

3.2 Planejamento Experimental para o Pré-tratamento do Bagaço de Cana de Açúcar com Ácido Diluído

Para o pré-tratamento ácido, foi feito um planejamento experimental, planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e centrais, variando-se a temperatura, o tempo e a concentração de ácido de acordo com a Tabela 1, tendo como resposta a concentração de ART e da soma de monossacarídeos (glicose, xilose e arabinose). Foram realizados pré-ensaios para definir as faixas de concentração de ácido, tempo e temperatura, verificando se havia diferença significativa entre os valores extremos utilizados nos ensaios. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os pré-tratamentos foram feitos com HCl e H_3PO_4 na proporção de 1:15 (bagaço:solução ácida). Em um bécker de 250 mL foi colocada 50 mL de solução ácida e 3,3 g de bagaço, seguindo-se o tratamento térmico em banho-maria, conforme a temperatura do ensaio (Tabela 1).

Tabela 1: Planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e centrais, do pré-tratamento ácido do bagaço de cana com HCl e H_3PO_4

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Concentração ácido (%)
1	70,00(-1)	120,00 (-1)	2,00(-1)
2	70,00(-1)	120,00 (-1)	6,00(+1)
3	70,00(-1)	360,00 (+1)	2,00(-1)
4	70,00(-1)	360,00 (+1)	6,00(+1)
5	90,00(+1)	120,00 (-1)	2,00(-1)
6	90,00(+1)	120,00 (-1)	6,00(+1)
7	90,00(+1)	360,00 (+1)	2,00(-1)
8	90,00(+1)	360,00 (+1)	6,00(+1)
9	63,20(-1,68)	240,00 (0)	4,00(0)
10	96,80(+1,68)	240,00 (0)	4,00(0)
11	80,00 (0)	38,40(-1,68)	4,00(0)
12	80,00 (0)	441,60(+1,68)	4,00(0)
13	80,00 (0)	240,00 (0)	0,64(-1,68)
14	80,00 (0)	240,00 (0)	7,36(+1,68)
15(C)	80,00 (0)	240,00 (0)	4,00(0)
16(C)	80,00 (0)	240,00 (0)	4,00(0)
17(C)	80,00 (0)	240,00 (0)	4,00(0)

O pré-tratamento foi cessado em banho de gelo. Após o resfriamento, filtrou-se a amostra em funil de Büchner com papel filtro. O bagaço pré-tratado foi lavado com água destilada até completar um volume final de 100 mL em balão volumétrico, a fim de retirar todos os açúcares liberados pela hidrólise. O hidrolisado ácido foi neutralizado com carbonato de sódio sólido e o bagaço residual foi seco em estufa para posterior análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e hidrólise enzimática.

3.3 Análise estatística

A análise estatística dos efeitos de cada variável, tempo, temperatura e concentração do ácido sobre a concentração de açúcares redutores, a soma dos monossacarídeos e sobre a concentração de inibidores obtidos, bem como os coeficientes de regressão, foi realizada utilizando o programa “*Statistica 7*”, considerando o erro puro a 95% de confiança. Este programa possibilitou a avaliação do ajuste dos dados experimentais aos modelos matemáticos obtidos, através do teste F, e a obtenção das superfícies de resposta em função das variáveis estudadas.

A determinação da condição ótima para a hidrólise, visando uma posterior produção de H₂, foi realizada através da técnica de análise multiresposta, seguindo o algoritmo proposto por Derringer & Suich (1980). Nessa abordagem, cada função resposta é transformada em uma função denominada de “desejabilidade”, g_i , compreendida no intervalo entre 0 e 1. Essa transformação depende de um julgamento (subjetivo) da importância do valor correspondente da resposta. A ponderação entre as “desejabilidades” é obtida através de sua média geométrica.

Supondo-se que cada uma das **k** variáveis resposta está relacionada às **p** variáveis independentes por uma relação funcional do tipo:

$$Y_i = f_i(X_1, X_2, X_3, \dots, X_p) + \epsilon_i$$

$$i = 1, 2, \dots, k$$

O f_i representa a relação funcional entre Y_i e $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$, menos o termo e_{ij} . Em geral assume-se que a esperança do erro aleatório é igual a zero ($E(e_{ij})=0$), para cada i . Dessa forma, as respostas esperadas, η_i , podem ser relacionadas às p variáveis independentes por:

$$Y_i = f_i(X_1, X_2, X_3, \dots, X_p)$$

$$\text{Com } i = 1, 2, \dots, k$$

Em geral a função f_i é desconhecida. O procedimento normalmente empregado é obter uma estimativa dessa função por técnicas de planejamento experimental e análise de regressão.

A função “desejabilidade” envolve a transformação de cada variável resposta (Y_i) a uma variável g_i que varia entre 0 e 1. As funções g_i individuais são então combinadas usando a média geométrica.

$$G = (g_1, g_2, \dots, g_k)^{1/k}$$

Onde:

$$g_i = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}}$$

sendo $Y_{\max}$, $Y_{\min}$ são os valores máximos e mínimos medidos.

Esse valor único de G fornece a desejabilidade global das respostas combinadas. Esse valor G , também está compreendido no intervalo entre $[0,1]$ e aumentará à medida que o balanceamento entre as respostas se tornem mais otimizadas. A função G torna-se nula se qualquer g_i for igual à zero, ou seja, se qualquer resposta for inaceitável.

Em essência, a função “desejabilidade” condensa uma otimização de várias respostas em um problema com uma única função resposta (G), que pode ser maximizada ou minimizada com técnicas de análise univariada.

A função G de desejabilidade foi formulada a partir das respostas: soma das concentrações de monossacarídeos e concentração de inibidores nos hidrolisados do bagaço

de cana. Na otimização, pretendeu-se obter a condição ótima, a fim de obter uma maior concentração de ART e uma menor concentração de inibidores, portanto a concentração de inibidores foi minimizada.

3.4 Determinação de Açúcares Redutores Totais

A análise quantitativa de açúcares redutores foi feita pelo método do ácido dinitrossalicílico - DNS (Miller, 1950). A curva padrão foi feita utilizando uma solução de glicose (Sigma-Aldrich) de 2,0 g/L e as concentrações utilizadas foram entre 0 e 1,4 g/L. A leitura foi realizada em espectrofotômetro da HP modelo 8453 em comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram feitos em triplicata.

3.5 Determinação de monossacarídeos e potenciais inibidores da fermentação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas no equipamento da Shimadzu com coluna Aminex HPX 87H (4.6mm x 250mm) a 55°C, sob condições isocráticas. A fase móvel consistiu de uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,005 mol/L, com um fluxo de 0,6 mL/min. Um sistema de detecção dupla foi utilizado (arranjo de diodo e índice de refração). Os carboidratos (glicose, xilose e arabinose) e o ácido acético foram quantificados pelo detector de índice de refração (RID) e os furfurais (HMF e furfural) foram analisados pelo detector de arranjo de diodo a 280 nm. Para a análise quantitativa foram feitas curvas padrões, com reagentes da marca Sigma-Aldrich, utilizando a faixa de 0,5 a 1,0 g/L, 0,1 a 7,0 g/L e 0,2 a 1,0 g/L de glicose, xilose e arabinose, respectivamente. Para o furfural e HMF foram feitas curvas padrões nas faixas de 0,001 a 1,0 g/L e para o ácido acético foi utilizada a faixa de 0,5 a 1,0 g/L.

Nas Figuras 1 e 2 do ANEXO 1 estão apresentados os cromatogramas dos padrões de glicose, xilose, arabinose, ácido acético (Figura 1) e furfural e hidroximetilfurfural (Figura 2), todos na concentração de 1,0g/L.

3.6 Hidrólise Enzimática do Bagaço após o Pré-Tratamento Ácido

Foram feitos testes de hidrólise enzimática com os bagaços provenientes do pré-tratamento ácido em que se obtiveram a maior concentração de ART, tanto para o HCl quanto para o H₃PO₄. Tais testes foram realizados a fim de verificar a eficácia dos pré-tratamentos ácidos em tornar a celulose/hemicelulose do bagaço mais suscetível ao ataque enzimático.

Os testes foram feitos em 100 mL do tampão citrato (pH=5,0), adicionando-se 2,0 g do bagaço pré-tratado e 1,0 mL da enzima comercial Celluclast® (Novozymes), o que correspondeu, segundo o fabricante, a uma atividade de endocelulase de 28,7 U/g de bagaço e 0,1mL de extrato enzimático do fungo *Humicola brevis* var. *thermoidea* gentilmente cedido pelo Dr Douglas Masui. O extrato enzimático bruto continha, principalmente, atividade de xilanase (1211,55 U/mL), a qual correspondeu a 60,5 U/g de bagaço e de β glicosidase (atividade não determinada). Os frascos foram incubados em um Shaker (SL 222) a 55°C e 150 rpm. Foi retirada uma alíquota inicial das amostras e, depois, a cada quatro horas de experimento, até verificar-se uma estabilização na concentração de ART. Após o teste, filtrou-se a amostra em funil de Büchner com papel filtro e o bagaço residual foi seco em estufa para análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço

Foram analisadas as amostras secas do bagaço de cana *in natura*, do bagaço proveniente das melhores condições dos pré-tratamentos ácidos e as amostras do bagaço de cana que sofreram posterior hidrólise enzimática. As amostras foram fixadas sobre suportes de alumínio por meio de adesivo condutor. Em sequência, as mesmas foram pulverizadas com ouro por um tempo de 350 segundos (Sputter Coater, SCD050) para melhorar a condutividade. Empregou-se um Microscópio Eletrônico de Varredura marca ZEISS modelo EVO-50, sob voltagem de aceleração de 20 kV para a análise das amostras.

3.8 Ensaios de produção de biohidrogênio com Cultura Mista

Foram realizados testes para a produção de H_2 com cultura mista (lodo) oriunda de um reator anaeróbio utilizado no tratamento de vinhaça de uma usina de etanol e açúcar localizada na região de Ribeirão Preto SP, seguindo a metodologia descrita por Cappelletti et al (2011).

Após a coleta o lodo foi mantido em laboratório em frasco de 5L a temperatura de 45°C. O lodo era mantido ativo pela sua alimentação diária sendo efetuada após sedimentação por 1-2h, retirando-se 1L do líquido sobrenadante do frasco, adicionando-se em seguida 1L de meio de cultura, conforme composição abaixo, utilizando glicose como fonte de carbono na concentração de 10 g/L.

O meio de cultura usado continha os seguintes componentes (em água destilada): NH_4Cl 0,28 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g/L, KH_2PO_4 6,79g/L, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 8,89 g/L, oligoelementos 1ml/L. A solução de oligoelementos traço solução de elementos continha os seguintes componentes (em água destilada): $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 2,00 mg/L, H_3BO_3 50 mg/L, $ZnCl_2$ 50 mg/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 38 mg/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 500 mg/L, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 50mg/L, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 90 mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2,00 mg/L, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 142 mg/L, $Na_2SeO \cdot 5H_2O$ 164 mg/L, EDTA 1,00 mg/L, HCl a 36% 1ml/L (GONZALEZ-GIL, KLEEREBEZEM, LETTINGA, 2001). Todos os produtos químicos eram de grau analítico.

Para a realização dos ensaios de produção de H_2 o lodo foi tratado termicamente (20 min, 97°C) para eliminar as bactérias consumidoras de H_2 . O lodo foi centrifugado por 15 minutos e foi pesado 3,2g em frascos de 250 mL, sendo adicionado 200 mL de hidrolisado (teste) e, no controle 200 mL de solução de glicose, adicionada de nutrientes. O pH inicial do ensaio foi ajustado em 6,5 e foi borbulhado gás argônio, a fim de manter a anaerobiose do sistema.

Os testes foram realizados utilizando como substrato os hidrolisados de HCl e H_3PO_4 contendo a maior concentração de açúcares, o hidrolisado com HCl obtido na condição ótima, isto é, minimizando os inibidores, conforme os resultados do planejamento experimental e

com uma solução de glicose na mesma concentração de ART dos hidrolisados, como controle. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Para quantificação do volume total de biogás produzido no biorreator foi utilizado o sistema de frasco invertido, representado na Figura 11.

Figura 11 - Gasômetro do tipo frasco invertido: 1-Entrada do biogás, 2-Frasco de segurança, 3- Frasco contendo NaOH 5 %, 4- Frasco coletor de soda.

3.8.1 Análise da composição do biogás

A determinação da composição dos gases do *headspace* dos biorreatores foi realizada através de cromatografia a gás (CG) de acordo com Han e Shin (2003), modificando-se a temperatura do detector para 100 °C. A concentração dos gases produzidos foi avaliada por meio da retirada de 300µL de amostra no *headspace* do reator, utilizando-se uma seringa tipo *gás tight*. A análise foi realizada em cromatógrafo a gás CG 2014 da Shimadzu (Japão), equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utilizada foi a peneira molecular 5A 2m x 4,7mm, sendo o gás de arraste argônio sob vazão de 30 mL/min. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector foram 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana

Os resultados obtidos em cada um dos ensaios de otimização do pré-tratamento do bagaço de cana com HCl e H₃PO₄, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Nessas tabelas estão apresentadas as concentrações de ART, determinadas pelo método do DNS, a de monossacarídeos (glicose - gli, xilose - xil e arabinose - ara), quantificados por CLAE e dos potenciais inibidores de fermentação (ácido acético, HMF e furfural), sob as condições estabelecidas pelo planejamento experimental (Tabela 1) de tempo, temperatura e concentração de ácido. Os resultados representam a média de três ensaios realizados sob as mesmas condições.

Observando os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, pode-se verificar que, de uma maneira geral, o monossacarídeo obtido em concentração mais elevada foi a xilose e o inibidor detectado em maior concentração foi o ácido acético. Ambos os compostos são produtos da degradação da hemicelulose, concordando com dados da literatura que apontam ser a hidrólise da hemicelulose, a principal ação do pré-tratamento com ácidos diluídos sobre materiais lignocelulósicos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A partir dos resultados da Tabela 2, pode-se constatar que o ensaio realizado sob as condições 8 (90°C; 360 min; 6,0 % de HCl) apresentou a maior concentração de monossacarídeos no hidrolisado, resultando em 8,0 g/L pela soma das concentrações obtidas pela análise no CLAE (1,22 g/L de gli 6,07 g/L de xil e 0,71 g/L de ara) e 13,88 g/L de ART. Entretanto, sob as condições do ensaio 8 foram encontradas também as concentrações mais elevadas de inibidores de fermentação, 0,97 g/L de ácido acético, 0,26 g/L de furfural e 0,40 mg/L de HMF, totalizando 1,23 g/L.

Tabela 2- Concentração de glicose (gli), xilose (xil) e arabinose (ara), soma das concentrações destes monossacarídeos (total mono), concentração de açúcares redutores totais (ART) e de potenciais inibidores nos hidrolisados de bagaço de cana com HCl, obtidos, segundo as condições estabelecidas na Tabela 1

Ensaio	gli (g/L)	xil (g/L)	ara (g/L)	Total mono (g/L)	ART (g/L)	Ác. acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (mg/L)
1	0,02	0,04	0,46	0,52	0,90	0,63	-	-
2	0,05	2,62	0,51	3,18	5,81	0,89	-	-
3	0,04	1,31	0,57	1,92	2,98	0,91	-	-
4	0,20	4,93	0,72	5,85	9,57	1,00	0,008	-
5	0,14	5,01	0,48	5,63	8,89	1,19	0,004	-
6	0,65	5,55	0,66	6,86	9,76	0,94	0,006	-
7	0,59	5,72	0,70	7,01	12,09	0,98	0,04	-
8	1,22	6,07	0,71	8,00	13,88	0,97	0,26	0,40
9	0,04	0,73	0,56	1,33	8,22	0,90	-	-
10	0,90	6,05	0,71	7,66	13,52	1,01	0,21	2,00
11	0,04	0,72	0,84	1,60	7,29	0,81	-	-
12	0,57	5,37	0,72	6,66	10,15	1,02	0,04	-
13	0,03	0,43	0,55	1,01	5,46	0,78	-	-
14	0,73	5,76	0,68	7,17	13,65	0,99	0,07	5,00
15	0,35	5,37	0,74	6,46	9,57	1,05	0,01	-
16	0,43	5,35	0,74	6,52	9,83	1,03	0,02	-
17	0,37	5,23	0,71	6,31	9,34	1,02	0,02	-

Fangkum e Reungsang (2010) realizaram um pré-tratamento do bagaço com H₂SO₄ entre as concentrações 0,25 e 5,0 %, com um tempo de reação de 60 minutos a 121°C. A condição ótima de hidrólise foi obtida com 1,0 % do ácido. Nesta condição, os autores

obtiveram 11,28 g/L de ART, dos quais, 1,46 g/L de glicose, 9,10 g/L de xilose e 0,72 g/L de arabinose. Apesar das condições de ensaio e do ácido utilizado serem diferentes, as concentrações dos açúcares encontradas pelos autores acima citados são bastante similares às do ensaio 8 com HCl (Tabela 2) deste trabalho.

Em trabalho realizado por Laopaiboon et al (2010) foram comparados pré-tratamentos do bagaço de cana com HCl e H₂SO₄ nas concentrações de 0,5-5% (v/v), tempo de reação (1-5 h) e temperatura (90-120°C) para a sua utilização na produção de ácido láctico. Os autores obtiveram as maiores concentrações de monossacarídeos na hidrólise com HCl, sob as condições de 0,5% of HCl a 100 °C por 5 h. Nestas condições os principais componentes foram 1,50 g/L de glicose, 22,59 g/L de xilose, 1,29 g/L de arabinose, 0,15 de ácido acético e 1,19 g/L de furfural. Os valores de glicose e arabinose foram similares aos encontrados no pré-tratamento por HCl deste trabalho (Tabela 2, ensaio 8), entretanto a concentração de xilose foi bem mais elevada (22,59 g/L) do que a obtida no ensaio 8 de 6,07 g/L (Tabela 2). Esta diferença pode ser em função da temperatura mais elevada utilizada pelos autores (100 °C), em relação a deste trabalho (90°C).

Com relação à temperatura, Canilha et al (2011) apontam que este foi o fator de maior influência na solubilização dos carboidratos componentes do bagaço pela hidrólise com H₂SO₄, mas que o aumento desta também foi responsável pela formação de inibidores. Estes mesmos autores revelaram que o H₂SO₄ a 2 % (m/v), temperatura de 150 °C e 30 min. foram as melhores condições para a hidrólise do bagaço. Entretanto, para a utilização do hidrolisado na produção de etanol por uma levedura fermentadora de pentoses *Pichia stipitis*, foi necessária a retirada dos inibidores do hidrolisado (CANILHA et al., 2010).

Pode-se observar na Tabela 3 que as concentrações de ART obtidas pela hidrólise com H₃PO₄ foram mais baixas, quando comparadas com as da hidrólise com HCl (Tabela 2). A ausência de glicose nos ensaios com H₃PO₄ (Tabela 3) indicam que a celulose sofreu pouca hidrólise por este ácido, nas condições de tempo e temperatura utilizadas. Na hidrólise com HCl as concentrações de glicose também foram mais baixas do que as de xilose (Tabela 2).

Estes resultados confirmam pesquisas anteriores que observaram a maior resistência da celulose à hidrólise por ácidos diluídos do que a hemicelulose (TORGET et al., 2000; ZHAO et al., 2007).

Os resultados da hidrólise com o H_3PO_4 (Tabela 3) demonstraram que o ensaio realizado sob as condições 8, assim como no pré-tratamento com HCl, foi o que apresentou a maior concentração de açúcares no hidrolisado, com um valor de 2,36 g/L para a soma dos monossacarídeos (1,36 g/L glicose e 1,00 g/L arabinose) e 4,98 g/L para os ART. As diferenças observadas entre a soma das concentrações de monossacarídeos determinadas por CLAE e a concentração de ART, determinados pelo método de DNS, pode ser devido à presença de di-, tri ou oligossacarídeos redutores detectados pelo método de DNS, mas não quantificados no CLAE. Nas condições do ensaio 8, além de ser detectada a maior concentração de açúcares, também foi encontrada a maior concentração de ácido acético (0,59 g/L), o único inibidor de fermentação encontrado nos hidrolisados obtidos com H_3PO_4 .

Gámez et al (2004) utilizaram H_3PO_4 nas concentrações entre 2,0 e 6,0 % variando o tempo de hidrólise entre 0 e 300 min a 122°C para a hidrólise de bagaço de cana. As condições de maior concentração de açúcares encontradas pelos autores foi 4% de H_3PO_4 , 300 min e 122°C, sendo obtidos 17,6, 2,6 e 3,0 g/L de xilose, arabinose e glicose, respectivamente. Os autores encontraram, nestas condições, 1,2 g/L de furfural e 4,0 g/L de ácido acético, no hidrolisado. Comparado com o presente trabalho, os autores citados, obtiveram maiores concentrações dos monossacarídeos, bem como de inibidores. Porém, a temperatura utilizada pelos autores foi mais elevada.

Tabela 3- Concentração de glicose (gli), xilose (xil) e arabinose (ara), soma das concentrações destes monossacarídeos (total mono), concentração de açúcares redutores totais (ART) e de potenciais inibidores nos hidrolisados de bagaço de cana com H₃PO₄, obtidos segundo as condições estabelecidas na Tabela 1

Ensaio	gli (g/L)	xil (g/L)	ara (g/L)	Total mono (g/L)	ART (g/L)	Ác. acético (g/L)	Furfural (g/L)	HM F L)
1	-	-	-	-	0,03	-	-	-
2	-	-	-	-	0,09	-	-	-
3	-	-	-	-	0,15	0,28	-	-
4	-	-	0,25	0,25	0,43	0,35	-	-
5	-	-	0,28	0,28	0,63	0,29	-	-
6	-	-	0,26	0,26	0,31	0,35	-	-
7	-	0,50	0,41	0,91	3,12	0,57	-	-
8	-	1,36	1,00	2,36	4,98	0,59	-	-
9	-	-	-	-	0,02	-	-	-
10	-	0,54	0,42	0,96	4,42	0,51	-	-
11	-	-	-	-	0,04	-	-	-
12	-	-	0,39	0,39	1,29	0,43	-	-
13	-	-	-	-	0,15	-	-	-
14	-	0,13	0,40	0,53	1,10	0,39	-	-
15	-	-	0,09	0,09	0,64	-	-	-
16	-	-	0,12	0,12	0,70	-	-	-
17	-	-	0,07	0,07	0,63	-	-	-

Com relação aos inibidores, o HMF, produto da degradação das hexoses, foi observado somente nas condições mais severas nos ensaios com o HCl, ensaios 8, 10 e 14 (Tabela 2), nas concentrações de 0,4, 2,0 e 5,0 mg/L, respectivamente. Já o furfural, produto da degradação das pentoses foi observado nos testes com HCl entre 0,006 e 0,26 g/L e não foi detectado nas hidrólises com H₃PO₄. O ácido acético foi o único potencial inibidor encontrado nos hidrolisados com H₃PO₄ (Tabela 3).

Os inibidores de fermentação não são desejáveis como produtos do pré-tratamento com ácidos diluídos, pois além de causarem a perda dos monossacarídeos, por serem seus produtos de degradação, possuem uma influência negativa sobre os processos fermentativos de uma maneira geral.

O efeito dos potenciais inibidores de fermentação é mais conhecido sobre leveduras, principalmente sobre a *Saccharomyces cerevisiae*, para a produção de etanol. Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), em artigo de revisão, revelou que os efeitos dos compostos inibitórios são mais evidentes sobre o crescimento da levedura do que sobre a produção de etanol. A levedura é capaz de se adaptar a concentrações crescentes de furfural, entretanto, estudos revelaram que 1,0 g/L de HMF inibiu em cerca de 33% a produção de etanol, enquanto que 5 g/L de ácido acético e 0,5 g/L de furfural inibiram em 22 %.

3.2 Análise estatística dos resultados de pré-tratamentos do bagaço com ácidos

Foram analisados os efeitos de cada variável, tempo, temperatura e concentração do ácido sobre a concentração dos monossacarídeos (quantificados por CLAE), de ART, quantificados pelo método de DNS, e sobre a concentração de inibidores obtidos no hidrolisado, bem como os coeficientes de regressão, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6 para o HCl e 7 para o H₃PO₄.

Tabela 4-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de monossacarídeos totais do hidrolisado com HCl

	Efeito	Coeficiente de regressão
Média ¹	5,51	4,92
(1)T (L) ²	2,61	1,95
(2) TEMPO (L) ³	1,76	1,11
(3)C (L) ⁴	2,06	1,40

Legenda: 1- Média concentração açúcares de todos os experimentos; 2- (1)T(L)-Temperatura linear; 3-(2) TEMPO(L)-Tempo linear; 4-(3)C(L)- Concentração linear.

Como pode ser observado na Tabela 4, o aumento temperatura linear (do ponto -1,68 para o -1, do -1 para o 0 e assim sucessivamente) produz um aumento de 2,61 g/L na concentração de monossacarídeos totais. A concentração linear e o tempo linear produzem um aumento de 2,06 g/L e 1,76 g/L, respectivamente. Essas variáveis afetam significativamente ($p < 0,05$) e de forma positiva a concentração de monossacarídeos do hidrolisado.

Na Tabela 5, observa-se que a temperatura, a concentração e o tempo também afetam significativamente ($p < 0,05$) e de forma positiva a concentração de ART do hidrolisado. Os valores de seus efeitos correspondem ao aumento (em g/L) ocasionado na concentração de ART quando tal variável aumenta de um ponto para o outro do planejamento experimental. Desta forma, a temperatura produz um aumento de 3,53, o tempo de 2,34 e a concentração do ácido de 3,07 g/L na concentração de ART.

Pela Tabela 6, pode-se observar que o aumento da temperatura linear (do ponto -1,68 para o -1, do -1 para o 0 e assim sucessivamente) produz um aumento de 0,22 g/L na concentração de inibidores. O tempo linear e a concentração linear produzem um aumento de 0,13 g/L e 0,12 g/L na concentração de inibidores, respectivamente. Estas variáveis afetam significativamente ($p < 0,05$) e de forma positiva a concentração de inibidores do hidrolisado.

Tabela 5-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de ART do hidrolisado com HCl

	Efeito	Coeficiente de regressão
Média ¹	9,79	8,88
(1)T (L) ²	3,53	2,51
(2) TEMPO (L) ³	2,34	1,31
(3)C (L) ⁴	3,07	2,04

Legenda: 1- Média concentração açúcares de todos os experimentos; 2- (1)T(L)-Temperatura linear;3-(2) TEMPO(L)-Tempo linear; 4-(3)C(L)- Concentração linear.

Tabela 6-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de inibidores do hidrolisado com HCl

	Efeito	Coeficiente de regressão
Média	1,06	1,06
(1)T(L)	0,22	0,11
(2) TEMPO (L)	0,13	0,07
TEMPO (Q) ¹	-0,08	-0,04
(3)C(L)	0,12	0,06
C(Q) ²	-0,09	-0,04
1L by 2L ³	-0,07	-0,03
1L by 3L ⁴	-0,10	-0,05
2L by 3L ⁵	0,07	0,04

Legenda: 1-TEMPO (Q)- Tempo quadrático; 2- C(Q)- Concentração quadrática; 3-1Lby2L- Combinação da temperatura linear com o tempo linear; 4- 1Lby3L-Combinação da temperatura linear com a concentração linear;5-2L by 3L- Combinação do tempo linear com a concentração linear.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 7 pode-se verificar que as variáveis, temperatura, concentração do ácido e tempo possuem uma influência significativa e de forma positiva na concentração de ART, do hidrolisado com H₃PO₄.

Tabela 7-Efeito das variáveis e coeficientes de regressão na concentração de ART do hidrolisado com H_3PO_4

	Efeito	Coeficiente de regressão
Média	0,65	0,65
(1)T(L)	2,31	1,15
T(Q)	1,11	0,56
(2) TEMPO (L)	1,42	0,71
(3)C(L)	0,51	0,25
1L by 2L	1,67	0,84
1L by 3L	0,30	0,150
2L by 3L	0,60	0,30

Legenda: 1-TEMPO (Q)- Tempo quadrático; 2- C(Q)- Concentração quadrática; 3-1Lby2L- Combinação da temperatura linear com o tempo linear; 4- 1Lby3L-Combinação da temperatura linear com a concentração linear;5-2L by 3L- Combinação do tempo linear com a concentração linear.

Já para a concentração de inibidores e para a concentração de monossacarídeos, os efeitos não apresentam valor significativo ($p > 0,05$), ou seja, a influência de tais parâmetros não é significativa para aumentar a concentração de inibidores no hidrolisado com H_3PO_4 .

Segundo a análise de variância (ANOVA), os modelos obtidos para a concentração de monossacarídeos totais, determinados por CLAE (total mono), e concentração de ART pelo DNS, e concentração de inibidores para os hidrolisados com HCl, foram estatisticamente significativos e preditivos ($p < 0,05$), sendo o $F_{\text{tabelado}} > F_{\text{calculado}}$. Da mesma forma, a concentração de ART para os hidrolisados com H_3PO_4 foram estatisticamente significativos e preditivos ($p < 0,05$), sendo o $F_{\text{tabelado}} > F_{\text{calculado}}$.

O modelo obtido para a concentração de monossacarídeos e de inibidores para os hidrolisados com H_3PO_4 não foi estatisticamente significativo nem preditivo.

Os modelos estão descritos nas Equações 1 a 3 para os hidrolisados com HCl e na Equação 4 para o hidrolisados com H₃PO₄.

$$\text{Mono}_{\text{HCl}} = 4,92 + 1,95X_1 + 1,11X_2 + 1,40X_3 \quad (1)$$

$$\text{ART}_{\text{HCl}} = 8,88 + 2,52X_1 + 1,31X_2 + 2,04X_3 \quad (2)$$

$$\text{Inib}_{\text{HCl}} = 1,06 + 0,11X_1 + 0,07X_2 - 0,04X_2^2 + 0,06X_3 - 0,04X_3^2 - 0,03X_1X_2 - 0,04X_1X_3 - 0,03X_2X_3 \quad (3)$$

$$\text{ART}_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,65 + 1,15X_1 + 0,56X_1^2 + 0,76X_2 + 0,25X_3 + 0,84X_1X_2 + 0,15X_1X_3 + 0,30X_1X_3 \quad (4)$$

Dados: X_1 = Temperatura (°C); X_2 = Tempo (min); X_3 = Concentração de ácido (%).

A partir dos modelos apresentados foram obtidas as superfícies de resposta, analisando-se o efeito do tempo e da temperatura, da concentração de ácido e da temperatura e da concentração de ácido e do tempo na concentração de ART, de monossacarídeos e de inibidores dos hidrolisados de HCl e na concentração de ART dos hidrolisados de H₃PO₄.

Nas Figuras 12, 13 e 14 estão apresentadas as superfícies de respostas dos hidrolisados com HCl, analisando-se o efeito das variáveis sobre a concentração de ART, determinada pelo método de DNS. Nas Figuras 15, 16 e 17 estão apresentadas as superfícies de resposta para a soma das concentrações de monossacarídeos obtidas por CLAE.

Figura 12-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se a concentração de ácido em 4,0%.

Figura 13-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se o tempo de reação em 240 minutos.

Figura 14- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com HCl , fixando-se a temperatura em 80°C.

Figura 15-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se a concentração de ácido em 4,0%.

Figura 16- Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se o tempo de reação em 240 minutos.

Figura 17- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de monossacarídeos no hidrolisado de bagaço de cana com HCl, fixando-se a temperatura em 80°C.

Pela representação nas Figuras de 12 a 17 pode-se observar que, tanto para as concentrações de monossacarídeos, quanto para a concentração de ART, a temperatura possui uma maior influência sobre a concentração de açúcares, que pode se notada pela análise das Figuras 12, 13, 15 e 16, seguida pela concentração do ácido, enquanto que, o tempo possui uma influência menos significativa (Figuras 14 e 17).

As superfícies de respostas dos hidrolisados com HCl, analisando-se o efeito das variáveis tempo, temperatura e concentração de ácido, na concentração total de inibidores obtidos nos hidrolisados estão apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20.

Figura 18-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl.

Figura 19-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl.

Figura 20- Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de inibidores no hidrolisado de bagaço de cana com HCl.

Observando-se as Figuras 18 e 19, percebe-se que a temperatura possui uma maior influência na concentração de inibidores do hidrolisado. O tempo e a concentração de ácido possuem uma influência equivalente na concentração de inibidores dos hidrolisados com HCl, que pode ser vista na Figura 20.

De acordo com estudo realizado por Canilha et al. (2011) sobre o pré-tratamento de bagaço com H_2SO_4 , a temperatura também foi o fator de maior influência sobre a solubilização dos carboidratos do bagaço, seguido da concentração do ácido e do tempo. Entretanto, no estudo com o mesmo ácido realizado por Neureiter et al. (2002), os autores concluíram que a concentração do ácido e não a temperatura foi o fator que mais influenciou na solubilização de açúcares do bagaço, mas que a temperatura foi o fator de maior influência sobre a formação de furfurais.

Nas Figuras 21, 22 e 23, estão as superfícies de resposta dos hidrolisados com H_3PO_4 , analisando-se o efeito das variáveis sobre a concentração de ART.

Figura 21-Efeito do tempo e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H_3PO_4

Figura 22-Efeito da concentração de ácido e da temperatura na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H_3PO_4

Figura 23-Efeito da concentração de ácido e do tempo na concentração de ART no hidrolisado de bagaço de cana com H_3PO_4 .

Analisando-se as Figuras 21 e 22, percebe-se que a temperatura possui uma maior influência na concentração de ART. Em seguida, vem o tempo, que fica claro na Figura 23, a qual mostra que este tem uma influência mais significativa do que a concentração de ácido na concentração de ART dos hidrolisados com H₃PO₄.

Para o pré-tratamento do bagaço com o H₃PO₄, nas condições estudadas, não houve influência significativa das variáveis na concentração de monossacarídeos e na concentração de inibidores do hidrolisado. Portanto, a hidrólise com o H₃PO₄ pode ser estudada levando-se em conta apenas a concentração de ART.

Já para o pré-tratamento com HCl, tanto a concentração de açúcares como a de inibidores foram alteradas significativamente pelas variáveis tempo, temperatura e concentração de ácido. Para a determinação da condição ótima de hidrólise, que visou uma elevada concentração de ART e baixa de inibidores, para uma posterior utilização do hidrolisado em processo fermentativo de produção de H₂, foi utilizada a técnica de análise multi-resposta, seguindo o algoritmo proposto por Derringer & Suich, 1980. Nesta técnica é construída a função desejabilidade (G), a partir dos modelos obtidos para as variáveis estudadas (no caso, os modelos 1, 2 e 3), conforme foi descrito em materiais e métodos.

Seguidamente, esta função foi maximizada utilizando o software Mathematica 5.0. Para a otimização das condições de pré-tratamento com HCl visou-se obter a condição que promova uma maior solubilização de monossacarídeos e de ART (peso 9), e uma menor formação de inibidores, portanto a concentração de inibidores foi minimizada (peso 3).

$$G = \left[\sqrt[3]{\left(\frac{4.4029 + 1.9533 * x_1 + 1.1057 * x_2 + 1.404 * x_3}{7.48} \right)^9} * \sqrt[3]{\left(\frac{7.977 + 2.5096 * x_1 + 1.3158 * x_2 + 2.045 * x_3}{12.98} \right)^9} * \sqrt[3]{\left(\frac{0.17 - 0.11 * x_1 - 0.07 * x_2 + 0.04 * x_2^2 - 0.06 * x_3 + 0.04 * x_3^2 + 0.03 * x_1 * x_2 + 0.04 * x_1 * x_3 + 0.03 * x_2 * x_3}{0.60} \right)^3} \right];$$

Os valores de temperatura, tempo e concentração de HCl obtidos pela otimização desta função foram 96,80°C (+1,68), 441,60min (+1,68) e 7,36 % (+1,68), respectivamente. Os valores teóricos de concentração de monossacarídeos, de ART e de inibidores para tal condição foram calculados substituindo os valores codificados das variáveis nos modelos estatísticos obtidos correspondentes às suas concentrações (Equações 1, 2 e 3), resultando num valor de 12,41 g/L, 18,74 g/L e 0,97 g/L, respectivamente. A validação experimental ainda não foi realizada.

A fim de solubilizar uma quantidade maior de carboidratos do bagaço, para a sua utilização na produção de H₂ por fermentação, realizou-se uma hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado pelos ácidos e os resultados estão descritos no item a seguir.

4.3- Hidrólise Enzimática dos Bagaços após Pré-Tratamento Ácido

Foi realizada a hidrólise enzimática dos bagaços de cana pré-tratados com HCl e com H₃PO₄ nas condições de ensaio 8 (Tabela 1), no qual foram obtidas as maiores concentrações de ART. Os resultados da concentração de ART ao longo de 28 horas nos ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados com os ácidos HCl e H₃PO₄, bem como do bagaço *in natura*, encontram-se na Figura 24.

Figura 24- Concentração de ART durante os ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados com H₃PO₄ e HCl nas condições do ensaio 8 (Tabela 1) e do bagaço *in natura*, ao longo de 28 horas.

Durante a hidrólise enzimática foi observado um aumento constante na concentração de ART dos bagaços pré-tratados nas primeiras 12 horas de ensaio (Figura 24). No bagaço *in natura* também ocorreu uma solubilização de ART pela hidrólise enzimática, entretanto com uma velocidade menor e até a décima hora, sendo que a concentração final de ART foi bem inferior à observada nos bagaços pré-tratados (1,9 g/L).

As concentrações de ART liberados em 28 horas de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados na condição de ensaio 8 com HCl e H₃PO₄ foram similares, 6,76 e 6,32 g/L, respectivamente, embora o bagaço tratado com o H₃PO₄ ainda tivesse uma maior concentração de polissacarídeos, pois na etapa de pré-tratamento ácido foi encontrada baixa concentração de ART neste hidrolisado.

As concentrações de monossacarídeos (gli, xil e ara) e ácido acético, ao final da hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados com ácido estão apresentados na Tabela 8. Estes resultados representam a média de três ensaios realizados sob as mesmas condições.

O ácido acético foi o único inibidor de fermentação encontrado em todos os bagaços que sofreram hidrólise enzimática. Entretanto, a concentração detectada é, provavelmente, residual do próprio bagaço, uma vez que o bagaço *in natura* também apresentou concentração similar de ácido acético.

Tabela 8-Concentração dos monossacarídeos glicose, xilose e arabinose, ART e ácido acético, após a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados e *in natura*

Amostra	gli (g/L)	xil (g/L)	ara (g/L)	Total mono (g/L)	ART (g/L)	Ác. Acético (g/L)
Bagaço <i>in natura</i>	0,84	-	1,11	1,95	2,54	0,23
Bagaço H ₃ PO ₄	1,42	-	3,97	5,39	6,53	0,25
Bagaço HCl	2,29	-	4,04	6,33	7,10	0,26

A combinação de enzimas utilizadas para a hidrólise dos bagaços pré-tratados foi composta pela enzima comercial Celluclast®, contendo atividade principalmente de endocelulase (NOVO NORDISK, 1996) e o extrato enzimático do fungo *Humicola brevis* var. *thermoidea* (MASUI et al, 2012).

Na Tabela 8 pode ser observado que para o bagaço *in natura* submetido à hidrólise enzimática, a glicose e a arabinose foram detectadas, mas não foi observada a presença de xilose. Similarmente, nos bagaços pré-tratados com H₃PO₄ e HCl, sob as condições do ensaio 8, após a hidrólise enzimática foi verificada principalmente a presença de glicose e arabinose. A predominância destes dois monossacarídeos deve-se, principalmente, às atividades enzimáticas do extrato enzimático do fungo *H. brevis* var. *thermoidea* que apresenta elevada atividade de β glicosidase e de xilanases (MASUI et al, 2012). Oligossacarídeos são produtos da hidrólise da endo e da exocelulase que, dependendo do grau de polimerização, servem de substrato para a β glicosidase, cujo produto de hidrólise é a glicose. A arabinose é produto da ação de uma xilanase específica, a α -L-arabinofuranosidase, cuja atividade, segundo Masui (2013), ainda não foi investigada no extrato enzimático bruto utilizado neste trabalho.

Ao final da hidrólise enzimática (Tabela 8) também foi observada uma elevada concentração de ART, mas não da xilose. Este efeito pode ser explicado pela atividade de xilanases presentes no extrato enzimático do fungo *H. brevis* var. *thermoidea*, cujos produtos de hidrólise são xilobiose e xilo-oligossacarídeos, os quais são açúcares redutores. Estes produtos podem ser hidrolisados à xilose, pela ação de β xilosidases, porém, o extrato enzimático utilizado aqui não apresentava esta atividade enzimática (MASUI, 2013).

Santos et al (2011) avaliaram duas enzimas comerciais para a hidrólise de bagaço pré-tratado com H_2SO_4 , que resultaram em xilose nos hidrolisados, mas em baixa concentração. Os autores revelaram que o conteúdo de sólido (bagaço), bem como a carga de enzima e a adição de surfactante influenciaram na sacarificação do bagaço pré-tratado. Portanto, imagina-se que no presente trabalho a sacarificação dos bagaços pré-tratados ainda poderia ser otimizada, uma vez que apenas testes preliminares com estas enzimas foram realizados.

A sacarificação de bagaço pré-tratado foi estudada por Geddes et al (2010), os quais obtiveram uma melhor solubilização da celulose usando uma carga de enzima (celulase + β -glicosidase) de 50 FPU/g de bagaço pré-tratado com H_3PO_4 1,0% (m/m), por de 10 minutos a 190°C. A quantidade total de ART obtida nestas condições foi de 748 g/kg de bagaço.

A Figura 25 apresenta a concentração de ART e de inibidores obtidos nas etapas de pré-tratamento ácido, do tratamento enzimático e a soma de ART obtidos pelos dois tratamentos, a fim de verificar a eficiência global das hidrólises.

Como pode ser observado na Figura 25, o hidrolisado do pré-tratamento com HCl nas condições do ensaio 8 apresentou a maior concentração de ART total, sendo que 66 % de ART foi obtido no pré-tratamento ácido, enquanto os demais 34 % foram obtidos pela hidrólise enzimática. A concentração de ART total obtida pelo pré-tratamento ácido HCl e o enzimático foi cerca de duas vezes maior do que no hidrolisado do bagaço pré-tratado com H_3PO_4 . A concentração de inibidores totais também foi cerca de duas vezes maior neste hidrolisado do que no pré-tratado com H_3PO_4 .

Figura 25- Concentração de ART e de inibidores formados nas etapas de pré-tratamento ácido com H₃PO₄ e com HCl nas condições do ensaio 8 (Tabela 1), no tratamento enzimático e o total (soma) de ART dos 2 tratamentos.

Nos hidrolisados do bagaço pré-tratado com H₃PO₄, 43 % do total de ART foram obtidos na etapa de pré-tratamento ácido e o restante pelo enzimático (Figura 25). Apesar do bagaço pré-tratado com H₃PO₄ possuir uma concentração maior de polissacarídeos na sua composição do que o pré-tratado com HCl, pois durante a etapa de pré-tratamento ácido foi detectada uma menor concentração de ART no hidrolisado, concentrações similares de ART foram obtidas durante o pré-tratamento enzimático dos bagaços pré-tratados pelos dois ácidos. Estes resultados indicam que tanto o pré-tratamento do bagaço com HCl, quanto com H₃PO₄, foram eficientes em tornar os polissacarídeos do bagaço mais disponíveis à hidrólise enzimática. Entretanto, o pré-tratamento com HCl, seguido do enzimático liberou a maior concentração de ART, nas condições utilizadas neste estudo.

Geddes et al. (2010) afirma que o ácido fosfórico é um ácido que produz menos inibidores do que o HCl na hidrólise do bagaço, mas que em termos de utilização industrial apresenta um valor bem maior que o HCl.

A partir dos resultados apresentados na Figura 25 percebe-se a importância em combinar os processos químicos e enzimáticos para aumentar a concentração de ART nos

hidrolisados. Esta estratégia vem sendo utilizada por vários autores. Gómez et al. (2010) estudaram o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido fosfórico e com ácido sulfúrico diluídos combinando com uma hidrólise enzimática para a liberação de açúcares fermentescíveis. Os autores variaram a concentração de ácido entre 0,5 e 3,5 % (m/v), o tempo de reação entre 15 e 180 minutos, a uma temperatura constante de 130°C. Um grama de bagaço pré-tratado foi hidrolisado com uma celulase comercial produzida por *Trichoderma reesei* (Sigma) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma) com a concentração de 7 FPU/g de biomassa seca pré-tratada e 3,5 UI/g de biomassa seca pré-tratada, respectivamente. A combinação do pré-tratamento com ácido fosfórico (3,5 % de ácido, 180 min. e 130°C) e a hidrólise enzimática, resultou na liberação de 404,5 mg de glicose /g de bagaço seco. Para o pré-tratamento com ácido sulfúrico (0,5% (m/v) de ácido, 15 minutos e 130°C), seguido de enzimático foram obtidas 414,9 mg de glicose / g seco de bagaço.

A combinação de pré-tratamento químico do bagaço, seguido de hidrólise enzimática também foi estudada por Rabelo et al. (2011) para a produção de etanol. O pré-tratamento do bagaço foi feito com peróxido de hidrogênio alcalino e cal e as enzimas utilizadas foram celulase (3,50 FPU/g de bagaço pré-tratado) e a β -glicosidase (1,00 UI/g de bagaço pré-tratado). Sob as melhores condições de pré-tratamento químico (7,35 % (v/v) de peróxido a 25 ° C e 1 h) e enzimático foram liberados 691 mg de glicose /g de bagaço pré-tratado.

Neste trabalho, a combinação do pré-tratamento ácido com HCl nas condições do ensaio 8 e enzimático resultou num total de ART de 780 mg/g de bagaço seco, dos quais 150mg foi glicose. Para o hidrolisado do teste 8 com o H_3PO_4 obteve-se 470 mg de ART /g de bagaço, dos quais 70 mg/g de bagaço são correspondentes à glicose. Embora, os valores em termos de glicose sejam mais baixos neste trabalho do que os descritos nos trabalhos anteriormente citados (GÓMEZ et al ,2010; RABELO et al , 2011), o objetivo principal dos autores era a obtenção de glicose para a produção de etanol, enquanto no nosso trabalho o objetivo era a liberação de açúcares redutores.

4.4-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos Bagaços

A Figura 26 apresenta a micrografia da superfície do bagaço de cana *in natura*, moído e peneirado em 35 mesh. Segundo Rezende et. al (2011), a estrutura do bagaço *in natura* revela duas estruturas morfológicas principais, fibra e medula, as quais foram identificadas na Figura 26 e estão representadas pelas setas F e M, respectivamente.

Figura 26- Vista geral da superfície do bagaço de cana *in natura* obtida por MEV, mostrando a estrutura de fibras e de medulas (setas F e M).

A amplificação da região das fibras está mostrada na Figura 27 a e a amplificação da região das medulas está representada na Figura 27 b.

Figura 27-(a) Amplificação sobre a superfície da fibra do bagaço *in natura*, (b) amplificação sobre a superfície da medula do bagaço *in natura*.

Percebe-se que a superfície da fibra é formada por listras paralelas que são parcialmente cobertas por um material residual. Já a medula é fragmentada e mais frágil apresentando pequenos poros (REZENDE et.al, 2011).

A Figura 28 apresenta a micrografia das superfícies de bagaço que sofreram o pré-tratamento ácido. A análise morfológica destas amostras mostra que a quantidade de medula foi consideravelmente reduzida, indicando uma menor resistência da medula à tratamentos ácidos do que as estruturas de fibra que prevaleceram, embora tenham sido alteradas pela degradação ácida com suas listras paralelas tornando-se mais expostas.

Percebe-se também, pela Figura 28, que a amostra de bagaço que sofreu o tratamento com H_3PO_4 , apresentou uma morfologia com uma quantidade maior de estruturas de medula, indicando assim um tratamento ácido menos severo (Figura 28 a) que na amostra que sofreu o tratamento com HCl.

Figura 28- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana pré-tratadas com ácido. (a) Vista geral da amostra do bagaço tratado com H_3PO_4 (ensaio 8), mostrando a estrutura de fibras e de medulas, (b) amplificação na superfície da fibra do bagaço tratado com H_3PO_4 (ensaio 8), (c) vista geral da amostra do bagaço tratado com HCl (ensaio 8), mostrando a estrutura de fibras e de medulas, (d) amplificação na superfície da fibra do bagaço tratado com HCl (ensaio 8).

Na Figura 29 está apresentada a micrografia das superfícies de bagaço que sofreram a hidrólise enzimática após o pré-tratamento com HCl e H_3PO_4 (ensaio 8). Como pode ser observado nesta figura, a quantidade de medula foi consideravelmente reduzida, tornando-se quase inexistente, e as estruturas de fibra prevaleceram, porém suas listras paralelas tornaram-se mais expostas, indicando que elas também sofreram o ataque enzimático (REZENDE et. al,2011).

Figura 29- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana pré-tratado com ácido e com posterior hidrólise enzimática. (a) Vista geral da amostra do bagaço pré-tratado com H_3PO_4 (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, mostrando a estrutura de fibras , (b) amplificação na superfície da fibra do bagaço pré-tratado com H_3PO_4 (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, (c) vista geral da amostra do bagaço pré-tratado com HCl (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática, mostrando a estrutura de fibras, (d) amplificação da superfície da fibra do bagaço pré-tratado com HCl (ensaio 8) e posterior hidrólise enzimática.

A micrografia do bagaço *in natura* que sofreu hidrólise enzimática está representada na Figura 30, na qual pode-se notar a presença das estruturas de fibras e medulas, mostrando que a integridade do tecido foi mantida em alguma extensão, mas os sinais de degradação são evidentes na superfície da parede, tal como indicado pela seta na Figura 30 a. A deslignificação resulta na formação de furos na estrutura da parede celular e, portanto, a sua superfície parece ser mais frágil, quando comparado para amostras não hidrolisadas, como na Figura 29 (REZENDE et.al, 2011).

Figura 30- Imagens de MEV de superfícies do bagaço de cana in natura que sofreram o ataque enzimático. (a) Vista geral da amostra, mostrando a estrutura de fibras e medula e a superfície danificada da parede celular, (b) amplificação na superfície danificada da parede celular do bagaço.

4.5- Produção biológica de H_2 por cultura mista usando o hidrolisado de bagaço de cana como substrato.

Foram conduzidos ensaios de fermentação, visando à produção de hidrogênio, utilizando os hidrolisados do bagaço como substrato, obtidos na etapa de pré-tratamento com HCl. Foi testado o hidrolisado obtido pelas condições do ensaio 8 (8HCl), por se tratar do hidrolisado com a maior concentração de ART. Na Figura 31 estão representados os volumes dos principais gases produzidos durante os ensaios de fermentação, hidrogênio (H_2) e nitrogênio (N_2), com o hidrolisados, bem como em seu respectivo controle contendo glicose (na mesma concentração de ART do hidrolisado) e solução de nutrientes. Os testes foram feitos em duplicata e o deslocamento de volume foi monitorado por 72 horas, permanecendo inalterado após 45 horas, como pode ser observado na Figura 31.

Figura 31 - Volume de H₂ e de N₂ produzidos nos ensaios de fermentação em 45 horas, com o hidrolisado 8HCl e o controle (glicose 14,0 g/L), como substratos.

Na Figura 31 estão comparados os volumes de gases produzidos nos ensaios de fermentação com o hidrolisado HCl (hidrolisado obtido sob as condições do ensaio 8) e seu respectivo controle. Como pode ser observado nesta figura, o gás produzido em maior volume foi o N₂, enquanto o H₂ foi produzido em menor volume. Estes resultados poderiam sugerir que houve contaminação por ar durante a realização dos ensaios, mas esta hipótese foi descartada, após uma série de experimentos realizados pelo grupo de pesquisa, nos quais foi constatada que a presença de N₂ é devido ao processo de desnitrificação. O produto da desnitrificação, o N₂, é formado, em ausência de oxigênio, pela redução de formas oxidadas de nitrogênio, como o nitrito ou o nitrato, normalmente presentes em águas residuárias industriais, por intermédio de bactérias denominadas de desnitrificantes (AHN, 2006). Materiais orgânicos reduzidos, como, por exemplo, os carboidratos podem ser os doadores de elétrons para redução de nitrito e nitrato, gerando N₂ (AHN, 2006). Por meio destes resultados, supõe-se que a cultura mista (lodo) utilizada como inóculo nos ensaios, oriunda de um sistema de tratamento anaeróbio de vinhaça, seja rica em bactérias desnitrificantes, além de apresentar elevada concentração de nitrato, o qual foi introduzido no ensaio juntamente com a suspensão do inóculo. Portanto, o estudo de utilização do hidrolisado do bagaço de

cana para a produção de H_2 ficou prejudicado em função da natureza do inóculo. Este fato fica evidente, pois mesmo no ensaio controle (apenas com glicose) pode ser observado um maior volume de N_2 do que de H_2 .

Durante o ensaio de fermentação (Figura 31) o N_2 foi o gás predominante. Considerando-se que a desnitrificação também é um processo biológico, embora não seja o foco deste trabalho, o volume de N_2 produzido no ensaio com o hidrolisado foi 4 vezes maior do que no controle. Com relação ao H_2 , após 45 horas de ensaio, o volume produzido foi duas vezes maior para o hidrolisado do que no controle. Estes resultados indicam que a presença dos inibidores, nas concentrações presentes no hidrolisado (0,97 g/L de ácido acético, 0,26 g/L de furfural e 0,40 mg/L de HMF), parecem não afetar de forma negativa os processos biológicos, e, em especial a produção de H_2 . Entretanto, o H_2 foi detectado apenas após 45 h de ensaio com o hidrolisado, enquanto que no controle a sua presença foi observada desde a primeira hora. Este efeito também foi observado por Quéméneur et al (2012) durante o acompanhamento da produção de H_2 por uma cultura mista em presença de furfural e HMF. Os autores verificaram que a lag fase para a produção de H_2 , nos ensaios nos quais foram adicionados furfural e HMF, foram mais longas do que no controle e atribuíram este efeito à adaptação da cultura mista a estes compostos. No trabalho citado, os autores estudaram o efeito de 1,0 g/L dos potenciais inibidores (separadamente) na produção biológica de hidrogênio por cultura mista, concluindo que o HMF inibiu em 70% e o furfural em 76%. As maiores concentrações de HMF (5 mg/L) e furfural (0,26 g/L) detectadas nos hidrolisados deste trabalho foram mais baixas do que estudadas pelos autores acima citados, entretanto a inibição depende dos microorganismos presentes nas culturas mistas e deve ser estudada caso a caso.

Embora a cultura mista usada nos ensaios de fermentação não tenha permitido a obtenção de resultados mais conclusivos a respeito da produção de H_2 com o pré-hidrolisado do bagaço, estes sugerem que é possível a utilização deste substrato e que as concentrações de inibidores presentes nos hidrolisados não afetaram o processo.

Os hidrolisados obtidos pelos tratamentos combinados (ácido/enzimático) não foram testados para a produção de H_2 , por fermentação, mas acredita-se que estes tenham um potencial ainda maior de produção de H_2 , já que possuem uma maior concentração de ART do que os pré-hidrolisados ácidos.

Poucos trabalhos na literatura relatam a produção de H_2 por cultura mista utilizando hidrolisado de bagaço de cana como substrato. A vantagem em se utilizar cultura mista em relação à cultura pura é que se pode trabalhar sob condições não estéreis, condição bastante desejável em processos industriais, especialmente os que visam à produção de energia a partir de águas residuárias. Por outro lado, o grande desafio em se trabalhar com culturas mistas é a obtenção e manutenção de inóculos enriquecidos em microrganismos com a atividade desejada.

Os trabalhos publicados referentes à produção de H_2 a partir de hidrolisados de materiais lignocelulósicos utilizam, normalmente, culturas puras. Patra et al., (2008) usaram o bagaço de cana como substrato para a produção biohidrogênio, por *Clostridium butyricum*. O hidrolisado foi obtido pelo tratamento com ácido sulfúrico 0,5 % (m/v), por um tempo de 60 minutos a 121°C e a produção de hidrogênio usando este substrato foi 1,73 mol H_2 /L.d .

Cao et al. (2009) estudaram as condições ótimas de hidrólise de sabugo de milho para produção de biohidrogênio com cultura pura *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16, verificando a produção de 3305 ml de H_2 /L a partir do hidrolisado (CAO et al.,2009).

Diferentes materiais lignocelulósicos, incluindo o bagaço de cana, foram utilizados por Herbel et al. (2010) na produção de biohidrogênio sob condições termofílicas com cultura pura de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

Com relação ao uso de culturas mista para a produção de H_2 a partir de hidrolisados de materiais lignocelulósicos pode-se citar o trabalho de Kongjan et al., (2010) que utilizaram hidrolisado de palha de trigo para a produção de H_2 por fermentação escura usando uma cultura mista termófila extrema. O rendimento máximo de hidrogênio, a partir do hidrolisado foi de 318,4 mL de H_2 /g de açúcar.

Fangkum e Reungsamg (2011) utilizaram um hidrolisado de bagaço de cana obtido por H_2SO_4 , 1% (v/v) a 121 °C e 60 min. com uma concentração inicial de ART de 10 g/L. Os autores verificaram um rendimento de produção de H_2 de 1,48 mol H_2 /mol ART consumido, inferior ao controle contendo apenas xilose e arabinose, que foi de 2,49 mol H_2 /mol ART.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com a literatura, o hidrolisado de bagaço de cana parece ser um substrato promissor para a produção de hidrogênio por cultura mista.

5 CONCLUSÕES

Foi possível realizar o pré-tratamento do bagaço de cana com os ácidos clorídrico e fosfórico, sendo que a concentração de ART obtida no pré-tratamento com HCl foi 64 % maior do que a obtida com H_3PO_4 , sob as mesmas condições.

A hemicelulose foi a parte do bagaço que sofreu maior hidrólise pelo pré-tratamento ácido, caracterizada pela presença de xilose em concentrações mais elevadas.

Os potenciais inibidores da produção biológica de H_2 , o furfural e HMF foram obtidos apenas nos hidrolisados com HCl, enquanto que o ácido acético foi obtido nos hidrolisados com HCl e H_3PO_4 , porém as variáveis estudadas não foram significativas para a sua formação nos hidrolisados com H_3PO_4 .

A análise estatística revelou que a temperatura foi a variável de maior influência nos pré-tratamentos ácidos estudados, seguida da concentração do ácido e do tempo para o HCl e do tempo e da concentração de ácido para o H_3PO_4 .

As condições de hidrólise que garantiram a maior obtenção de ART (90°C, 360,00 min e 6,0%) também foram as que os potenciais inibidores apareceram em maiores concentrações.

Tanto o pré-tratamento do bagaço com HCl, quanto com H_3PO_4 foram eficientes em tornar os polissacarídeos do bagaço mais disponíveis à hidrólise enzimática. Entretanto, o pré-tratamento com HCl, seguido do enzimático, liberou uma concentração total de ART, duas vezes maior do que o pré-tratamento com H_3PO_4 seguido do enzimático, nas condições utilizadas neste estudo. A concentração de inibidores totais também foi cerca de duas vezes maior no hidrolisado do bagaço pré-tratado com HCl.

Os resultados dos ensaios de fermentação para a produção de hidrogênio, utilizando o hidrolisado do bagaço como substrato, obtidos na etapa de pré-tratamento com HCl sugerem que é possível a utilização deste substrato e que as concentrações de inibidores não afetaram o processo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y-O. SUSTAINABLE NITROGEN ELIMINATION BIOTECHNOLOGIES: A REVIEW. PROCESS BIOCHEMISTRY, V.41, P 1709-1721, 2006.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M. & NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, Vol. 101, 4851-4861, 2010.

BETANCUR, G.V.J.; PEREIRA, N.J. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electron J Biotechnol*, 13:1-9, 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol* 161:84–92, 2010.

CANILHA L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1467–1475, 2011.

CAO, G.; REN, N.; WANG, A.; LEE, D.J.; GUO, W.; LIU, B.; FENG, Y.; ZHAO, Q.- Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 *international journal of hydrogen energy* 34: 7182 – 7188, 2009.

CAPPELLLETI, B. M.; REGINATTO, V.; AMANTE, E.D.; ANTÔNIO, R.V. Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy* Vol. 36 , 3367-3372,2011.

CARVALHO, J.C.C.; BERTECHINI, A.G.; FASSANI, E.J. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas à base de milho e farelo de soja suplementadas com complexos enzimáticos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.38, n.2, p.292-298, 2009.

CHERNICARO, C.A.L. Reatores Anaeróbios - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. UFMG, v. 5, 2º edição, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_p_ortugues_12_2012.pdf, acesso em 06/12/2012.

DATAR,R.;HUANG,J.;MANESS,P.C.;MOHAGHEGHI,A.;CZERNIK,C.;CHORNE T,E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process.*Int J Hydrogen Energy*, 32 pp. 932–939,2007.

DAS, D.; VERZIROGLU,T. N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1): 13-28, 2001.

DAS, D.; VERZIROGLU,T. N. *Int. J. Hydrogen Energy* 33: 6016–6057, 2008.

DERRINGER, G.; SUICH, R. "Simultaneous Optimization of Several Response Variables," *Journal of Quality Technology*, 12, 4, 214-219, 1980.

DE CASTRO, A.; PEREIRA JR.,N. produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais.*Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

FANGKUM, A.; REUSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36:8687-8696,2010.

GÁMEZ, S.; RAMIREZ, J.A.; GARROTE,G.; VAZQUEZ,M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(13): 4172–4177, 2004.

GEDDES, C.C.; PETERSON, J.J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINIX, M.T.; SHANMUGAN, K.T.; INGRAM, L.O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource Technology*, 101(6):1851-1857, 2010.

GOLLAPALLI, L.E.; DALE B.E.; RIVERS D.M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. *Appl Biochem Biotechnol* 98- 100:23-35,2002.

GÓMEZ, S. M. R.; ANDRADE, R. R.; SANTANDER, C. G.;COSTA, A. C.;MACIEL, F. R. Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis.*Chemical Engineering Transactions*,volume 20,2010.

GURGEL, L. V. A. Hidrólise Ácida de Bagaço da Cana-de-Açúcar: Estudo Cinético de Sacarificação de Celulose para a Produção de Etanol. Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

GONZALEZ-GIL, G.; KLEEREBEZEM, R.; LETTINGA, G. Assessment of metabolic properties and kinetic parameters of methanogenic sludge by on-line methane production rate measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:248–254, 2002.

HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 27:1185–93, 2002.

HAN, S.K.; SHIN, H.S., Enhanced acidogenic fermentation of food waste in a continuous-flow reactor. *Journal of the International Solid Wastes Association*. v. 20, p. 110-118, 2002.

HERBEL, Z.; RAKHELY, G.; BAGI, Z.; IVANOVA, G.; ACS, N.; KOVACS, E.; KOVACS, K.L. Exploitation of the extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in hydrogen and biogas production from biomasses. *Environ. Technol.* 31, 1017-1024, 2010.

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

KADAR, T.D.; VRIJE, G.E.; VAN NOORDEN, M.A.W. ;BUDDE, Z.; SZENGYEL, K.; RECZEY *et al.* Yields from glucose, xylose, and paper sludge hydrolysate during hydrogen production by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* *Appl Biochem Biotechnol*, 113–116 ,pp. 497–508, 2004.

KONGJAN, P; O-THONG, S; KOTAY, M; MIN, B; ANGELIDAKI, I. Biotechnol. Bioeng. Biohydrogen Production From Wheat Straw Hydrolysate by Dark Fermentation Using Extreme Thermophilic Mixed Culture 105: 899–908,2010.

LAOPAIBOON, P. ;THANI A.; LEELAVATCHARAMAS V.; LAOPAIBOON L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. Bioresour Technol. 2010 Feb;101(3):1036-43. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.091,2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J. J.R.; LYND .LR. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresour Technol, 81:33-44,2002.

LEVIN, D.B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. International Journal of Hydrogen Energy;29:173–85,2004.

LEVIN, D.B.; ISLAM, R.; CICEK, N.; SPARLING, R. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates Int J Hydrogen Energy, 31,pp. 1496–1503,2006.

MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production international journal of hydrogen energy 34 (2009) 7404 – 7416.

MATSUMURA, Y.; SASAKI, M.; OKUDA, K.; TAKAMI, S.; OHARA, S.; UMETSU M.; ADSCHIRI, T. Supercritical water treatment of biomass for energy and material recovery. Combust Sci Tech 178:509-536,2006.

MASUI, D.S.; ZIMBARDI, A.L.R.L; SOUZA, F.H.M.; GUIMARÃES, L.H.R.; FURRIEL,R.S.P.M.; JORGE, J.A. Production of a xylose-stimulated b-glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2689–2701,2012.

NOVO NORDISK. Celluclast 1,5 L: ficha técnica. [Curitiba], 3p., 1996.

MILLER, G.L. “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar ;30:785-93,1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; LEE Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores Technol* 96:673–686, 2005.

MUCCILLO, D. Estudos *in Silico* para a Produção Bacteriana de Hidrogênio. 2007.92 Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

NATH, K.; DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*;65:520–9,2004.

NEUREITER, M.; DANNER, H. ; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions *Applied Biochemistry and Biotechnology Vols.* 98–100, 2002.

OGEDA, T. L.; PETRI D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa Quim. Nova, Vol. 36, n7,1549-1558, 2010.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. International Journal of Hydrogen Energy 2008; 33:5256-5265.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues.I. Sugarcane bagasse. Bioresour.Technol. 74, 69–80,2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification Department of Applied Microbiology, Lund University, PO Box 124, 22100 Lund, Sweden, Pages 17–24,2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates.II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, Volume 74, Issue 1, August, Pages 25–33,2000.

QUÉMÉNEUR, M.; HAMELIN, J.; BARAKAT, A.; CARREÈRE, H.; TRABLY, E. Inhibition of Fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures.International Journal of Hydrogen Energy, Volume 37, Issue 4, February, Pages 3150–3159,2012.

RABELO, S.C.; AMEZQUITA , N. A.F; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and bioenergy* 35: 2600-2607,2011.

REN, N.; WANG, A.; CAO, G.; XU, J. & GAO, L. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances*, 27: 1051-1060,2009.

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA W.; POLIKARPOV ,I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*; 4:54,2011.

RODRIGUES, C.P.; CAMARGO, J.A. Bagaço de cana de açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico. São Joaquim da Barra: Colégio Iara Coimbra,2008.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J.H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. M.; SANTOS, F.A. O Combustível “Hidrogênio”. *Educação, Ciência e Tecnologia*, p. 252 a 270, 2007.

SANTOS, V.T.O.; ESTEVES, P.J.; ADRIANE, M.F.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* .38:1089–1098,2011.

SILVA, F.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *QuímicaNova*, v.32, p.661-671, 2009.

SILVA, O. G., Produção de Etanol com a utilização do bagaço de cana de açúcar.Trabalho Graduação,Faculdade de Tecnologia de Araçatuba,2010.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. *Resour Technol*;86:301-304,2003.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219-228, 2003.

SINGH, S. P.; SRIVASTAVA, S. C.; PANDEY, K. D. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.19, p. 437- 440, 1994.

TEIXEIRA, F.A.; VELOSO, C.M.; PIRES, A.J.; SILVA, F.F.; NASCIMENTO, P.V.N. Perdas na ensilagem de capim-elefante aditivado com farelo de cacau e cana-de-açúcar.**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1,p.227-233, 2008.

TÍMAR-BAÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth Heineman,Oxford,UK: Butterworth Heineman,1998.

TORGET, R.W.; KIM, J.S.; LEE, Y.Y. Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fractionation kinetics of hardwood carbohydrates.1. Cellulose hydrolysis. Ind Eng Chem Res 39:2817–2825,2000.

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

UDOP,disponível em <http://www.udop.com.br>, acesso em 02/09/2012.

VALDEZ-VAZQUEZ, I., POGGI-VARALDO, H. M. Hydrogen Production by Fermentative Consortia. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13 1000–1013, 2009.

van HAANDEL, A.C.; LETTINGA, G. Tratamento anaeróbio de esgotos: Um manual para regiões de clima quente, Campina Grande - Paraíba, 240p.,1994.

VAN NIEL, E.W.J.; BUDDE, M.A.W.; DE HAAS, G.G.; VAN DER WALB, F.J. ; CLAASSEN, P.A.M. ; STAMSA, A.J.M. Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. Int J Hydrogen Energy, 27 pp. 1391–1398,2002.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. Int. J. Hydrogen Energy 34: 3313 – 23, 2009.

WANG,X.J.; REN,N.Q.;XIANG,W.S.;GUO W.Q. Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49. Int J Hydrogen Energy, 32 ,pp. 748–754,2007.

WANG, A.J. ; REN, N.Q. ; SHI, Y.J. ; LEE, D.J. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture-*Clostridium acetobutylicum* X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49. Int J Hydrogen Energy, 33, pp. 912–917, 2008.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, cap. 43, 2005.

ZHAO, H.; KWAK, J.H.; ZHANG, Z.C.; BROWN, H.M.; AREY BW, HOLLADAYJE Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. Carbohydr Polym 68:235–241, 2007.

ANEXO 1

Figura 1-Cromatogramas dos padrões de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, na concentração de 1,0g/L

Figura 2-Cromatogramas dos padrões de HMF e furfural na concentração de 1,0 g/L