Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Efeito dos produtos de hidrólise de materiais
lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por
fermentação.**

Marcos Rechi Siqueira

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia Ciência e letras de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: **Química.**

Orientadora: Prof^ª Dr^a Valeria Reginatto Spiller

RIBEIRÃO PRETO

2015

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Efeito dos produtos de hidrólise de materiais
lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por
fermentação.**

Marcos Rechi Siqueira

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Valeria Reginatto Spiller

RIBEIRÃO PRETO

2015

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Siqueira, Marcos Rechi

Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H_2 por fermentação - Ribeirão Preto, 2015.

59 p.: il., 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada a Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Valeria Reginatto Spiller

1. Materiais lignocelulósicos. 2. Inibidores. 3. Efeitos. 4. Produção de H_2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Siqueira, Marcos Rechi

Título: Efeito dos produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por fermentação.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciência e letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: **Química**.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao suporte da minha família, mãe (Edna), Pai (Valdir) e minha irmã (Maria Heloisa) pela paciência, por confiarem em mim e me darem força. Como também entendendo as ausências e enviando suas orações.

Agradeço a minha namorada, pois desde o início desse sonho ela esteve presente sendo a inspiração, o espelho, motivação e principalmente a melhor companhia e amiga que eu poderia querer.

Um agradecimento especial a minha orientadora, Prof.^a Valéria, por ter me acolhido e acreditado. Vejo um profissionalismo e um respeito enorme por quem esta começando. Obrigado pela dedicação.

Agradeço aos amigos do laboratório. Bianca, Bruna, Prof.^a Delia, Fran, Vini, Roberta, as meninas de IC – Larissa, Marcela e a Maraiane. Por todas as horas, sendo estudo, trabalho ou momentos de diversão (principalmente).

Não poderia deixar de agradecer a Mércia, um anjo, pois sem ela o trabalho não seria possível.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1. O H ₂ como um vetor energético	3
3.2. Produção biológica de H ₂	4
3.3. Produção de H ₂ por fermentação.....	6
3.4. Vias bioquímicas de produção de H ₂ por fermentação	8
3.6. Pré-tratamentos e hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	16
3.7. Subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	18
3.7.1. Ácido acético.....	20
3.7.2. Derivados de furano	20
3.7.3. Compostos fenólicos.	22
3.8. Efeito de compostos inibidores sobre a fermentação	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Inóculo.....	26
4.2. Meio de cultura.....	26
4.3. Determinação dos Sólidos Totais e Sólidos Voláteis (ST e SV).....	27
4.4. Ensaio cinéticos de fermentação em batelada.....	27
4.5. Ensaio de produção de H ₂ por fermentação com diferentes concentrações de glicose e xilose	29
4.6. Ensaio de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de inibidores.....	29
4.7. Ensaio de produção de H ₂ por fermentação com hidrolisado de bagaço de cana.	30
4.8. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)	31
4.9. Análise e composição do gás	31

4.10. Análise de monossacarídeos, ácidos orgânicos voláteis e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	32
4.11. Modelagem dos resultados dos ensaios cinéticos de fermentação.	32
4.12. Estimativa da concentração efetiva – CI 50.	33
4.13. Tratamento estatístico dos dados.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1. Ensaios cinéticos de produção de H ₂ com diferentes concentrações de inibidores.....	36
5.2. Estimativa da CI 50.....	44
5.3. Metabólitos solúveis produzidos durante a fermentação.....	47
5.4. Ensaios de fermentação com uma mistura de inibidores.....	50
5.5. Ensaios de produção de H ₂ com um hidrolisado de bagaço de cana.....	55
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO I.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação das etapas do processo de degradação anaeróbia de materiais orgânicos por culturas mistas (SÁ et al, 2014)	7
Figura 2. Vias bioquímicas utilizadas pelo gênero <i>Clostridium</i> sp. para conversão de carboidratos em H ₂ , CO ₂ , ácidos orgânicos e solventes (SINHA; PANDEY., 2011).	9
Figura 3. Via bioquímica da produção de hidrogênio por microrganismos anaeróbios facultativos. (Adaptado de LEE et al., 2011).....	10
Figura 4. Ilustração esquemática da estrutura da Biomassa lignocelulósica. (Adaptado de Menon; Rao., 2012).	12
Figura 5. Esquema de microfibrila de um polímero de celulose, evidenciando regiões cristalina e amorfa. Adaptado de < http://www.barnhardtcotton.net/technology/cotton-properties/ > Acesso 22 de dezembro de 2014.	13
Figura 6. Estrutura mais comum da hemicelulose em materiais lignocelulósicos. Os monômeros numerados de 1 a 4 são: 1) xilose ligada à outra xilose (2) por ligação β (1-4). 2) ligada a xilose (3) por ligações β (1-3) e 2) ligada a glicose por ligação α (2-6). Adaptado de < http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_xylan.html#beta-(1-4)-Xylan > acesso em 23 de dezembro de 2014.	14
Figura 7. Exemplos de duas regiões distintas da lignina, evidenciando parte da sua estrutura, seus monômeros formadores e suas ligações.	15
Figura 8. Representação esquemática do processo de pré-tratamento para produção de Hidrogênio como biocombustível. (Adaptado de ASGHER et al, 2014).	16
Figura 9. Esquema geral das rotas de degradação da Biomassa em sacarídeos e lignina, além de seus produtos de degradação durante o pré-tratamento (adaptado de RASMUSSENA et al, 2014).	19
Figura 10. Estrutura de uma hemicelulose evidenciando suas ligações acetil (1 a 4) e grupos acetilados (5) presentes em alguns açúcares (STÅHLBERG et al, 2011).	20
Figura 11. Formação de 5-HMF a partir da glicose, mecanismo cíclico e acíclico, como também a formação de 5-HMF com isomerização em frutose, cíclico e acíclico.	21
Figura 12. Mecanismos cíclicos e acíclicos sugeridos para formação de furfural a partir da xilose. (Esquema descrito por AHMAD et al., 1995 e ANTAL et al., 1991 e adaptado por RASMUSSENA et al., 2014).	22
Figura 13. Exemplo de um composto intermediário (1) sendo decomposto em monômeros fenólicos, inclusive em Vanilina (2) e Siringaldeído (3).	23
Figura 14. Esquema dos principais inibidores presentes em hidrolisado lignocelulósicos e seus principais efeitos na célula.	25

- Figura 15.** Sistema para a realização de ensaios de fermentação em batelada para a produção de H_2 : 1- Biorreator com a tubulação de saída do gás, 2- Ponto de aborbulhamento de gás argônio, 3- Frasco de segurança e de amostragem de gás, 4-Frasco invertido contendo solução de NaOH 5%, 5- Frasco graduado para recolher o volume de NaOH 5 % deslocado, 6- Cromatógrafo a gás (adaptado de García-Morales et al., 2001)..... 28
- Figura 16.** Ensaios de fermentação para a produção de H_2 com diferentes concentrações de Glicose (A) e Xilose (B) entre 5 a 50 g.L⁻¹. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média. 34
- Figura 17.** Velocidades de produção de H_2 (Rm) em diferentes concentrações de glicose e xilose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média..... 36
- Figura 18.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido acético na presença de 40 g.L⁻¹ de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média..... 37
- Figura 19.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de furfural e glicose 40 g.L⁻¹. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média. 38
- Figura 20.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de 5-hidroximetilfurfural e 40 g.L⁻¹ de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média..... 40
- Figura 21.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de siringaldeído e 40 g.L⁻¹ de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média. 41
- Figura 22.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de vanilina e glicose 40 g.L⁻¹. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média. 42
- Figura 23.** Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido 4-hidroxibenzoico em presença de 40 g.L⁻¹ de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média. 43
- Figura 24.** Velocidade relativa de produção de H_2 em função da concentração do inibidor. Nas figuras é apresentada a equação polinomial de segunda ordem obtida a partir do ajuste dos dados experimentais, calculada pela equação 6 (item 4.12). Na qual o (A) Acido acético, (B) Furfural, (C) HMF, (D) Siringaldeído, (E) Vanilina e (F) Ácido 4-Hidroxibenzoico..... 46
- Figura 25.** Volume de H_2 acumulado em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada na presença de glicose 40 g/L com adição de um único inibidor e um combinação deles. Controle: apenas glicose 40g.L⁻¹; AAc: ácido acético (3260 mg.L⁻¹); 5-HMF (127 mg.L⁻¹) ; SRG (410 mg.L⁻¹)..... 50
- Figura 26.** Taxa de inibição das Velocidades máximas de produção de H_2 nos ensaios em batelada com a adição dos inibidores individualmente e em associação, em relação ao ensaio Controle. 52

Figura 27. Ensaio cinético de produção de H ₂ por fermentação em diferentes ensaios com hidrolisado lignocelulósico.	55
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de produção de hidrogênio a partir das três principais matérias-primas: combustíveis fósseis, água e biomassa. (adaptada de SÁ et al, 2014)	3
Tabela 2. Composição percentual de componentes de diferentes biomassas lignocelulósicas (Adaptada de SÁ et al, 2014; PERERA et al., 2011).....	12
Tabela 3. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido acético.	37
Tabela 4. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações furfural.	39
Tabela 5. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de 5-hidroximetilfurfural..	40
Tabela 6. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de siringaldeído.	41
Tabela 7. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de vanilina.	42
Tabela 8. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H ₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de AHB.	44
Tabela 9. Rendimento da produção de H ₂ e concentração de ácidos orgânicos e etanol nos ensaios de fermentação com a adição de diferentes concentrações dos inibidores	48
Tabela 10. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado, obtidos a partir dos ensaios cinéticos de fermentação para a produção de H ₂ com adição de diferentes concentrações de inibidores individuais e em associação.	51
Tabela 11. Rendimento da produção de H ₂ e concentração de ácidos orgânicos e etanol produzidos durante os ensaios de fermentação com a adição de diferentes inibidores individuais e associados. ...	53
Tabela 12. Valores dos parâmetros do modelo de Gompertz modificado, obtidos a partir dos ensaios cinéticos de fermentação para produção de H ₂ utilizando hidrolisado como substrato.	56
Tabela 13. Concentrações de monossacarídeos e açúcares redutores totais (ART) nos ensaios com hidrolisados	56
Tabela 14. Concentração de inibidores presentes nos ensaios com hidrolisado.....	57

RESUMO

O hidrogênio é uma fonte de energia limpa, pois sua combustão gera apenas água. Porém, ainda há a necessidade de se encontrar soluções tecnologicamente eficientes, econômicas e seguras para sua geração e uso. A produção do H_2 por vias biológicas, conhecido como biohidrogênio, vem ganhando grande destaque nos últimos anos, pois possibilita o uso de materiais renováveis como matéria-prima. Materiais lignocelulósicos são potenciais substratos para a produção de H_2 por fermentação, no entanto se faz necessário dispor de métodos de hidrólise que disponibilizem os componentes destes materiais para a fermentação. A maior parte dos métodos disponíveis para hidrolisar materiais lignocelulósicos resulta em produtos de degradação de carboidratos, que são reconhecidamente inibidores de fermentação. Este estudo, primeiramente, avaliou o efeito de 3 diferentes grupos de inibidores sobre a produção de H_2 por fermentação: (1) ácido orgânico, como o ácido acético; (2) derivados de furano, tais como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF); (3) monômeros fenólicos derivados da lignina, tais como o siringaldeído, vanilina e ácido 4-hidroxibenzóico (AHB). Ensaio de fermentação para a produção de H_2 em batelada utilizaram como inóculo uma cultura mista (lodo) e foram realizados na presença de glicose e diferentes concentrações dos mencionados inibidores. O modelo de Gompertz modificado foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação, como o volume máximo de H_2 (P), velocidade máxima de produção de H_2 (Rm) e o tempo necessário para o início da produção de H_2 (λ). A partir destes ensaios foi verificado como a adição de diferentes concentrações de inibidores afetou tais parâmetros cinéticos em relação a um controle (apenas contendo glicose). Desta forma foi possível estimar as concentrações dos inibidores que reduzem em 50% as velocidades máximas de produção de H_2 – a concentração inibitória 50 (CI 50). Em termos de CI 50, o AHB proporcionou a maior inibição ($0,38 \text{ g.L}^{-1}$), seguido do 5-HMF e o furfural, com valores de CI 50 de $0,48$ e $0,62 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. A vanilina, o siringaldeído e o ácido acético apresentaram os menores efeitos inibitórios sobre a produção de H_2 dentre os inibidores testados, com CI 50 de $0,71$; $1,05$; e $5,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Numa segunda etapa do trabalho foi avaliado o efeito inibitório da associação de 3 inibidores, representantes de cada uma das classes de inibidores, o ácido acético, o 5-HMF e o siringaldeído. Foi observado um efeito aditivo da inibição quando o ácido acético foi adicionado juntamente com o 5-HMF, porém em ensaios contendo siringaldeído o efeito inibitório tornou-se sinérgico. Por fim, foi utilizado um hidrolisado de bagaço de cana de açúcar como substrato na produção de H_2 por fermentação. A produção de H_2 a partir deste

substrato só foi possível após o tratamento do hidrolisado com carvão ativado. Portanto, concluiu-se que os compostos inibitórios presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos condicionam a viabilidade da produção de H_2 com estes materiais. Este estudo permitiu concluir que os compostos estudados, exceto os monossacarídeos, resultantes da hidrólise de materiais lignocelulósicos, inibem a produção de H_2 pela cultura mista utilizada em diferentes graus, sendo o AHB o mais inibidor. A combinação de compostos inibidores potencializa ainda mais o efeito inibitório sobre a produção de H_2 . O ácido acético, que pode se originar dos hidrolisados, mas que também é um metabólito da produção de H_2 por fermentação aumentou ainda mais a inibição do siringaldeído. Assim, sugere-se que a hidrólise de materiais lignocelulósicos deve ser conduzida de forma a minimizar a presença dos inibidores nos hidrolisados, a fim de maximizar o aproveitamento da biomassa lignocelulósica como matéria-prima no processo fermentativo.

Palavras Chaves: Materiais Lignocelulósicos, hidrólise, inibidores, produção de H_2 .

1. INTRODUÇÃO

A atual economia e desenvolvimento industrial mundial são dependentes de combustíveis fósseis. Isso tem levado a um exagerado consumo desses recursos não renováveis, causando rápido esgotamento das reservas e sérios problemas ambientais pela sua queima (KAPDAN; KARGI., 2006). Assegurar a geração de energia, com as devidas precauções em relação ao meio ambiente, tem sido um dos mais relevantes desafios atuais (SÁ et al., 2014)

O hidrogênio vem sendo proposto como um vetor energético ambientalmente correto, pois sua combustão gera apenas água, e como potencial substituto para os combustíveis fósseis (PERERA et al., 2012). A grande questão sobre o hidrogênio como uma fonte de energia limpa é a maneira como é produzido. Atualmente, o hidrogênio é obtido quimicamente pelo processamento de petróleo ou do carvão mineral, compreendendo 90% da produção atual (DAS; VEZIROGLU. 2008). O H_2 também pode ser obtido por processo eletroquímico. Entretanto, tais métodos de obtenção de H_2 consomem combustíveis fósseis e/ou uma grande quantidade de energia, tornando a sua produção não sustentável.

Mais recentemente a obtenção de H_2 por via biológica tem sido estudada, uma vez que os processos biológicos, na maioria das vezes, são operados à temperatura e pressão ambiente, demandando menos energia, além de possibilitarem a utilização de matérias-primas renováveis ricas em carboidratos. Os estudos sobre a produção de H_2 por via biológica, também conhecido como biohidrogênio, têm sido focados na biofotólise de água, usando algas (biofotólise direta) e cianobactérias (biofotólise indireta), foto-decomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintetizantes e a fermentação de compostos orgânicos por bactérias fermentadoras (ZHANG et al., 2007). Dentre os sistemas biológicos para a produção de H_2 , a fermentação tem se destacado, devido principalmente sua maior eficiência quando comparada aos outros processos biológicos e a possibilidade de utilização de diferentes materiais renováveis, tais como resíduos agroindustriais, como substrato (SÁ et al., 2014). Portanto, o desenvolvimento de tecnologias para a produção biológica de H_2 a partir de resíduos agroindustriais é uma área bastante promissora.

A grande maioria dos resíduos agroindustriais constituem-se de materiais lignocelulósicos. Estes materiais têm sido vistos com grande interesse para serem utilizados, após a sua hidrólise, como substrato em diversos processos biotecnológicos, sendo a produção de etanol a mais estudada, conhecida como etanol de segunda geração (OGEDA; PETRI.,

2010). No Brasil, o principal material lignocelulósico de interesse é o bagaço de cana de açúcar, já que o país é um dos maiores produtores de cana do mundo (ZANIN et al., 2000).

Mais recentemente, hidrolisados de materiais lignocelulósicos também vem sendo estudados como substratos para a produção biológica de H_2 (DE VRIJE et al., 2003; DATAR et al., 2007; NTAIKOU et al., 2009). Entretanto, a utilização destes materiais no processo fermentativo pressupõe uma etapa de hidrólise e/ou pré-tratamento para a disponibilização dos carboidratos contidos na matriz lignocelulósica. Hidrólises com diferentes ácidos diluídos são os métodos mais utilizados e são particularmente eficientes para converter a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis e posteriormente em H_2 . Porém, as condições de hidrólise impostas aos materiais podem resultar não apenas em açúcares fermentáveis, mas também em subprodutos indesejáveis. Estes subprodutos podem se originar da degradação de pentoses tais como o furfural, e de hexoses, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e o ácido acético, além de compostos fenólicos oriundos da degradação da lignina (MONLAU et al., 2013). Os efeitos inibitórios destes compostos já foram extensivamente investigados sobre a produção de etanol de segunda geração, e em menor escala na produção de metano, mas pouco se conhece a respeito da inibição destes compostos sobre os microrganismos fermentativos produtores de H_2 (BARAKAT et al., 2012; BADSHAH., 2012).

Para o desenvolvimento e a implementação de processos sustentáveis, capazes de converter materiais lignocelulósicos em H_2 , é necessário conhecer os efeitos que os compostos derivados de hidrólise de materiais lignocelulósicos causam sobre os microrganismos produtores de H_2 . Neste sentido, este trabalho visou estudar o efeito de derivados de hidrólise de materiais lignocelulósicos, sobre a produção biológica de hidrogênio por uma cultura mista de microrganismos.

Além disso, foi investigado o efeito conjunto de alguns desses inibidores, a fim de verificar o efeito destes compostos em um sistema complexo, tal como os hidrolisados de materiais lignocelulósicos.

Por fim, um hidrolisado de bagaço de cana, obtido sob condições estudadas em trabalhos anteriores realizados por este grupo de pesquisa, foi utilizado como substrato para a produção de H_2

Essas investigações abrem caminho para a utilização de materiais lignocelulósicos na produção biológica de hidrogênio.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o efeito de derivados de hidrólise de materiais lignocelulósicos, tais como monossacarídeos e de alguns compostos, supostamente inibidores de fermentação, presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos, sobre a produção biológica de H_2 por uma cultura mista de microrganismos.

2.1. Objetivos específicos

- Obter e cultivar uma cultura mista enriquecida em microrganismos produtores de H_2 sob condições de laboratório.
- Estimar parâmetros cinéticos de produção de H_2 pela cultura mista em diferentes concentrações dos principais monossacarídeos constituintes de hidrolisados lignocelulósicos, a xilose e a glicose.
- Estudar o efeito de potenciais inibidores de fermentação presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos pertencentes a três diferentes classes de inibidores, tais como o ácido acético, representante dos ácidos orgânicos, o 5-HMF e o furfural, como derivados de furanos e compostos fenólicos, tais como o siringaldeído, a vanilina e o ácido 4-hidroxibenzóico, sobre a produção biológica de H_2 por cultura mista;
- Investigar os principais metabólitos solúveis formados pela cultura mista produtora de H_2 na presença e ausência dos inibidores de fermentação;
- Estudar o efeito conjunto dos compostos inibidores sobre a produção biológica de H_2 pela cultura mista;
- Verificar a possibilidade do uso de um hidrolisado ácido de bagaço de cana como substrato para a produção de H_2 por fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O H₂ como um vetor energético

O hidrogênio pode ser utilizado diretamente para a geração de energia elétrica, em células a combustível, ou como combustível em motores de queima interna (DAS; VEZIROGLU., 2008). Nesse contexto, o H₂ é extremamente interessante, visto que a sua combustão direta e completa gera apenas vapor de água ($H_2 + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow H_2O$) (MATHEWS; WANG., 2009). Além disso, o H₂ apresenta uma elevada densidade energética, por volta de 142 kJ.g⁻¹, três vezes maior do que a da gasolina e do diesel e aproximadamente 4,5 vezes maior que a do etanol (BALAT; KIRTAY., 2011)

Devido a sua natureza altamente reativa o hidrogênio não existe em seu estado livre na natureza, mas sempre é encontrado combinado a outros elementos. Sua extração envolve alta quantidade de energia e sofisticado processamento químico (CHAUBEY et al., 2013). Os métodos de sua obtenção podem ser classificados em três categorias: termoquímico, eletroquímico e métodos biológicos ou classificados em função das principais matérias-primas, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Métodos de produção de hidrogênio a partir de três principais matérias-primas: combustíveis fósseis, água e biomassa. (adaptada de SÁ et al, 2014)

Matéria-prima	Métodos
Combustíveis fósseis	Reforma do gás natural
	Oxidação parcial de hidrocarbonetos
	Gaseificação do carvão
Água	Eletrólise da água
Biomassa	Processos biológicos
	Gaseificação da biomassa
	Reforma a vapor do etanol
	Reforma em fase líquida

Estima-se que a reforma do gás natural contribua com cerca de 40% do hidrogênio produzido, tal processo geralmente ocorre à temperatura de 800 a 1000°C e em pressões de 13 a 20 bar (MAYORGA et al., 1997). Este processo consiste em forçar a passagem do gás natural e vapor de água por um catalizador para gerar H₂ e CO₂, conforme descrito pelas reações a seguir.

A oxidação de hidrocarbonetos pesados representa por volta de 30% da produção mundial de H_2 , o processo ocorre em temperaturas que variam de 1300 a 1500°C, pressões de 30 a 100 bar e consiste na reação do hidrocarboneto com quantidades limitantes de oxigênio sem a necessidade de catalizador (WANG et al., 2012). A gaseificação do carvão, com 18% da produção mundial, consiste na decomposição térmica dessa matéria-prima na presença de água resultando na produção de H_2 e uma mistura de outros gases (STAŃCZYK et al., 2012). Por fim, a eletrólise da água que contribui com 5% da produção mundial, consiste em circular uma corrente elétrica contínua através da água para separar as moléculas em H_2 e O_2 . Entretanto, este processo demanda muita energia (URSÚA et al., 2012; MAZLOOMI et al., 2012; DAS; VEZIROGLU., 2008).

Mais recentemente, a produção biológica tem sido considerada como uma alternativa para a obtenção de H_2 , mas ainda contribui com menos de 1% da sua produção total. Dentre as formas de obtenção de H_2 apresentadas, salva a produção biológica, todas utilizam combustíveis fósseis de maneira direta ou indireta.

O desenvolvimento de tecnologias para a produção biológica de hidrogênio é uma área bastante promissora, logo se espera que a parcela na produção total cresça exponencialmente com o desenvolvimento de novas técnicas e processos (MENON; RAO., 2012).

Os processos de obtenção de hidrogênio por via biológica, em sua grande maioria são operados à temperatura e pressão ambiente e ainda tem como vantagem a possibilidade de utilização de fontes renováveis como matéria-prima, bem como o reaproveitamento de materiais residuais, diminuindo assim a quantidade de resíduos sem a destinação correta (KOTAY; DAS., 2008).

3.2. Produção biológica de H_2

O hidrogênio pode ser obtido por via biológica pelos seguintes processos: biofotólise direta da água, realizada por algas verdes, biofotólise indireta da água por cianobactérias, fotofermentação de compostos orgânicos por meio de bactérias fotossintéticas, fermentação de compostos orgânicos através de bactérias fermentativas (KIRTAY., 2011; DAS; VEZIROGLU., 2008)

A biofotólise direta da água é realizada por algas verdes, resultando na decomposição da água em H_2 pela ação da energia luminosa sobre o sistema biológico. As microalgas verdes utilizam energia luminosa para gerar elétrons que são captados pela ferredoxina. A enzima hidrogenase combina os prótons (H^+) do meio com elétrons doados pela ferredoxina reduzida para formar H_2 . A biofotólise direta tem como grande vantagem a obtenção de H_2 a partir de água. Porém, como desvantagem pode-se destacar a necessidade de iluminação constante e total ausência de O_2 , já que esta molécula, produto da própria fotossíntese da alga, inibe as hidrogenases (KIM et al, 2010; RAN et al., 2009).

Já a biofotólise indireta, tipicamente realizada por cianobactérias, utiliza a energia armazenada nos carboidratos oriundos da fotossíntese para gerar hidrogênio a partir da água. Estes microrganismos podem tanto fixar N_2 , como produzir H_2 pela ação das nitrogenases. Como desvantagens, assim como na biofotólise direta, o processo apresenta a necessidade de iluminação constante o que demanda modificações em biorreatores para maximizar a utilização da energia solar. Outra desvantagem é a elevada demanda de ATP para a atividade da nitrogenase e o gás produzido apresenta elevada concentração de CO_2 (SÁ et al., 2014).

A fotofermentação é realizada por bactérias púrpuras não sulfurosas que utilizam a energia luminosa para transformar ácidos orgânicos em H_2 e CO_2 . Esse processo tem como vantagem a possibilidade de utilização de diferentes resíduos e efluentes contendo carboidratos como potenciais substratos e pode utilizar amplo espectro de luz, porém, como nos métodos supracitados, também necessita de iluminação constante (SUWANSAARD et al., 2010 ; KAWAGOSHI et al., 2010).

Por fim, o processo de fermentação, também conhecido como fermentação escura para diferenciar dos outros que dependem da presença de luz, envolve bactérias anaeróbias estritas ou facultativas que convertem carboidratos em ácidos orgânicos, CO_2 e H_2 . Quando comparado aos outros processos biológicos, a produção de H_2 por fermentação escura tem despertado grande interesse devido principalmente as suas elevadas velocidades e alta eficiência de produção (NIU et al., 2010). A obtenção de H_2 por bactérias fermentativas permite uma geração contínua e sustentada do combustível, uma vez que não há inibição pela ausência de iluminação. Além disso, os microrganismos fermentativos são mais eficazes na produção de hidrogênio em um curto intervalo de tempo quando comparados aos microrganismos responsáveis pelos outros processos já descritos (SÁ et al., 2014).

3.3. Produção de H₂ por fermentação

Os processos que visam à produção de H₂ por fermentação podem utilizar culturas puras ou culturas mistas de microrganismos. No caso de culturas puras, os principais microrganismos produtores de H₂ são bactérias fermentativas facultativas e anaeróbias estritas, que serão vistas com mais detalhes no próximo item.

Culturas mistas apresentam vantagens em relação às culturas puras, pois em processos biológicos que visam à obtenção de um combustível em grandes quantidades, o controle e a operação do processo são facilitados pela possibilidade de utilização de meios não estéreis, refletindo na produção e no custo global.

Portanto, a maioria dos estudos relacionados ao desenvolvimento de processos de obtenção de biohidrogênio utilizam culturas mistas (O-THONGA et al, 2011; SEM; SUTTAR., 2012; PHOWANA; DANVIRUTAI., 2014; SHANMUGAMA et al., 2014). As fontes de culturas mistas ou consórcios de microrganismos mais comumente utilizados como inóculos na produção de H₂ por fermentação são, principalmente lodos formados em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes (DONGA et al., 2009), solos (CHAGANTIA et al., 2012; SARAPHIROMA; REUNGSANG., 2011), dejetos de animais (SARIPANA; REUNGSANG., 2014), chorume (ZHU et al., 2015), entre outros. Quando se utiliza culturas mistas destas origens pressupõe-se a presença de microrganismos anaeróbios estritos, tais como os *Clostridium* sp. ou facultativos, como *Enterobacter* sp, potenciais produtores de H₂.

Entretanto, muitas vezes é necessário lançar mão de métodos de enriquecimento destas culturas mistas, que visam o aumento da população dos microrganismos produtores de H₂ em detrimento dos consumidores de H₂, tais como as arqueas metanogênicas, bactérias redutoras de nitrato e sulfato e as bactérias homoacetogênicas (SEM; SUTTAR., 2012). A aplicação de calor, adição de compostos químicos, alteração extrema do pH e o uso de radiação são alguns dos métodos de enriquecimento de culturas mistas citados na literatura (SINGH; WAHID., 2015). O calor, ou seja, o tratamento térmico das culturas mistas tem sido descrito com mais frequência, por se tratar de um método simples e eficaz para o enriquecimento de culturas mistas em bactérias produtoras de H₂ (LAY et al., 2012; LIN et al., 2012; KANG et al., 2012). A aplicação de elevadas temperaturas às culturas mistas pressupõe que, sob estas condições, as bactérias do gênero *Clostridium* sp., o mais frequentemente relacionado à produção de H₂, esporulem, enquanto gêneros não produtores de H₂ não sobrevivam às elevadas temperaturas. Portanto, a grande maioria dos trabalhos que utilizam cultura mista para a produção de H₂,

submete o inóculo a algum método de enriquecimento, sendo o tratamento térmico o mais comum.

A degradação anaeróbia de materiais orgânicos por culturas mistas (biodigestão ou digestão anaeróbia) e a produção de H_2 por fermentação escura possuem várias etapas em comum, portanto é necessário entender as etapas que compõe a degradação anaeróbia de materiais orgânicos, para contextualizar a produção de H_2 por culturas mistas.

A digestão anaeróbia consiste em um processo biológico no qual diferentes tipos de microrganismos promovem a transformação de compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, tais como ácidos orgânicos voláteis (ácidos acético, butírico e lactato), álcoois (etanol, butanol) e alguns gases, o H_2 , CO_2 e CH_4 (LAKANIEMI et al, 2013). Esse processo é desenvolvido em quatro etapas principais, mediadas por diferentes grupos de microrganismos, quais sejam: a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese, conforme apresentado na figura 1.

Figura 1. Representação das etapas do processo de degradação anaeróbia de materiais orgânicos por culturas mistas (SÁ et al, 2014)

Na primeira etapa, bactérias hidrolíticas produzem enzimas extracelulares que promovem a degradação dos materiais mais complexos em materiais mais simples e solúveis, os quais são permeáveis às membranas das bactérias fermentativas. Na fase acidogênica, os produtos solúveis são metabolizados no interior das células, sendo convertidos em compostos mais simples, tais como ácidos orgânicos de cadeia curta, álcoois e novas células bacterianas.

As bactérias fermentativas acetogênicas promovem a oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica resultando em H_2 e ácido acético. Estas moléculas são disponibilizadas para as arqueas metanogênicas. Alternativamente, nesta etapa do processo, o H_2 pode também ser convertido em ácido acético pelas bactérias homoacetogênicas. Esses microrganismos são consumidores de hidrogênio e na presença de CO_2 produzem acetato como fonte de carbono. Na última etapa do processo, o H_2 é consumido pelas metanogênicas hidrogenotróficas para reduzir o CO_2 e formar o metano, e o ácido acético é convertido em CH_4 e CO_2 pelas metanogênicas acetoclásticas. Portanto, a necessidade em se eliminar ou reduzir a população das arqueas metanogênicas e das bactérias homoacetogênicas em culturas mistas reside no fato de serem consumidoras de H_2 . Outra dificuldade é em relação às bactérias que reduzem nitrato e sulfato. Na presença de sulfato e nitrato no meio fermentativo, as bactérias nitrato-redutoras (BNR) e as bactérias sulfato-redutoras (BSR) são capazes de utilizar o H_2 para formação de amônia e sulfeto, respectivamente (SÁ et al, 2014). Portanto, a produção de H_2 por culturas mistas contempla as primeiras etapas do processo de degradação anaeróbia de materiais orgânicos, sendo que a etapa da metanogênese deve ser suprimida.

3.4. Vias bioquímicas de produção de H_2 por fermentação

A fermentação é um processo que visa, principalmente, a manutenção do equilíbrio redox dentro da célula por meio da reoxidação de equivalentes redutores, tais como coenzimas reduzidas, para a produção de ATP na ausência de oxigênio. A oxidação dos substratos fornece energia metabólica para o crescimento e a reprodução da célula, gerando elétrons que precisam ser eliminados. A produção de H_2 por fermentação ocorre em condições anaeróbias, realizada por microrganismos heterotróficos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, conforme será descrito mais adiante. Em ambientes aeróbios, o oxigênio é reduzido e água é formada como produto, já em ambientes anaeróbios outros compostos atuam como aceptores de elétrons, assim prótons podem ser reduzidos a hidrogênio molecular (KRISHNA, 2013).

Os microrganismos anaeróbios estritos produtores de H_2 mais frequentemente descritos na literatura são linhagens mesofílicas do gênero *Clostridium* sp., além do *Thermoanaerobacterium* sp., *Thermotoga* sp., *Anoxybacillus* sp. que são termofílicos. Como pode ser observado na Figura 2, em microrganismos estritamente anaeróbios, como os do gênero *Clostridium*, o piruvato, produto da glicólise, é convertido a acetil-CoA e CO_2 , pela enzima piruvato-ferredoxina oxidoredutase (PFOR). A oxidação do piruvato necessita da

ferredoxina para a síntese de H_2 . A transferência dos elétrons da ferredoxina reduzida aos prótons para a formação de H_2 é catalisada pela enzima hidrogenase. Este processo resulta em um rendimento máximo de 2 moles de H_2 por mol de glicose consumida (SINHA; PANDEY, 2011). Outros 2 moles de H_2 podem ser formados a partir da re-oxidação do NADH produzido durante a glicólise. O NADH também pode transferir seus elétrons à ferredoxina por intermédio da enzima NADH-ferredoxina oxidorreductase (NFOR). Entretanto, na prática rendimentos bem menores são alcançados, pois a oxidação de NADH pela NFOR, apenas ocorre em baixas pressões parciais de H_2 (VALDEZ-VAZQUEZ; POGGI-VARALDO, 2009; SINHA; PANDEY, 2011). Como o NADH também pode ser reoxidado em outras vias do metabolismo com a formação de butirato, lactato e etanol, o rendimento teórico de H_2 depende dos metabólitos formados. O rendimento máximo teórico de hidrogênio, de 4 moles de H_2 por mol de glicose, é alcançado apenas quando acetil-CoA é totalmente convertida a acetato ao final da fermentação, conforme reação apresentada na equação 3.

Porém, quando o butirato é o produto final da reação (equação 4) o rendimento máximo teórico de hidrogênio é de 2 mols de H_2 por mol de glicose.

Figura 2. Vias bioquímicas utilizadas pelo gênero *Clostridium* sp para conversão de carboidratos em H_2 , CO_2 , ácidos orgânicos e solventes (SINHA; PANDEY., 2011).

As vias que formam lactato e etanol, por exemplo, competem com as vias de formação de H_2 por equivalentes redutores ($NADH$), diminuindo o rendimento de H_2 quando há a produção desses intermediários na fermentação (HAWKES et al., 2002; SCHARA et al., 2008; LEE et al., 2011).

A figura 3 apresenta a via metabólica de produção de H_2 por fermentação por microrganismos anaeróbios facultativos, especialmente membros da família *Enterobacteriaceae*, tais como os gêneros *Escherichia* sp. *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. (ELSHARNOUBY et al., 2013), *Bacillus* sp., e *Pseudomonas* sp. (KHANNA et al., 2012), entre outras. Tais gêneros podem metabolizar o piruvato a ácido fórmico e outros produtos – processo muitas vezes chamado de fermentação do ácido fórmico. Tal como os anaeróbios estritos esses organismos necessitam dispor o excesso de elétrons produzidos durante a fermentação, dessa forma ocorre a eventual formação de hidrogênio molecular.

Em condições anaeróbias e na ausência de aceptores finais o ácido fórmico é degradado a CO_2 e H_2 por meio de um complexo enzimático especializado. O piruvato primeiramente é convertido a formiato e acetil-CoA pela piruvato-formiato-liase (figura 2, enzima 1), posteriormente o formiato é convertido a CO_2 e H_2 pelo completo enzimático denominado formiato-hidrogeno-liase (figura 2, enzimas 2 e 3) (HALLENBECK; GHOSH., 2012).

Figura 3. Via bioquímica da produção de hidrogênio por microrganismos anaeróbios facultativos. (Adaptado de LEE et al, 2011)

Em alguns casos parte do piruvato é convertido a 2,3-butanodiol às custas de NADH. Sabe-se que para anaeróbios facultativos, diferente dos anaeróbios restritos, o NADH dificilmente é utilizado para a produção de H_2 , pois há uma série de caminhos alternativos ou há ausência de aparato enzimático específico, tal como a ferredoxina. Em comparação com culturas anaeróbias estritas o rendimento em H_2 é menor, geralmente inferior a $2 \text{ mol}_{H_2} \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ (LEE et al., 2011).

Diferentes linhagens vêm sendo utilizadas para a produção de H_2 a partir dos mais diferenciados substratos. As vantagens da utilização de culturas puras estão relacionadas à seletividade do substrato, aos elevados rendimentos de H_2 e ao reduzido número de subprodutos. Porém, culturas puras são mais sensíveis à contaminação, implicando o emprego de condições assépticas e aumento do custo do processo. Já a utilização de culturas mistas para processos em grande escala é considerada mais adequada devido ao simplificado controle e operação do processo, facilitado pela utilização de meios não estéreis, contribuindo para diminuição do custo global (NTAIKOU et al., 2010).

3.5. Materiais lignocelulósicos como substratos para a produção de H_2 por fermentação.

Embora as características da fermentação para a produção de H_2 a elejam como a alternativa mais promissora, essa tecnologia ainda não compete com os processos que utilizam combustíveis fósseis em termos de custos, eficiência de produção e confiabilidade (LEE et al., 2011). Inúmeros esforços vêm sendo realizados no sentido de tornar a produção de H_2 por fermentação mais atrativa. Nesse sentido, materiais residuais têm sido utilizados como substratos na produção de H_2 , tais como resíduos alimentícios industriais (PHOWAN et al., 2010; CAO et al., 2012; CHENG; LIU., 2012; ZHAO et al., 2012; LIU et al., 2013), e domésticos (PEIXOTO et al., 2011; OZKAN et al., 2011; RUGGERI; TOMMASI., 2012) a fim de promover a diminuição de custos, além de uma destinação mais adequada a esses resíduos.

No cenário brasileiro e também mundial os resíduos que merecem destaque são os materiais lignocelulósicos, oriundos principalmente de agroindústrias, tal como o bagaço de cana (PATTRA et al., 2008; FANGKUM; REUNGSANG., 2011; LO et al., 2011), o farelo de soja, a palha e o sabugo de milho (CAO et al., 2009; ZHANG et al., 2007; HAN et al., 2012).

3.5.1. Estrutura e composição de materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica ou materiais lignocelulósicos, tais como os resíduos agrícolas, resíduos florestais, gramíneas e materiais lenhosos, são constituídos principalmente de três polímeros: a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja estrutura está apresentada na figura 4. Dentre os componentes desses polímeros a celulose e a hemicelulose são polissacarídeos possíveis de serem fermentados, após tratamento adequado, o que torna a biomassa lignocelulósica uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis (ZHENG et al., 2014).

Figura 4. Ilustração esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Menon; Rao., 2012.

Em geral, a composição da biomassa lignocelulósica varia conforme sua origem e variabilidade genética entre diferentes fontes, tal perfil pode ser confirmado pelas informações apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Composição percentual de componentes de diferentes biomassas lignocelulósicas (Adaptada de SÁ et al, 2014; PERERA et al., 2011)

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de Cana	32-48	19-24	23-32
Palha de Cana	40-44	30-32	22-25
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Palha de arroz	40-43	24-26	14-16
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha da cevada	31-45	27-38	14-19

A celulose é um importante componente estrutural da parede celular das plantas e é responsável pela resistência mecânica. O papel da hemicelulose é garantir a integridade da estrutura como um todo, já a lignina confere rigidez e resistência a ataques microbiológicos (MENON; RAO., 2012).

A celulose é um polímero constituído por monômeros de glicose, compondo cadeias lineares de até 12.000 resíduos. Os monômeros são ligados por ligações β (1-4), estabilizados por meio de ligações de hidrogênio intermoleculares, mas também possui uma forte tendência em formar ligações de hidrogênio intramoleculares, fato que contribui para o aumento da rigidez da celulose e a faz altamente insolúvel e resistente a maior parte dos solventes orgânicos (ANWARA et al., 2014). As ligações glicosídicas e de hidrogênio formam uma associação de microfibrilas altamente organizadas denominada de região cristalina da celulose. No entanto, quando essa organização é depreciada de alguma forma (sendo por água ou pela presença de proteínas) a disposição cristalina é perdida, dando lugar à chamada região amorfa, a qual é estabilizada não mais por ligações de hidrogênio, mas sim por ligações mais fracas, do tipo Van der Waals (ENDLER; PERSSON., 2011; FERNANDES et al., 2011).

Como pode ser observado na figura 5, a estrutura da celulose é ordenada de modo que as regiões cristalinas são intercaladas com regiões amorfas, sendo que essa corresponde de 5 a 20% do total da microfibrila. Devido a sua estrutura a região amorfa é mais susceptível à hidrólise (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL., 2013; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010).

Figura 5. Esquema de microfibrila de um polímero de celulose, evidenciando regiões cristalina e amorfa. Adaptado de <<http://www.barnhardtcotton.net/technology/cotton-properties/>> Acesso 22 de dezembro de 2014.

A hemicelulose é um termo generalista e é usado para referir-se a um grupo de polissacarídeos de cadeia ramificada de baixa massa molecular, constituídos principalmente de pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetil (HARMSEN et al., 2010). As hemiceluloses (figura 6) são depositadas de maneira intercala às microfibrilas de celulose, conferindo elasticidade e flexibilidade ao agregado (AGUIAR., 2010). Ao contrário da celulose, as hemiceluloses têm uma combinação aleatória de monossacarídeos incluindo principalmente pentoses (β -D-xilose, β -L-arabinose), hexoses (β -D-glicose, β -D-manose, β -D-galactose) e ácidos urônicos (GHAFAR & FAN., 2013).

Figura 6. Estrutura mais comum da hemicelulose em materiais lignocelulósicos. Os monômeros numerados de 1 a 4 são: 1) xilose ligada à outra xilose (2) por ligação β (1-4). 2) ligada a xilose (3) por ligações β (1-3) e 2) ligada a glicose por ligação α (2-6). Adaptado de <[http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_xylan.html#beta-\(1-4\)-Xylan](http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_xylan.html#beta-(1-4)-Xylan)> acesso em 23 de dezembro de 2014.

As mais relevantes hemiceluloses são as xilanas e glicomanamas, sendo a primeira a mais abundante. Esse polissacarídeo é constituído a partir de unidades, predominantemente, β -D-xilose ligados à glicose, conforme apresentado na figura 6. Devido a essa configuração ramificada a estrutura se torna irregular, conferindo ausência de cristalinidade, motivo pelo qual a hemicelulose absorve água facilmente, aumentando a flexibilidade do agregado e podendo diminuir a recalcitrância do polímero (ANWARA et al., 2014).

A lignina é a menor fração da biomassa lignocelulósica, porém a mais complexa. É uma macromolécula tridimensional, amorfa e altamente ramificada (GHAFAR; FAN., 2013). A lignina tem cadeia longa constituída essencialmente por unidades fenilpropânicas e inúmeros grupos aromáticos e alifáticos ligados, predominantemente, por meio de ligações éster (ANWARA et al., 2014).

É apresentado na literatura que, possivelmente, tal polímero seja formado por meio da condensação oxidativa de monômeros precursores primários, tais como álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sináptico (GHAFAR; FAN., 2013; ANWARA et al., 2014, HAMELINCK et al., 2005)

Devido à complexidade estrutural da lignina é difícil chegar a um modelo para sua estrutura química, um exemplo de parte da estrutura é apresentado na figura 7.

Figura 7. Exemplo de um modelo estrutural da lignina, evidenciando parte da sua estrutura, seus monômeros formadores e suas ligações.

A lignina é o principal material estrutural que confere resistência e rigidez à parede celular, também é o mais resistente a ataques biológicos do que os outros dois polímeros, anteriormente citados que compõem a biomassa lignocelulósica (GHAFFAR; FAN., 2013).

As propriedades da biomassa lignocelulósica, tais como as apresentadas anteriormente, tornam os carboidratos fermentáveis presentes na sua composição indisponíveis, ou seja, resistentes à biodegradabilidade. Deste modo, estratégias são necessárias a fim de disponibilizar esses carboidratos, surgindo nesse sentido o conceito de pré-tratamento da biomassa.

3.6. Pré-tratamentos e hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Os pré-tratamentos são realizados a fim de alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica, tais como o aumento da área superficial, aumento da porosidade, redução da cristalinidade da celulose e despolimerização parcial da hemicelulose de modo que ácidos, álcalis ou enzimas possam acessar as microfibrilas e hidrolisá-las em monômeros fermentáveis, conforme apresentado pela figura 8 (HARMSSEN et al., 2010; BRODEUR et al., 2011).

Figura 8. Representação esquemática de um pré-tratamento de material lignocelulósico para produção de H₂ como biocombustível. Adaptado de ASGHER et al, 2014.

Os pré-tratamentos têm como principal objetivo o aumento da biodegradabilidade de materiais lignocelulósicos (BEHERA et al., 2014). Embora seja um processo caro, garante melhoria na eficiência do processo e a longo prazo uma redução dos custos totais de produção (MIRAHMADI et al., 2010).

Os métodos de pré-tratamentos podem ser divididos em diferentes categorias, tais como: físico, físico-químico, biológico e químico. Podendo ser aplicados individualmente ou uma combinação entre eles (BEHERA et al., 2014).

Pré-tratamentos físicos são métodos que não utilizam produtos químicos ou microrganismos durante o processo e tem como objetivo principal a redução da partícula lignocelulósica levando a um aumento da área superficial, visando um posterior aumento do desempenho das enzimas hidrolíticas (MOOD et al., 2013). Diferentes tipos de processos físicos são utilizados, tais como a moagem, trituração ou mesmo irradiação (ZHU., 2011)

Os pré-tratamentos que combinam processos físicos e químicos são importantes na dissolução da porção hemicelulósica e alteração da estrutura da lignina, promovendo uma maior acessibilidade às enzimas (ZHENG et al., 2014). Essa categoria inclui grande parte dos métodos de pré-tratamentos, como a explosão a vapor, hidrotermólise (LHW), explosão da fibra por amônia (AFEX), oxidação úmida, percolação da amônia recirculada, uso de solventes orgânicos e explosão com CO₂ (MOOD et al., 2013).

O processo de pré-tratamento biológico consiste, geralmente, em usar fungos capazes de produzir enzimas com capacidade de degradar a lignina, hemicelulose e polifenóis. Esse processo possui vantagens sob os pré-tratamentos físicos e físico-químicos, pois são específicos ao substrato, apresentam altos rendimentos, não geram compostos tóxicos e demandam menos energia (RIA-MILLATI et al., 2011; SARITHA et al., 2012). No entanto, como desvantagem é um processo lento e requer cuidadoso controle. Além disso, a maioria dos microrganismos que excretam enzimas lignocelulolíticas também consomem hemicelulose e celulose (BEHERA et al., 2014).

Várias espécies de fungos são reportadas na literatura por apresentarem alta eficiência de deslignificação, tais como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerate*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* (NALLAPETA et al., 2012)

A técnica mais extensivamente utilizada para a disponibilização dos carboidratos da matriz lignocelulósica e que merece destaque é o pré-tratamento ou hidrólise química, no qual ácidos ou álcalis são empregados.

O pré-tratamento alcalino é um dos métodos amplamente utilizados e empregam bases, tais como o NaOH (SILVERSTEIN et al., 2007; WANG et al., 2010), Ca(OH)_2 (SIERRA et al., 2009), o KOH (WANITWATTANARUMLUG et al., 2012; SHARMA et al., 2013), solução de NH_3 e NH_4OH (KIM et al., 2009; LI, 2010). O principal mecanismo de ação do álcali é a remoção do grupo acetil e substituições com ácido urônico presentes na hemicelulose, aumentando a acessibilidade das enzimas ao agregado (ZHENG et al., 2009). É descrito por Taherzadeh et al, (2008); Pan et al, (2008) e Gupta (2008) que o pré-tratamento alcalino promove uma reação de saponificação, causando um inchaço que aumenta a despolimerização e causa ruptura da lignina e das ligações entre os carboidratos. Porém, a principal desvantagem apresentada pelo processo é a baixa deslignificação e a incorporação de sais no hidrolisado durante o processo, causando problemas aos processos de fermentação (BEHERA et al., 2014).

O pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica promove uma modificação na estrutura do material lignocelulósico tornando-o adequado para posterior hidrólise enzimática. A eficácia deste processo depende da concentração do ácido, da razão de sólido/líquido e da temperatura (BEHERA et al., 2014). Ácidos inorgânicos, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido nítrico e fosfórico vem sendo propostos para o pré-tratamento da biomassa (ASGHER et al., 2013). Embora o ácido concentrado seja altamente eficaz é extremamente tóxico, perigoso e requer processo especial durante e após o pré-tratamento. Portanto, uma alternativa promissora e empregada em vários estudos é o uso de ácido diluído associado com altas temperaturas (TSAO., 1996; LISSENS et al., 2004; MOSIER et al., 2005; DADI et al., 2006; CARERE et al., 2008; TABIL et al., 2011; ZHENG; XIAO et al., 2011; HAO et al., 2012). O pré-tratamento ácido permite hidrolisar as hemiceluloses, principalmente a xilana da estrutura lignocelulósica. A hemicelulose se degrada em monômeros como xilose, manose, galactose, glicose, ácido acético e etc. Em relação a celulose o tratamento ácido age rompendo as microfibrilas na região amorfa. Na lignina ocorre a perturbação da estrutura, porém o pré-tratamento não é eficaz na dissolução do polímero (BEHERA et al., 2014; ANWARA et al., 2014).

3.7. Subprodutos da hidrólise de materiais lignocelulósicos

Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos são necessários para tornar os açúcares disponíveis à fermentação, porém apresentam uma grande desvantagem: a formação de subprodutos indesejáveis que são potenciais redutores de fermentabilidade dos

hidrolisados, ou seja, compostos inibidores de fermentação. Três grupos de compostos inibidores são identificados na maioria dos hidrolisados lignocelulósicos, são eles: ácidos orgânicos – tal como o ácido acético, derivados de furano – como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural e monômeros fenólicos, tais como a vanilina, siringaldeído e ácido 4-hidroxibenzóico (QUEMENEUR et al., 2012). Além destes, segundo Behera et al., 2014, há uma categoria de inibidores não tão comumente estudada, porém bem prejudiciais à fermentação, que são os metais pesados presentes em hidrolisados.

A figura 9 mostra um esquema geral de formação de inibidores a partir dos principais componentes da biomassa lignocelulósica.

Figura 9. Esquema geral da degradação da biomassa em sacarídeos e lignina, além de seus produtos de degradação durante o pré-tratamento (adaptado de RASMUSSENA et al, 2014).

Neste trabalho foram estudados o efeito do ácido acético, dos derivados de furanos, do furfural e do 5-HMF, e de três compostos fenólicos derivados da hidrólise da lignina, a vanilina, o siringaldeído e o ácido 4-hidroxibenzóico sobre a produção de H_2 por cultura mista. Portanto, nos próximos itens será destacada a origem e os potenciais efeitos inibitórios destes compostos sobre microrganismos em geral.

3.7.1. Ácido acético.

É de difícil inferência a origem do ácido acético, assim como também de seus efeitos inibitórios sobre os microrganismos, pois além de subproduto formado pelo pré-tratamento esse ácido orgânico é um metabólito formado durante a fermentação (WALTON et al., 2010). O pré-tratamento térmico e com ácidos diluídos pode conduzir a clivagem de ligações acetil presentes em hemiceluloses (figura 10, ligações de 1 a 4), como também induzir a quebra de grupos acetil (figura 10, nº5), levando a formação e liberação de ácido acético livre (RASMUSSENA et al., 2014). Kumar et al (2013) também propõem a formação de ácido acético a partir da degradação da lignina.

Figura 10. Estrutura de uma hemicelulose evidenciando suas ligações acetil (1 a 4) e grupos acetilados (5) presentes em alguns açúcares (STÅHLBERG et al, 2011).

O ácido acético na sua forma dissociada é capaz de penetrar na parede celular das bactérias e acidificar o citoplasma ao ponto de interromper a síntese de diversas proteínas e interferir em outros processos celulares (WALTON et al., 2010).

3.7.2. Derivados de furano

Os derivados de furanos mais comumente encontrados em hidrolisados de materiais lignocelulósicos são o 5-HMF e o furfural, derivados da celulose e da hemicelulose, respectivamente (figura 9).

Dentre os compostos que podem ser obtidos a partir de hexoses da biomassa lignocelulósica, o 5-HMF é provavelmente um dos mais importantes (SOUZA et al., 2012). A

formação de 5-HMF a partir da desidratação de hexoses como a glicose, exemplo observado na figura 11, é complexa e várias rotas e mecanismos de protonação e desidratação são propostos. Mecanismos cíclicos e acíclicos são sugeridos, podendo promover ou não a isomerização com frutose (RASMUSSENA et al., 2014).

A informação disponível em toda literatura diz que inicialmente os açúcares desidratam para formar 5-HMF, porém se as condições de reação continuarem severas, subsequentemente haverá formação de ácido levulínico e fórmico, que apresentam efeito inibitório até mais acentuado que o 5-HMF (GIRISUTA., 2007).

Figura 11. Formação de 5-HMF a partir da glicose, mecanismo cíclico e acíclico, como também a formação de HMF com isomerização em frutose, ciclico e acíclico.

O segundo derivado de furano a ser considerado é o furfural, sendo três mecanismos sugeridos para a conversão de pentoses em furfural devido aos pré-tratamentos. A figura 12 apresenta um mecanismo acíclico e dois mecanismos cíclicos diretos distintos (AHMAD et al., 1995). Ainda não há suporte experimental para esses mecanismos, pois a degradação das pentoses, principalmente xilose, é complexa e certamente não acontece devido apenas a um mecanismo. Um aspecto importante para a formação de furfural é a presença de água na reação (RASMUSSENA et al., 2014).

Figura 12. Mecanismos cíclicos e acíclicos sugeridos para formação de furfural a partir da xilose. Esquema descrito por AHMAD et al., 1995 e ANTAL et al., 1991 e adaptado por RASMUSSENA et al., 2014.

3.7.3. Compostos fenólicos.

Embora a estrutura exata da lignina seja desconhecida, a biossíntese desse polímero é conhecida por envolver a polimerização de três monômeros primários, anteriormente citados: os álcoois cumarílico, coniferílico e sináplico. A polimerização fenólica se dá por reações

aleatórias do tipo acoplamento radical-radical. A composição, peso molecular e quantidade de lignina diferem de planta para planta.

Os monômeros são ligados por ligações éster do tipo β -5, 4-O-5, β -1 e predominantemente por ligações β -O-4, exemplo apresentado na figura 7, mostrada anteriormente no item 3.5.1, que compõem de 50 a 60% das ligações em materiais lignocelulósicos (ZAKZESKI et al., 2010).

Com o pré-tratamento termoquímico da lignina as ligações ésteres mais externas são prontamente clivadas. A fragmentação dessas ligações tende a gerar compostos intermediários, contendo grupos fenólicos, conforme o representado na figura 13.

Figura 13. Exemplo de um composto de lignina intermediário (1) sendo decomposto em monômeros fenólicos, inclusive em vanilina (2) e siringaldeído (3).

Devido ao aumento da sua solubilidade em relação à lignina e se as condições de reação continuarem severas são formados compostos que se assemelham aos blocos de construção da lignina e aos compostos fenólicos (figura 13), tal como a vanilina e o siringaldeído (KANG et al., 2013 ; ZAKZESKI et al., 2010).

Embora seja reconhecido que os compostos fenólicos encontrados em hidrolisados resultam da lignina, já se encontram relatos que vários compostos fenólicos também podem se formar a partir da degradação de *D*-glicose (figura 12), *D*-xilose e *L*-arabinose. Kumar (2013) confirma a formação de compostos fenólicos a partir de substratos ricos em celulose (Avicel®), *D*-xilana e xilose. Esses resultados foram, verdadeiramente, um “divisor de águas”

nesse campo de estudos, pois mostram que esses inibidores também podem ser originados a partir de carboidratos (RASMUSSENA et al., 2014).

Vanilina, siringaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído são intermediários do processo de oxidação úmida da lignina. Estes aldeídos também podem ser oxidados, subsequentemente, em ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico e ácido 4-hidroxibenzóico (KANG et al., 2013).

Portanto, a degradação da lignina e a geração desses potenciais inibidores é uma rede complexa de reações paralelas. Fica claro, então, que a geração destes dependem das condições de pré-tratamento ou hidrólise e que alguns compostos são formados sob condições mais severas do que outros.

3.8.Efeito de compostos inibidores sobre a fermentação

Os efeitos e mecanismos de ação dos compostos inibidores de fermentação anteriormente descritos são mais bem conhecidos em eucariotos do que em procariotos, principalmente sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua relevância industrial na fermentação etanólica. Palmqvist & Hahn-Hagerdal (2000), Liu et al, (2004) e mais recentemente Jung et al, (2011), Jonsson et al, (2013) e Monlau et al, (2013) descrevem com detalhes alguns dos efeitos destes inibidores sobre a levedura. Tais efeitos são apresentados de forma resumida na figura 14.

O ácido acético parcialmente ionizado, ou seja, em valores de pH superiores ao seu pKa (4,75) se difunde através da membrana com mais facilidade ocasionando uma diminuição do pH intracelular. Como mecanismo de sobrevivência, a célula bombeia o excesso de H⁺ para o meio extracelular pela ação da ATPase às custas de ATP, o qual seria empregado no crescimento e em outras atividades celulares. Com a persistência deste mecanismo a célula já não dispõe de ATP para as suas atividades vitais e não sobrevive. Outra hipótese é que o acúmulo do ânion no citoplasma possa aumentar a pressão de turgescência, ou seja, o aumento exagerado da célula causado pela entrada forçada de água por osmose o que pode acarretar num inchaço e lise da célula.

Os derivados de furano, tais como o furfural e o 5-HMF diminuem o crescimento e a produtividade da célula por interferir na duplicação do DNA e causar mutações. Acredita-se que a célula, como um mecanismo de defesa, reduza o 5-HMF e o furfural a compostos menos inibidores utilizando enzimas NADH dependentes que também são atuantes na via glicolítica e com isto a disponibilização de ATP para a célula seja diminuída (JONSSON et al., 2013).

O mecanismo de inibição de fermentação pela presença de compostos fenólicos não é totalmente elucidado. Sabe-se que esses compostos não são altamente hidrofóbicos e portanto a membrana celular é permeável a eles. Além disso, estes compostos favorecem a geração de espécies reativas de oxigênio, tais como H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$ (MONLAU et al., 2013).

Efeitos de inibidores são amplamente estudados sobre a fermentação alcoólica de leveduras, mas ainda faltam informações a respeito da inibição desses compostos sobre a produção de H_2 por fermentação. Uma investigação mais detalhada é necessária para fornecer diretrizes para o uso de hidrolisados como substratos na produção de H_2 por vias biológicas

Figura 14. Esquema dos principais inibidores presentes em hidrolisado lignocelulósicos e seus principais efeitos na célula.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Inóculo

A cultura mista utilizada como inóculo nos ensaios para a produção de H_2 foi um lodo coletado de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (RAFA) utilizado no tratamento de efluentes (vinhaça) de uma usina de açúcar e etanol, localizada na Região de Ribeirão Preto - SP.

O lodo foi levado ao laboratório, em refrigeração, deixado sedimentar e retirado o sobrenadante, a fim de concentrar as células. Após este procedimento, o lodo (5 L) foi colocado em um frasco de 5 litros e mantido a temperatura ambiente. Diariamente era realizada a alimentação desta cultura mista pela retirada de 1 litro do sobrenadante e reposição de 1 litro de meio de cultura, conforme composição descrita no próximo item. O pH era ajustado para 6,0 ($\pm 0,2$) após cada alimentação. Este procedimento foi realizado por cerca de 30 dias para tornar o lodo mais ativo, ou seja, com intensa produção de gás.

Para padronizar o lodo que seria utilizado nos ensaios de fermentação e enriquecer o inóculo (cultura mista) em bactérias produtoras de H_2 , este lodo foi seco em estufa a 105°C por 12 horas, segundo método adaptado de Buitrón e Carvajal (2010). Estes autores sugerem a secagem do lodo nesta temperatura, mas por um período de 24 h. Após o tratamento térmico (secagem), o lodo foi macerado em almofariz, peneirado em malha de 35 # (500 μm) e armazenado a temperatura ambiente (25°C) em frasco escuro para a sua utilização em ensaios de fermentação.

4.2. Meio de cultura

Para a manutenção e ativação do lodo, bem como para a realização dos ensaios de fermentação foi utilizado o meio de cultura descrito por Gonzalez-Gil (2002), sendo modificada a quantidade de N e de P, para perfazer uma razão C/N = 140 e C/P = 133. A glicose, em concentração de 10 g.L⁻¹, foi utilizada como fonte de carbono para a manutenção do inóculo. Em ensaios de fermentação, nos quais foram utilizados os principais monossacarídeos constituintes de hidrolisados de materiais lignocelulósicos, a glicose e a xilose, foram adicionadas diferentes concentrações destes monossacarídeos, a fim de verificar a concentração de máxima velocidade de produção de H_2 . Além da fonte de carbono, o meio de cultura foi suplementado com NH_4Cl (0,11 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g.L⁻¹), KH_2PO_4

(0,136 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,148 g.L⁻¹) como macronutrientes e 1 mL.L⁻¹ de solução de micronutrientes: FeCl₂ .4H₂O (2,0 mg.L⁻¹), H₃BO₃ (50,0 mg.L⁻¹), ZnCl₂ (50,0 mg.L⁻¹), CuCl₂ .2H₂O (38,0 mg.L⁻¹), MnCl₂.4H₂O (500,0 mg.L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (50,0 mg.L⁻¹), AlCl₃.6H₂O (90,0 mg.L⁻¹), CoCl₂.6H₂O (2,0 mg.L⁻¹), NiCl₂.6H₂O (142,0 mg.L⁻¹), Na₂SeO₃.5H₂O (164,0 mg.L⁻¹), EDTA (1,0 mg.L⁻¹) e HCl a 36% (1,0 mg.L⁻¹) todos da Dinâmica™ e qual de pureza de 99,9%.

4.3.Determinação dos Sólidos Totais e Sólidos Voláteis (ST e SV)

A análise de sólidos totais do lodo utilizado como inóculo foi efetuada utilizando papel filtro qualitativo da Qualy™, porosidade 11,0; previamente seco em forno de micro-ondas, ajustado na potência de 180 Watts, durante 15 minutos. Um volume conhecido da amostra de lodo foi filtrado neste papel filtro seco e de peso conhecido, o qual foi posteriormente secado em forno micro-ondas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. A concentração de sólidos totais foi obtida pela diferença de peso do papel filtro antes e depois da secagem sendo considerado o volume de amostra utilizado para a análise. Para a determinação dos sólidos voláteis, utilizou-se o método descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, o qual utiliza a queima de um volume conhecido de amostra em mufla a 600 °C por 15 minutos em cadinho previamente calcinado na mesma temperatura. A partir deste procedimento é calculada a concentração de sólidos fixos (não voláteis). A concentração de sólidos voláteis é calculada pela diferença entre a concentração de sólidos totais e fixos (APHA, 1995).

4.4.Ensaio cinéticos de fermentação em batelada

Todos os ensaios de fermentação para a produção de H₂ foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL (marca Pirex™) adicionando-se 1,5 g de lodo seco contendo 43 % de SV, como inóculo e 125 mL de meio de cultura contendo a fonte de carbono (glicose ou xilose) e os nutrientes, conforme composição do meio de González-Gil (2002). O pH para o início dos ensaios foi ajustado para 6,0 utilizando pHmetro digital Marconi. Gás argônio foi borbulhado a fim de manter a anaerobiose do sistema. Todos os testes foram realizados em duplicata. Antes da vedação dos Erlenmeyers eram retirados uma amostra de 5 mL da solução

inicial, filtrada em filtros de seringa 45x25mm, composto de membrana em celulose regenerada, marca J Filter© e congelada para posterior realização de análises.

Os Erlenmeyers, denominados de biorreatores foram mantidos à temperatura de 37°C em banho termostatzado (Fanem™). A tampa dos biorreatores era constituída por uma rolha de borracha, na qual foi acoplada uma tubulação para a saída do gás produzido no sistema, conforme representado na Figura 15. A tubulação foi conectada a um frasco de segurança, no qual era realizada a amostragem para análise do gás, e o volume de gás produzido foi recolhido em um frasco tipo Mariotte invertido contendo NaOH 5% (m/v). O volume de NaOH deslocado era captado em uma proveta e este representou o volume total de gás gerado, exceto o CO₂ que fica retido no NaOH.

A composição do gás foi analisada por cromatografia a gás e o volume de H₂ foi obtido multiplicando-se o volume de NaOH deslocado pela percentagem de H₂ analisada no gás. O volume de NaOH deslocado era anotado a cada 2 horas e a análise do gás realizada no mínimo a cada 3 horas a partir do início da produção de gás, de forma a identificar o tempo necessário para o início da produção do gás e a velocidade máxima de produção do H₂. O ensaio terminou quando a produção de gás cessou por no mínimo 6 horas.

Figura 15. Sistema para a realização de ensaios de fermentação em batelada para a produção de H₂: 1- Biorreator com a tubulação de saída do gás, 2- Ponto de aborbulhamento de gás argônio, 3- Frasco de segurança e de amostragem de gás, 4-Frasco invertido contendo solução de NaOH 5%, 5- Frasco graduado para recolher o volume de NaOH 5 % deslocado, 6- Cromatógrafo a gás (adaptado de García-Morales et al., 2001).

4.5. Ensaios de produção de H₂ por fermentação com diferentes concentrações de glicose e xilose

Inicialmente foram realizados ensaios de fermentação em batelada para a produção de H₂ utilizando como fonte de carbono do meio de cultura diferentes concentrações de glicose P.A. (Vetec™) e xilose (Sigma-Aldrich™) em concentrações que variaram entre 5 e 50 g.L⁻¹. Estes monossacarídeos foram escolhidos por se tratarem dos principais monômeros constituintes dos materiais lignocelulósicos. Este estudo também teve como finalidade identificar o monossacarídeo e a faixa de concentração, na qual a velocidade máxima de produção de H₂ era obtida. O procedimento do ensaio de fermentação com estes açúcares foi o descrito no item anterior.

4.6. Ensaios de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de inibidores

O efeito dos subprodutos de hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H₂ por fermentação foi avaliado adicionando-se diferentes concentrações dos potenciais compostos inibidores aos biorreatores contendo 1,5g do inóculo seco, 125 mL de solução de glicose (40g.L⁻¹) e macro e microelementos descritos no item 4.2. Esta concentração de glicose foi utilizada por ser identificada, nos ensaios anteriores, como a que resulta na máxima velocidade de produção de H₂. Os compostos inibidores estudados foram introduzidos nos biorreatores em diferentes concentrações e representaram as três classes de subprodutos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, todos da Sigma-Aldrich™ (EUA): 1) ácidos orgânicos - ácido acético (99 %) em concentração de 0,5 a 10 g.L⁻¹; 2) derivados de furanos – furfural (99%) de 0,2 a 2,0 g.L⁻¹ e HMF (99%) entre 0,1 e 1,0 g.L⁻¹, e, 3) monômeros fenólicos – vanilina (99%) entre 0,5 e 2,0 g.L⁻¹, siringaldeído (99%) entre 0,25 e 2 g.L⁻¹ (99%) e ácido 4 hidroxibenzóico (99%) entre 0,15 e 1,0 g.L⁻¹. Estes compostos foram adicionados ao meio de cultura pela adição de um determinado volume de solução estoque ou adicionada quantidade suficiente para perfazer as concentrações desejadas dentro do biorreator.

Além dos ensaios de fermentação para a produção de H₂, aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de um único composto inibidor em cada ensaio, foram realizados ensaios aos quais foram feitas misturas de 2 e 3 inibidores, quais sejam: ácido acético e 5-HMF, ácido acético e siringaldeído e siringaldeído e 5-HMF, além de ácido acético, 5-HMF e

siringaldeído. As concentrações de inibidores utilizadas nestes ensaios foram calculadas com base nos ensaios anteriores, ou seja, a concentração de cada um destes inibidores que causou 20 % de inibição da velocidade máxima de produção de H_2 . Portanto, para estes testes foram preparadas 3 soluções estoques que continham 40g.L^{-1} de glicose (concentração na qual a velocidade máxima de produção de H_2 é obtida), adicionada de 3260 mg.L^{-1} de ácido acético, 127 mg.L^{-1} de 5-HMF e 410 mg.L^{-1} de siringaldeído, concentrações capazes de inibir 20% da velocidade máxima de produção de H_2 . Para os ensaios com inibidores individualmente testados foram utilizados 120 mL destas soluções. Nos ensaios contendo 2 inibidores os volumes utilizados foram de 60 mL de cada solução. Por fim, para o ensaio que continha 3 inibidores o volume de cada solução utilizado foi de 40 mL. O procedimento do ensaio de fermentação utilizado foi o descrito no item 4.4.

4.7. Ensaio de produção de H_2 por fermentação com hidrolisado de bagaço de cana.

Os ensaios de fermentação com hidrolisado de bagaço de cana foram realizados com o intuito de verificar a possibilidade de utilização de um hidrolisado de material lignocelulósico “real” como substrato para a produção de H_2 . Foi utilizado o bagaço de cana, submetido a uma hidrólise ácida com HCl, cujas condições de tempo, temperatura e concentração do ácido foram estabelecidas em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa e estão descritas no próximo item.

Para estes ensaios foram utilizados os seguintes substratos: hidrolisado obtido segundo as condições descritas abaixo (120 mL), hidrolisado tratado com carvão ativado, segundo condições descritas abaixo, o bagaço sólido após a hidrólise ácida, ao qual foram adicionados 125 mL de água deionizada. Além disso, o bagaço sólido após tratamento ácido também foi utilizado como substrato com a adição da enzima Celluclast®. Antes da adição da enzima celulolítica Celluclast® (Novozymes, USA) ao bagaço pré-tratado com ácido foi determinada a atividade da enzima sobre papel de filtro, de acordo com Ghose (1987). Uma unidade da enzima (1U) foi definida como a quantidade de enzima que libera $1\text{ }\mu\text{mol}$ de açúcares redutores totais por minuto. Assim, a atividade da Celluclast® foi de 63.2 U/mL e 0.52 mL da enzima foi adicionado ao biorreator contendo 3.3 g de bagaço pré-tratado, de forma a perfazer 10 U da enzima/g de substrato.

Todos estes substratos foram adicionados com macro e micronutrientes, $3,3\text{ g}$ de lodo seco e para a fermentação, seguida a metodologia descrita no item 4.4.

4.7.1 Hidrólise do bagaço de cana

A hidrólise do bagaço foi realizada com uma concentração de HCl de 7,36% (v/v) a 96,8°C por 442 minutos, condições estas previamente estabelecidas em outros trabalhos. Para cada ensaio de hidrólise pesou-se 3,3 g de bagaço de cana previamente lavado e moído em moinho de facas e 50 mL do ácido diluído. Após o tempo de hidrólise, o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro e recolhido em um balão volumétrico de 100 mL, acertando-se este volume. O pH do hidrolisado foi ajustado para 6,0 com Ca(OH)_2 e utilizado como substrato em ensaios de fermentação, após a adição de macro e micronutrientes do meio de cultura.

4.7.2. Tratamento do hidrolisado com carvão ativo

Em um béquer foi adicionado o carvão ativado e o hidrolisado e em uma razão de 10% m/v a uma temperatura de 40°C, sob agitação por 1 hora a 120 rpm, com auxílio de um agitador magnético. Após este período, o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro e utilizado como substrato nos ensaios de fermentação.

4.8. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

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 1,0 g.L⁻¹. A leitura foi realizada em espectrofotômetro da Bellab modelo UV M-51 em comprimento de onda de 540 nm. Os testes foram feitos em triplicata.

4.9. Análise e composição do gás

A determinação dos gases através de cromatografia a gás (CG) foi realizada de acordo com Han e Shin (2004), modificando-se a temperatura do detector para 100°C. A concentração dos gases produzidos foi avaliada por meio da retirada de 0,05mL de amostra do gás produzido na saída do biorreator, utilizando-se uma seringa *gas tight*. A análise foi realizada em cromatografia a gás (Shimadzu –2014) equipado com detector de condutividade térmica (TCD). A coluna utiliza foi uma coluna empacotada, (ShinCarbon ST 100/120 mesh), peneira molecular 5A 2m x 2 mm, sendo o gás de arraste, argônio ultra puro sob vazão de

30mL.min⁻¹. As temperaturas do injetor, da coluna e do detector serão 80°C, 50°C e 100°C, respectivamente.

4.10. Análise de monossacarídeos, ácidos orgânicos voláteis e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise da concentração do substrato (glicose ou xilose) e dos metabólitos solúveis produzidos durante a fermentação, tais como o ácido acético, o ácido láctico, o ácido butírico, e o etanol, foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE (Shimadzu, Japão) de acordo com metodologia descrita por Sá et al. (2011). As condições utilizadas foram coluna Aminex HPX-87H, fase móvel consistindo de H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ (84Kgf/cm²). Um sistema de detecção dupla foi utilizado (arranjo de diodo e índice de refração). Os carboidratos e o ácido acético foram quantificados pelo detector de índice de refração (RID) e os derivados de furano (HMF e furfural) foram analisados pelo detector de arranjo de diodo a 280 nm. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados pelo software Class VP 6.1 (Shimadzu, Japão).

4.11. Modelagem dos resultados dos ensaios cinéticos de fermentação.

O modelo utilizado para o ajuste dos resultados experimentais dos ensaios cinéticos de fermentação em batelada de produção de H₂ em diferentes concentrações de glicose e de xilose, bem como dos ensaios contendo glicose e diferentes concentrações dos inibidores foi o modelo de Gompertz modificado. Este modelo é amplamente utilizado para estimar parâmetros cinéticos de produção de H₂ em ensaios em batelada (QUEMENEUR et al., 2011; NING et al., 2012; PEIXOTO et al., 2012; GIOANNIS et al., 2013). O volume de H₂ acumulado no ensaio em função do tempo foi colocados no programa Statistica 7 e modelados conforme Equação 5, para a obtenção dos parâmetros cinéticos R_m, P e λ.

$$H = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: H: representa o volume de H₂ acumulado no ensaio (mL); P: potencial máximo de produção de H₂ (mL); R_m: velocidade máxima de produção de H₂ (mL.h⁻¹); λ: tempo da fase lag ou tempo para o início da produção de H₂ (h); t: tempo do experimento (h).

4.12. Estimativa da concentração efetiva – CI 50.

Nos ensaios com diferentes concentrações de inibidores, a velocidade máxima de produção de H₂ (R_m) obtida nos ensaios com cada concentração do inibidor foi dividida pela velocidade máxima de produção de H₂ (R_m) do ensaio controle (contendo apenas glicose), para normalizar os resultados, conforme equação 6.

$$\text{Velocidade de produção de H}_2 = \frac{R_m \text{ inibidor}}{R_m \text{ Controle}} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: R_m inibidor = velocidade máxima de produção de H₂ no controle (mL.h⁻¹); R_m controle = velocidade máxima de produção de H₂ nos ensaios com diferentes concentrações dos inibidores (mL.h⁻¹).

A partir destes dados foi traçada uma curva entre a velocidade relativa de produção de H₂ e a concentração dos diferentes inibidores, as quais ajustadas por equações polinomiais de segundo grau. Esta equação foi utilizada para estimar a concentração do inibidor, onde ocorre inibição de 50% da velocidade relativa de produção de H₂, denominada de CI 50. Portanto, o efeito inibitório dos compostos de degradação de materiais lignocelulósicos foi quantificado em termos de CI 50, sob condições não limitantes do substrato principal, a glicose. Estes valores foram obtidos, utilizando a programa Excel, Microsoft.

4.13. Tratamento estatístico dos dados

Todos os parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo de Gompertz modificado nos ensaios de fermentação e as concentrações dos substratos e metabólitos são apresentados como a média aritmética seguida pelo desvio médio, calculado com auxílio da equação 7.

$$A.D = \sum \frac{|x_i - \bar{x}|}{n} \quad (\text{Equação 7})$$

E o Teste de Tukey foi utilizado para verificar a diferença significativa entre os valores médios por meio do programa STATISTICA 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o início dos ensaios de produção de H_2 foi realizado o tratamento térmico do lodo, ou seja, a sua secagem a $105^\circ C$ por 12 h que serviu para garantir a padronização do inóculo para a realização de todos os testes de fermentação realizados neste trabalho.

Inicialmente foram realizados ensaios de fermentação adicionando-se como única fonte de carbono os principais carboidratos que compõem a biomassa lignocelulósica, a glicose e a xilose. Na figura 16 podem ser observados os resultados dos ensaios cinéticos de fermentação, ou seja, o volume de H_2 em função do tempo, dos ensaios contendo diferentes concentrações de glicose (16 A) e xilose (16 B). Como pode ser observado o lodo usado como inóculo foi capaz de produzir H_2 a partir de ambos os carboidratos, ou seja, tanto a partir da xilose, quanto da glicose.

Figura 16. Ensaio cinético para a produção de H_2 a partir de Glicose (A) e Xilose (B), como substrato, em concentrações entre 5 a 50 g.L^{-1} . Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Como apresentado na figura 16 os ensaios contendo glicose (A) mostram que concentrações crescentes desse carboidrato aumenta o volume máximo de H_2 produzido até concentrações de 40 g.L^{-1} na qual foi alcançado um volume de $195,1 \pm 12,23 \text{ mL}$ de H_2 . Na maior concentração testada (50 g.L^{-1}) a produção máxima de H_2 atinge apenas $142,6 \pm 6,231 \text{ mL}$ de H_2 .

Para os ensaios com xilose o comportamento é distinto. Em concentrações menores, 5 e 10 g.L^{-1} , o volume máximo de H_2 não passa de $46,77 \pm 1,651 \text{ mL}$. Já para concentrações de 20, 30 e 40 g.L^{-1} o volume máximo atingido é de $119,2 \pm 2,537 \text{ mL}$. Em relação ao tempo necessário para o início da produção de H_2 , também conhecido como fase lag, a diferença entre os ensaios com xilose e glicose é de apenas 2 h em média, evidenciando que os ensaios com glicose possuem uma fase lag menor do que os ensaios com xilose. Este comportamento mostra que a cultura mista está mais adaptada ao substrato glicose do que à xilose, o que não surpreende uma vez que o lodo foi mantido em laboratório pela sua alimentação com glicose.

Teoricamente a xilose pode ser convertida a H_2 com rendimento máximo de $3,33 \text{ mols } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{xilose}}$ quando o acetato é o único metabólito. Alternativamente, a xilose pode ser convertida a H_2 também pela via do butirato com rendimento de $1,67 \text{ mols } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{xilose}}$ (KONGJAN; ANGELIDAKI, 2009). Assim sabe-se que quando a xilose é o substrato para produção de H_2 por fermentação o rendimento de produção é 17,5% menor do que quando a glicose é o substrato. Outro motivo que pode explicar a maior produção de H_2 com glicose do que com xilose como substrato é, como mencionado anteriormente, o fato que o inóculo foi ativado e mantido em meio contendo glicose até o seu tratamento térmico (secagem).

Na figura 17 estão representadas as velocidades de produção de H_2 em função das concentrações de glicose e xilose, obtidas a partir da modelagem dos resultados mostrados nas figuras 16 A e 16 B, por meio do modelo de Gompertz modificado. Nos testes utilizando xilose como substrato a maior velocidade de produção de H_2 (R_m) foi de $6,37 \text{ mL.h}^{-1}$ em 50 g.L^{-1} . Para os ensaios contendo glicose como única fonte de carbono, as concentrações entre 40 e 50 g.L^{-1} forneceram a máxima velocidade de produção de H_2 , cerca de $15,1 \text{ mL.h}^{-1}$. Desta forma, a concentração de 40 g.L^{-1} de glicose foi escolhida para a realização dos ensaios de fermentação com a adição de inibidores. Desta forma, garantiu-se que a inibição observada pela adição dos compostos não fosse decorrência da limitação de substrato, mas sim da influência dos inibidores de fermentação.

Figura 17. Velocidades de produção de H_2 (R_m) em diferentes concentrações de glicose e xilose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

5.1. Ensaios cinéticos de produção de H_2 com diferentes concentrações de inibidores.

Todos os ensaios de fermentação para a produção de H_2 com adição de diferentes concentrações de inibidores, cujos resultados serão apresentados neste item, foram realizados utilizando glicose como fonte de carbono, em concentração de 40 g.L^{-1} , a fim de garantir condições não limitantes da principal fonte de carbono.

Na figura 18 pode ser observado o volume de H_2 acumulado em função do tempo, na presença de glicose e de diferentes concentrações de ácido acético. De uma maneira geral, pode-se observar que a adição de concentrações crescentes de ácido acético acarretou numa diminuição do volume máximo de H_2 produzido pela cultura mista.

Figura 18. Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido acético na presença de 40 g.L^{-1} de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Os resultados dos ensaios de produção de H_2 foram ajustados pelo modelo de Gompertz modificado e os parâmetros cinéticos obtidos estão apresentados na tabela 3. Nota-se uma diminuição progressiva na velocidade máxima de produção (R_m), com o aumento da concentração de ácido acético. Por outro lado, a adição de concentrações crescentes de ácido acético não promoveu aumento significativo na fase lag (λ), sugerindo que o lodo já estava adaptado ao composto.

Tabela 3. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido acético.

Ácido acético (g.L^{-1})	P (mL)	R_m (mL.h^{-1})	λ (h)	R^2
Controle	$154,3 \pm 8,859^a$	$8,681 \pm 0,271^a$	$21,29 \pm 0,174^a$	0,996
0,50	$114,2 \pm 11,07^b$	$6,107 \pm 0,703^b$	$19,76 \pm 1,420^a$	0,982
1,00	$108,2 \pm 9,763^b$	$5,575 \pm 0,169^b$	$22,69 \pm 0,204^a$	0,970
2,50	$87,61 \pm 5,589^c$	$5,627 \pm 0,504^b$	$22,81 \pm 0,175^a$	0,998
5,00	$47,91^d$	$2,987^c$	$24,83^b$	0,996
10,0	0^e	0^d	$84,00^c$	0

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras "a, b, c, d, e" diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Os resultados apresentados na tabela 3 revelaram que a adição de 0,50; 1,00 e 5,00 g.L^{-1} de ácido acético acarretou uma diminuição no potencial máximo de produção de H_2 (P) na ordem de 26, 30 e 69%, respectivamente. Quanto à velocidade máxima de produção de H_2

(Rm), a inibição foi de 30, 36 e 65% para as concentrações de 0,50; 1,00 e 5,00 g.L⁻¹ de ácido acético, respectivamente, em relação ao controle. A fase de latência (λ) não aumentou até a concentração de 5,00 g.L⁻¹, resultado este que se assemelha aos encontrados por Wang et al (2008). O ácido acético é um dos principais metabólitos produzidos durante a produção de H₂ podendo acumular-se a um nível elevado sem causar qualquer alteração, como também, ser altamente tóxico para culturas de microrganismos (FUKUZAKI et al., 1990; WU et al., 1993; WANG et al., 2008). Wang et al (2008) encontrou para consórcios microbianos uma inibição de 29 e 64% da Rm em concentrações de 5,00 e 10 g.L⁻¹ de ácido acético, valores de inibição inferiores às observadas neste trabalho.

A figura 19 apresenta os resultados dos ensaios cinéticos de fermentação com crescentes concentrações de furfural. Assim como o ácido acético, o furfural também promove uma diminuição do volume total de H₂ acumulado quando a concentração de furfural aumenta. A adição de furfural promoveu um aumento acentuado na fase de latência.

Figura 19. Ensaio cinético de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de furfural e glicose 40 g.L⁻¹. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir da modelagem dos dados dos ensaios de fermentação com adição de furfural fornecidos pelo modelo de Gompertz modificado compõem a tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações furfural.

Furfural (g.L ⁻¹)	P (mL)	Rm (mL.h ⁻¹)	λ (h)	R ²
Controle	154,3 ± 8,859 ^a	8,681 ± 0,271 ^a	21,29 ± 0,174 ^a	0,999
0,25	123,1 ± 8,205 ^{ab}	7,068 ± 0,413 ^a	22,74 ± 0,527 ^a	0,995
0,50	99,63 ± 6,702 ^{bc}	4,074 ± 0,161 ^b	33,61 ± 2,853 ^b	0,997
1,00	66,55 ± 1,889 ^c	3,088 ± 0,114 ^b	66,82 ± 0,263 ^c	0,994
2,00	0 ^d	0 ^c	90 ^d	0

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras “a, b, c, d” diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,05).

Nos ensaios com a adição de 0,25, 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ de furfural foi observada uma diminuição de 20, 35 e 57% no potencial de produção máxima (P) e de 18, 53 e 64 % na Rm, em relação ao controle. Em relação à fase lag (λ) houve um aumento de 12 e 45 horas pela adição de 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ de furfural em comparação com o controle. Em concentração de 2,00 g.L⁻¹ de furfural não foi observada a produção de H₂. Quéméneur et al (2011) observou inibições similares às deste trabalho, de 70% no potencial de produção máxima de H₂, pela adição de 1g.L⁻¹ de furfural em ensaios com cultura mista usando solução de xilose como substrato. Cao et al (2010) utilizando cultura pura de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 observou inibição parecida, por volta de 50,2% na produção de H₂ na presença de 1g.L⁻¹ furfural.

O segundo representante dos compostos derivados de furano testado foi o 5-HMF, a figura 20 representa os resultados dos ensaios cinéticos de produção de H₂ com crescentes concentrações desse composto. Os resultados fornecidos pela figura 22 foram ajustados com o modelo de Gompertz modificado e os parâmetros cinéticos estão apresentados na tabela 5.

Concentrações de 0,25; 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ de 5-HMF promoveram uma diminuição de 32, 48 e 79 % na produção máxima de H₂ (P) e 32, 50 e 80 % na Rm, respectivamente. Quéméneur et al (2011) observaram uma diminuição de 76%, quando uma concentração de 1g.L⁻¹ foi adicionada à cultura mista. Em relação à fase lag o comportamento do 5-HMF difere do observado para o furfural, pois crescentes concentrações do inibidor não causaram aumento significativo da fase lag.

Figura 20. Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de 5-hidroximetilfurfural e 40 g.L^{-1} de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Tabela 5. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de 5-hidroximetilfurfural

Furfural (g.L^{-1})	P (mL)	Rm (mL.h^{-1})	λ (h)	R^2
Controle	$154,3 \pm 8,859^a$	$8,681 \pm 0,271^a$	$21,29 \pm 0,174^a$	0,999
0,10	$107,9 \pm 6,450^b$	$6,380 \pm 0,055^b$	$17,48 \pm 0,801^a$	0,999
0,20	$114,2 \pm 0,410^b$	$6,926 \pm 0,156^b$	$16,43 \pm 0,957^a$	0,999
0,25	$104,7 \pm 1,100^b$	$5,903 \pm 0,154^b$	$19,98 \pm 0,859^a$	0,995
0,55	$79,71 \pm 0,181^c$	$4,350 \pm 0,077^c$	$19,21 \pm 0,299^a$	0,996
1,00	$31,79 \pm 0,091^d$	$1,714 \pm 0,051^d$	$18,01 \pm 0,609^a$	0,997

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras “a, b, c, d” diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Com relação aos derivados da lignina foram estudados o efeito do siringaldeído, da vanilina e do ácido 4-hidroxibenzóico (AHB) sobre a produção de H_2 .

A Figura 21 mostra o efeito da adição de siringaldeído, monômero fenólico derivado da lignina, sobre a produção de H_2 .

A tabela 6 foi composta pelos parâmetros cinéticos ajustados com o modelo de Gompertz modificado para diferentes concentrações de siringaldeído como inibidor. Nota-se que a adição de siringaldeído promove um aumento significativo da fase de latência, por exemplo, a concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ aumentou em 11 horas a fase lag.

Conforme observado na tabela 6, a adição de 0,50; 1,00 e $1,50 \text{ g.L}^{-1}$ de siringaldeído promoveu uma inibição de 30, 50 e 78 % do P em relação ao controle. Para a concentração de

1,00 g.L⁻¹ de siringaldeído, a inibição encontrada neste trabalho foi superior à relatada por Quéméneur et al. (2012), Cao et al. (2010) e Tai et al. (2010), cujas inibições foram de 22,9; 23,1 e 34,8%, respectivamente. Porém, este valor é similar ao reportado por Ezeji et al (2007) que observou uma inibição de 33 % pela adição de 0,6 g.L⁻¹ de siringaldeído. As inibições da velocidade de produção de H₂ (Rm) pela adição de siringaldeído foram similares à inibição causada em P, pois 0,50; 1,00 e 1,50 g.L⁻¹ promoveu uma inibição de 18, 50 e 71% da Rm comparada ao controle, respectivamente.

Figura 21. Ensaio cinético de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de siringaldeído e 40 g.L⁻¹ de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Tabela 6. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de siringaldeído.

Siringaldeído (g.L ⁻¹)	P (mL)	Rm (mL.h ⁻¹)	λ (h)	R ²
Controle	154,3 ± 8,859 ^a	8,681 ± 0,271 ^a	21,29 ± 0,174 ^a	0,999
0,25	114,8 ± 17,71 ^b	7,050 ± 0,437 ^b	34,15 ± 3,842 ^b	0,992
0,50	107,3 ± 0,867 ^c	7,118 ± 0,825 ^b	36,90 ± 2,110 ^b	0,997
1,00	78,16 ± 16,03 ^d	4,359 ± 0,842 ^c	32,87 ± 1,207 ^b	0,983
1,50	33,20 ± 11,14 ^e	2,478 ± 0,829 ^c	41,68 ± 0,848 ^b	0,992
2,00	0 ^f	0 ^d	84 ^c	0

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras "a, b, c, d, e, f" diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,05).

A figura 22 representa os resultados de volume de H_2 acumulado em função do tempo quando a vanilina foi adicionada aos ensaios de fermentação.

Assim como realizado nos outros ensaios, os resultados da cinética de produção de H_2 (figura 22) foram ajustados com auxílio do modelo de Gompertz modificado e esses parâmetros compõem a tabela 7.

Figura 22. Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de vanilina e glicose 40 g.L^{-1} . Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Tabela 7. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de vanilina.

Vanilina (g.L^{-1})	P (mL)	Rm (mL.h^{-1})	λ (h)	R^2
Controle	$154,3 \pm 8,859^a$	$8,681 \pm 0,271^a$	$21,29 \pm 0,174^a$	0,999
0,25	$97,80 \pm 0,777^b$	$8,194 \pm 1,079^a$	$30,28 \pm 0,707^b$	0,987
0,50	$91,10 \pm 5,172^b$	$5,940 \pm 0,880^{ab}$	$36,20 \pm 0,129^c$	0,998
0,75	$71,17 \pm 5,353^{bc}$	$3,810 \pm 0,401^b$	$49,63 \pm 0,965^d$	0,999
1,00	$55,08 \pm 0,005^c$	$2,595 \pm 0,023^{bc}$	$54,95^e$	0,998
2,00	0^d	0^c	92^f	0

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras "a, b, c, d, e, f" diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$).

A vanilina promoveu uma inibição da produção de H_2 similar a do siringaldeído, pois em concentrações de 0,50; 0,75 e 1,00 g.L^{-1} o volume máximo de produção de H_2 (P) diminuiu em 41, 54 e 64% em relação ao controle, respectivamente. Em concentrações

superiores a $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina foi observado 100% de inibição da produção de H_2 . A velocidade de produção de H_2 (Rm) foi reduzida de forma similar ao P, 31, 56 e 70% para as mesmas concentrações de vanilina. Com relação à fase lag, $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ de vanilina causou um aumento de 33 horas, em relação ao controle.

O último representante dos monômeros fenólicos derivados da lignina estudado neste trabalho foi AHB. A figura 23 apresenta os resultados do ensaio cinético de produção de H_2 com concentrações desse composto que variaram de $0,15$ a $1,00 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 23. Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação com adição de diferentes concentrações de ácido 4-hidroxibenzoico em presença de 40 g.L^{-1} de glicose. Os pontos representam a média das duplicatas com os respectivos desvios da média.

Há pouca informação na literatura sobre os efeitos inibitórios do AHB, mas nesse estudo fica evidente a sua importância como inibidor dentre os compostos fenólicos derivados de material lignocelulósicos. A tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos fornecidos pelo modelo de Gompertz dos ensaios com AHB. Nota-se que a adição de baixas concentrações deste composto, $0,35$ e $0,50 \text{ g.L}^{-1}$, causou a diminuição do P em 30 % e 58 % em relação ao controle, respectivamente. Inibição similar foi encontrada para a velocidade de produção (Rm), pois $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de AHB resultou na diminuição de 54% do Rm em relação ao controle. Concentrações acima de $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ inibiram completamente a produção de H_2 .

Tabela 8. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado obtidos a partir dos ensaios cinéticos de produção de H₂ por fermentação com adição de diferentes concentrações de AHB.

Vanilina (g.L ⁻¹)	P (mL)	Rm (mL.h ⁻¹)	λ (h)	R ²
Controle	154,3 ± 8,859 ^a	8,681 ± 0,271 ^a	21,29 ± 0,174 ^a	0,999
0,15	107,2 ± 11,27 ^b	9,081 ± 0,369 ^a	26,54 ± 1,621 ^b	0,999
0,25	112,0 ± 3,944 ^b	4,817 ± 0,048 ^b	25,61 ± 0,406 ^{ab}	0,990
0,30	108,6 ± 0,908 ^b	4,771 ± 0,172 ^b	28,26 ± 0,649 ^b	0,979
0,50	65,07 ± 5,743 ^c	3,954 ± 0,563 ^b	46,53 ± 1,135 ^c	0,998
1,00	0 ^d	0 ^c	84 ^d	0

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras “a, b, c, d” diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,05).

5.2. Estimativa da CI 50

Com a finalidade de inferir um grau de inibição aos compostos inibidores testados anteriormente foi utilizado um conceito da toxicologia, seu indicador de toxicidade mais comumente usado – ou seja, a concentração efetiva de uma dada substância que inibe a metade da atividade metabólica. Os valores para a estimativa da CI 50 para os ensaios com cada inibidor foram obtidos a partir da normalização das velocidades de produção de H₂ em relação à velocidade do controle (contendo apenas glicose), conforme a equação 6 (item 4.12) e ajustados a uma linha de tendência polinomial de segunda ordem, representada na figura 24. As equações polinomiais obtidas pelo ajuste dos resultados dos Rm normalizados e as concentrações dos compostos inibidores foram utilizadas para a estimativa dos valores de CI50. Assim, a inibição causada pela adição de diferentes concentrações dos inibidores foi representada como CI 50, isto é, a concentração do inibidor que causou 50% de inibição da velocidade máxima de produção de H₂ (Rm).

O CI 50 do ácido acético encontrada nesse trabalho foi de 5,14 g.L⁻¹ (Figura 24A), valor menor do que foi relatado por Xian-Jun e Yu (2005) de 16,7 g.L⁻¹ e por Wang et al (2008) por volta de 25 g.L⁻¹ em ensaios que utilizaram cultura mista. O ácido acético é o principal ácido alifático encontrado em hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Sua concentração depende do tipo de pré-tratamento aplicado, bem como da origem da biomassa. Concentrações de ácido acético nos hidrolisados variam de 0,60 a 12,5 g.L⁻¹ e níveis de tolerância dos micro-organismos variam conforme as condições dos ensaios e a composição de microrganismos dos inóculos (HELLE et al 2003). O ácido acético pode facilmente se difundir através da membrana plasmática. Devido ao seu baixo valor de pKa (4,75) no citoplasma encontra-se na forma dissociada. Existem dois mecanismos que explicam a

inibição por ácidos fracos. O primeiro é a toxicidade pelo acúmulo do ânion no citoplasma, levando, principalmente, a um aumento da pressão de turgescência, que afeta a integridade da membrana (ROE et al., 1998). O outro mecanismo é chamado de desacoplamento, ou seja, para a sua sobrevivência a célula deve manter o pH intracelular constante, e na dissociação do ácido são gerados íons H^+ , a célula deve bombear esse excesso às custas de ATP. Com a persistência desse mecanismo há um grande gasto de ATP causando um desgaste da capacidade de bombeamento dos prótons, acidificando cada vez mais o citoplasma e levando a morte celular (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998).

Conforme a figura 24B e C os CI 50 estimados para os derivados de furano, furfural e 5-HMF foram de 0,62 e 0,48 $g.L^{-1}$, respectivamente. De acordo com a CI 50, o 5-HMF apresenta um efeito inibitório maior do que o do furfural, entretanto, em estudos com leveduras o furfural apresentou maior inibição da fermentação quando comparado ao 5-HMF (SAKAI et al., 2007). A entrada de compostos derivados de furano no citoplasma é facilitada pelas suas características físico-químicas e seu principal efeito é a inibição de enzimas NADH dependentes (como a piruvato desidrogenase), essenciais às vias metabólicas centrais (MODIG et al., 2002). A hipótese defendida por Palmqvist & Hahn-Hagerdal (2000) é que a redução do 5-HMF e furfural a álcool furfurílico, que ocorre à custa de NADH, é favorecida em detrimento da produção de H_2 , uma vez que ambas as vias metabólicas dependem de NADH. Estudos também revelam que estes compostos, em especial o HMF, que possui um grupo OH^- em sua estrutura pode formar ligações com as bases nitrogenadas do DNA (principalmente adenina e timina) causando sérios danos a essa estrutura (HUDDIN; HADI., 1995).

O furfural e o HMF são considerados menos tóxicos para leveduras do que alguns compostos fenólicos (GARCIA-APARÍCIO et al 2006.; PHILIP & ZANG, 2009). Em parte este efeito também foi observado sobre a cultura mista produtora de H_2 estudada neste trabalho. O furfural e o HMF foram menos tóxicos do que o AHB, pois apresentaram um CI 50 maior (0,62 e 0,48 $g.L^{-1}$, respectivamente) do que os CI 50 do AHB (0,38 $g.L^{-1}$). Porém, os derivados de furano apresentaram maior inibição da produção de H_2 do que a vanilina e o siringaldeído, que apresentaram CI 50 de 0,71 e 1,05 $g.L^{-1}$, respectivamente. Os compostos fenólicos podem agir na célula das seguintes maneiras: (a) aumento da permeabilidade da membrana celular; (b) inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; (c) destruição ou inativação funcional do material genético (DUARTE et al., 2005) e/ou (d) aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de

hidrogénio (H_2O_2), superóxidos (O_2^-) e radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) que podem desnaturar enzimas e provocar mutações no DNA (MIKULÁASOVÁ et al., 1990). Dentre os derivados de lignina, o AHB apresentou menor CI 50, ou seja, maior efeito inibitório, seguido pela vanilina e o siringaldeído. Seu potencial como inibidor foi o maior detectado dentre os compostos inibitórios estudados e até então era desconhecido para a produção de H_2 .

Figura 24. Velocidade relativa de produção de H_2 em função da concentração do inibidor. Nas figuras é apresentada a equação polinomial de segunda ordem obtida a partir do ajuste dos dados experimentais, calculada pela equação 6 (item 4.12). Na qual o (A) Ácido acético, (B) Furfural, (C) HMF, (D) Siringaldeído, (E) Vanilina e (F) Ácido 4-Hidroxibenzoico.

5.3. Metabólitos solúveis produzidos durante a fermentação.

A análise dos metabólitos é de importante conhecimento, pois serve como um indicador de vias metabólicas e de monitoramento da produção de H_2 . A tabela 8 apresenta as concentrações dos metabólitos solúveis investigados, quais sejam os ácidos orgânicos (acético, láctico e butírico) e o etanol produzidos durante os ensaios de produção de H_2 .

O ácido acético é o principal subproduto da produção de H_2 , mas também pode ser utilizado como fonte de carbono pela cultura mista. Este consumo pode ser observado na Tabela 1, no ensaio ao qual foi adicionado $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético e ao final foi detectado apenas $6,26 \text{ g.L}^{-1}$. Vale destacar que a adição de ácido acético promoveu um aumento na concentração de ácido láctico como metabólito. Tal comportamento não foi observado nos testes usando os demais inibidores.

O parâmetro $Y_{p/s}$, ou seja, o fator de conversão de substrato (glicose) em produto (H_2), apresentado na tabela 9 representa o rendimento da produção de H_2 , ou seja, a razão entre quantidade de H_2 produzida (em mol) pela quantidade de moles de glicose consumida. Observa-se, de uma maneira geral, que este parâmetro diminuiu com a adição de concentrações crescentes dos inibidores.

Em relação ao ácido acético, a adição de $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ diminuiu o rendimento de 1,38 para $1,13 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$, ou seja, uma diminuição de 18 %. Já em concentrações maiores de ácido acético esse efeito é mais drástico. Em concentrações de 2,50 e $5,00 \text{ g.L}^{-1}$ o rendimento foi de 0,48 e $0,37 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$, o que representa uma redução aproximada de 65 e 73% em relação ao controle, respectivamente. Resultados semelhantes a estes foram relatados por Tang et al (2011) para uma cultura pura de *Ethanoligenens harbinense* B49. Os autores observaram diminuições do rendimento de 2,2 para 1,72 e $0,64 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ pela adição de 0,5 e 5 g.L^{-1} de ácido acético, respectivamente. Para culturas mistas, Wang et al. (2008) relata diminuições menos severas em relação ao controle, de 1,01 para $0,44 \text{ mol } H_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ em concentrações de 5 g.L^{-1} de ácido acético.

Outro parâmetro apresentado na tabela 9 é a razão entre ácido acético e butírico (HAc/HBu), o qual é utilizado na literatura para avaliar o desempenho dos consórcios microbianos utilizados na produção de H_2 via fermentação. Essa razão indica a preferência por uma determinada via metabólica de produção de H_2 em detrimento da outra. Como é sabido a via de acetato gera 4 mols de H_2 por mol de glicose, enquanto a via do butirato gera apenas 2 mols de H_2 , ou seja, maiores razões HAc/HBu indicariam um maior rendimento de H_2 . Todavia esse perfil não foi observado nos ensaios que utilizaram o ácido acético como

inibidor, pois não foi possível diferenciar a quantidade de ácido acético consumida e formada durante os ensaios, por ser este um subproduto da produção de H₂.

Tabela 9. Rendimento da produção de H₂ e concentração de ácidos orgânicos e etanol nos ensaios de fermentação com a adição de diferentes concentrações dos inibidores

Inibidor (g/L)	Metabólitos solúveis da fermentação (g/L)				Razão HAc/HBu	Yp/s (mol/mol)	
	Ácido acético	Ácido butírico	Ácido láctico	Etanol			
Ácido acético	0	0,64 ± 0,13 ^a	2,29 ± 0,22 ^a	1,43 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	0,28	1,38 ± 0,13
	0,50	0,66 ± 0,06 ^a	2,27 ± 0,17 ^a	1,41 ± 0,04 ^a	0 ^b	0,29	1,13 ± 0,27
	1,00	0,95 ± 0,05 ^b	1,91 ± 0,02 ^b	1,57 ± 0,02 ^a	0 ^b	0,50	0,78 ± 0,22
	2,50	1,55 ± 0,02 ^c	2,51 ± 0,40 ^a	1,84 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^b	0,62	0,48 ± 0,10
	5,00	3,21 ± 0,87 ^d	0,87 ± 0,24 ^c	1,60 ± 0,39 ^a	0,01 ^b	3,67	0,37 ± 0,10
	10,0	6,26 ± 1,03 ^e	1,33 ± 0,25 ^c	1,38 ± 0,28 ^a	0,01 ^b	4,70	0
Furfural	0	0,35 ± 0,01 ^a	3,49 ± 0,05 ^a	0,54 ^a	1,07 ± 0,01 ^a	0,10	1,38 ± 0,13
	0,25	0,23 ± 0,01 ^b	2,14 ± 0,06 ^b	0,87 ± 0,08 ^b	1,44 ± 0,31 ^a	0,11	0,58 ± 0,09
	0,50	0,18 ± 0,04 ^b	1,66 ± 0,46 ^b	0,85 ^b	1,16 ± 0,05 ^a	0,11	0,53 ± 0,02
	1,00	0,41 ± 0,01 ^c	1,19 ± 0,02 ^b	0,27 ^c	0,53 ^b	0,35	0,35 ± 0,01
	2,00	0 ^d	0 ^c	0,25 ± 0,02 ^c	0 ^c	0	0
HMF	0	0,14 ± 0,01 ^a	1,32 ± 0,11 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,03 ^a	0,11	1,38 ± 0,13
	0,10	0,13 ± 0,01 ^a	1,31 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^b	0,64 ± 0,01 ^b	0,10	0,39 ± 0,02
	0,17	0,14 ± 0,01 ^a	1,65 ± 0,13 ^a	0,30 ± 0,05 ^b	0,27 ± 0,06 ^a	0,09	0,44 ± 0,02
	0,25	0,15 ± 0,01 ^a	2,10 ± 0,12 ^b	0,64 ± 0,01 ^c	0,56 ± 0,01 ^c	0,07	0,37 ± 0,01
	0,50	0,25 ± 0,01 ^b	5,67 ± 0,49 ^c	0,71 ± 0,01 ^d	1,15 ± 0,07 ^d	0,04	0,25 ± 0,03
	1,00	0,27 ± 0,01 ^c	4,09 ± 0,17 ^d	0,19 ± 0,03 ^a	0,68 ± 0,18 ^b	0,07	0,14 ± 0,01
Vanilina	0	0,18 ± 0,01 ^a	1,99 ± 0,01 ^a	0,24 ^a	0,01 ^a	0,09	1,38 ± 0,13
	0,25	0,13 ± 0,01 ^b	1,27 ± 0,01 ^b	0,24 ^a	4E-3 ^b	0,10	0,60 ± 0,03
	0,50	0,07 ^c	1,27 ± 0,14 ^b	0,28 ± 0,01 ^b	4,1E-3 ^b	0,06	0,61 ± 0,10
	0,75	0 ^d	0,72 ± 0,05 ^c	0,29 ± 0,01 ^b	0 ^c	0	0,42 ± 0,05
	1,00	0 ^d	0 ^d	0,10 ^c	0 ^c	0	0,31 ± 0,02
	2,00	0 ^d	0 ^d	0,06 ^d	0 ^c	0	0
Siringaldeído	0	0,12 ^a	2,08 ± 0,05 ^a	0,19 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,06	1,38 ± 0,13
	0,25	0,18 ^b	1,85 ± 0,12 ^a	0,33 ± 0,02 ^b	0,74 ± 0,06 ^b	0,10	0,72 ± 0,05
	0,50	0,23 ± 0,01 ^c	1,69 ± 0,17 ^b	0,12 ^c	0,14 ^c	0,14	0,61 ± 0,06
	1,00	0,31 ± 0,01 ^d	1,61 ± 0,17 ^c	0,09 ^d	0,19 ^c	0,19	0,46 ± 0,06
	1,50	0 ^e	0,51 ^d	0 ^e	0,22 ± 0,11 ^c	0	0,35 ± 0,01
	2,00	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0,11 ^c	0	0
Ácido 4 – hidroxibenzoico	0	0,17 ^a	1,91 ± 0,03 ^a	0,28 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,09	1,38 ± 0,13
	0,15	0,28 ^b	1,93 ± 0,04 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	0,16 ^b	0,14	0,24 ± 0,07
	0,35	0,58 ± 0,03 ^c	1,05 ^b	0,16 ± 0,01 ^c	0,14 ^b	0,54	0,21 ± 0,04
	0,50	0,26 ^b	1,45 ± 0,02 ^c	0,16 ^c	0 ^c	0,18	0,35 ± 0,10
	1,00	0,16 ± 0,01 ^a	1,71 ± 0,18 ^a	0,13 ± 0,02 ^b	0,42 ^d	0,09	0

Os valores mostrados são a diferença entre a concentração inicial e final detectada nos ensaios. Nas concentrações sem o desvio, significa que este é inferior a 10⁻³. As concentrações indicadas como “0” significam que estão fora do limite de detecção do equipamento. Yp/s: foi calculada como a razão entre mol de H₂ produzido por mol de glicose consumida.

As letras a, b, c, d, e diferentes na mesma coluna de cada inibidor representam diferença significativa nos metabólitos em diferentes concentrações de um mesmo inibidor (P<0,05).

Nos ensaios com o furfural todas as concentrações dos metabólitos diminuíram com o aumento da concentração dos inibidores. O ácido acético diminuiu de 0,35 g.L⁻¹ do ensaio

controle para 0,23 e 0,18 g.L⁻¹ nos ensaios com 0,25 e 0,50 g.L⁻¹ de furfural, respectivamente. O mesmo foi observado para a concentração de ácido butírico, que diminuiu de 3,49 g.L⁻¹ para 2,14 e 1,66 g.L⁻¹ para as mesmas concentrações de furfural. Ainda pode ser observado na tabela 9 que o furfural em concentrações de 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ diminuiu drasticamente o rendimento (Yp/s), de 1,38 para 0,53 e 0,35 mol H₂.mol⁻¹_{glicose}, respectivamente. Quéméneur et al. (2011) observaram efeitos similares sobre os rendimentos aos deste trabalho. Os autores observaram uma diminuição de 1,67 para 0,51 mols H₂.mol⁻¹_{xilose} em presença de 1,00 g.L⁻¹ de furfural. Nos resultados apresentados por Veeravalli et al. (2013) utilizando cultura mista, o rendimento diminui ainda mais de 1,89 para 0,27 mols H₂.mol⁻¹_{glicose} em concentrações de 0,75 g.L⁻¹ de furfural.

Nos ensaios com adição de HMF há uma diminuição mais severa do rendimento, quando comparado ao furfural. Em concentrações de 0,25; 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ o rendimento diminuiu de 1,38 do ensaio controle para 0,37; 0,25 e 0,14 mol H₂.mol⁻¹_{glicose}, respectivamente. Esta diminuição do rendimento foi inferior à descrita por Veeravalli et al. (2013) de 1,75 para 0,22 mol H₂.mol⁻¹_{glicose} com 0,25 g.L⁻¹ de HMF. Por outro lado foi maior do que a encontrada por Quéméneur et al. (2011), de 1,67 para 0,40 mols H₂.mol⁻¹_{xilose} na presença de 1,00 g.L⁻¹ de HMF. A razão HAc/HBu diminui com o aumento da concentração de HMF, indicando um desvio da rota metabólica do acetato para o butirato, de menor rendimento em H₂. As concentrações do ácido láctico e de etanol, os quais não estão diretamente relacionados com a via metabólica de produção de H₂, mas que diminuem o rendimento de H₂, aumentaram pela adição de HMF até 0,50 g.L⁻¹ de HMF.

Em relação aos derivados da lignina, o siringaldeído em concentrações de 0,50 e 1,00 g.L⁻¹ diminuiu o rendimento (Yp/s) de produção de H₂ de 1,38 para 0,61 e 0,46 mol H₂.mol⁻¹_{glicose}, cerca de 55 e 66% menor, respectivamente. Para estas mesmas concentrações, a vanilina diminuiu o rendimento de 1,38 para 0,61 e 0,31 mol H₂.mol⁻¹_{glicose}, respectivamente. Quéméneur et al. (2011) observou uma diminuição inferior do rendimento de H₂ na presença de 1,00 g.L⁻¹ de siringaldeído e de vanilina, 1,39 e 1,40 mol H₂.mol⁻¹_{xilose}, respectivamente, partindo de um ensaio controle de 1,67 mol H₂.mol⁻¹_{xilose}. Como pode ser observado na Tabela 9, a presença destes dois compostos diminuíram tanto a concentração do ácido acético, quanto do butírico pelo aumento de suas concentrações.

Dentre os compostos fenólicos inibidores de fermentação, o ácido 4-hidroxibenzóico (AHB), se encontra em concentrações mais baixas em hidrolisados do que o siringaldeído e a vanilina. Monnappa et al. (2013) relata que em hidrolisados, principalmente de madeira duras, o AHB é detectado entre 150 a 1250 mg.L⁻¹, faixa de concentração abordada neste trabalho. O

AHB mostrou ser um composto bastante importante no estudo dos inibidores, pois a adição de baixas concentrações 0,15 e 0,35 g.L⁻¹ de AHB diminuiu o rendimento de 1,38 para 0,24 e 0,21 mol H₂.mol⁻¹_{glucose}, uma queda de aproximadamente 82 e 84%, respectivamente.

Os dados apresentados no item 5.3 resultaram em uma publicação (SIQUEIRA; REGINATTO., 2015), que está apresentada no anexo I.

5.4. Ensaio de fermentação com uma mistura de inibidores

Os produtos de hidrólise de materiais lignocelulósicos, tais como os monossacarídeos e os inibidores de fermentação presentes nos hidrolisados não se encontram de forma isolada, mas como um conjunto de vários inibidores. Neste sentido, foram realizados ensaios de fermentação com uma combinação de compostos inibidores de forma a investigar o efeito da associação destes sobre a produção de H₂. A glicose foi o monossacarídeo utilizado como principal fonte de carbono, em concentração não limitante de 40 g.L⁻¹, assim como nos ensaios anteriores.

Foram estudadas as combinações do ácido acético com o 5-HMF, do ácido acético com o siringaldeído e do 5-HMF com o siringaldeído, além da mistura destes 3 compostos. A figura 25 exibe o volume de H₂ acumulado em função do tempo nos ensaios realizados na presença de um único inibidor (ácido acético, 5-HMF, o siringaldeído), a mistura de dois inibidores (ácido acético + 5-HMF, ácido acético+ siringaldeído, 5-HMF + siringaldeído) e a mistura dos 3 compostos. Fica evidente a diferença do efeito causado pelos inibidores de fermentação quando testados individualmente e combinados.

Figura 25. Volume de H₂ acumulado em função do tempo em ensaios de fermentação em batelada na presença de glicose 40 g/L com adição de um único inibidor e um combinação destes. Controle: apenas glicose 40g.L⁻¹; AAc: ácido acético (3260 mg.L⁻¹); 5-HMF (127 mg.L⁻¹); SRG (410 mg.L⁻¹).

De uma maneira geral, se pode observar principalmente, um aumento da fase de latência e uma diminuição da velocidade de produção, quando comparados os resultados dos ensaios com um único inibidor e com a combinação dos inibidores.

A partir dos resultados de volume de H_2 em função do tempo dos ensaios apresentados na figura 25 foram estimados os parâmetros cinéticos por meio modelo de Gompertz modificado, conforme apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado, obtidos a partir dos ensaios cinéticos de fermentação para a produção de H_2 com adição de diferentes concentrações de inibidores individuais e em associação.

Ensaio	P (mL)	Rm (mL.h ⁻¹)	λ (h)	R ²
Controle	148.7 ± 16.65 ^a	10.08 ± 0.318 ^a	15.48 ± 0.550 ^a	0.998
Ácido acético	148.0 ± 7.469 ^a	8.949 ± 0.823 ^b	16.26 ± 0.080 ^a	0.997
5-HMF	145.5 ± 6.939 ^a	8.408 ± 0.449 ^b	15.74 ± 1.074 ^a	0.997
Siringaldeído	168.2 ± 24.94 ^a	8.020 ± 0.603 ^b	26.58 ± 0.658 ^c	0.998
AAc + HMF	128.8 ± 9.045 ^a	8.109 ± 0.650 ^b	25.87 ± 0.776 ^c	0.995
AAc + SRG	128.9 ± 6.583 ^a	6.439 ± 0.753 ^c	32.68 ± 1.109 ^d	0.998
HMF + SRG	154.6 ± 24.74 ^a	7.125 ± 0.269 ^d	24.67 ± 0.583 ^c	0.994
AAc + HMF + SRG	113.5 ± 13.86 ^b	4.005 ± 0.606 ^e	26.78 ± 1.397 ^c	0.987

Os valores representam as médias das duplicatas, seguido de seu respectivo desvio.
As letras “a, b, c, d” diferentes na mesma coluna representam diferença significativa (P<0,05).

Para os ensaios contendo apenas ácido acético e 5-HMF, nas concentrações de 3260 mg.L⁻¹ e 127 mg.L⁻¹, respectivamente, não foi observada uma alteração significativa da produção máxima de H_2 (P), nem da fase lag λ (h), em relação ao ensaio controle. Porém, nestes mesmos ensaios foi observada uma diminuição de aproximadamente 20% da velocidade de produção (Rm). Comportamento semelhante foi observado no ensaio com siringaldeído com concentração de 410 mg.L⁻¹, pois esta também causou uma diminuição por volta de 20% da Rm.

Em relação à fase lag, pode-se destacar que o ácido acético e o 5-HMF quando testados individualmente não promoveram um aumento da fase lag, porém a associação destes inibidores promoveu um aumento de aproximadamente 10 horas na lag fase em relação ao controle. O siringaldeído foi o único inibidor que causou aumento da fase lag quando adicionado individualmente. Em associação com ácido acético, o siringaldeído promoveu um aumento da fase lag ainda maior de 26 para 32 horas.

O efeito da adição dos inibidores isolados e em combinação sobre a velocidade de produção de H_2 , quando comparados ao controle estão apresentados na figura 26. Como pode ser observado nos ensaios que continham ácido acético e 5-HMF (AAc + HMF) ocorreu uma

diminuição de 19,5% da velocidade de produção de H_2 (R_m), valor semelhante ao encontrado em ensaios com apenas um inibidor. Logo, considerou-se que a interação entre HMF e ácido acético promoveu apenas um efeito inibitório aditivo. Já nos ensaios contendo siringaldeído, como a combinação de ácido acético + siringaldeído (AAc + SRG) e 5-HMF + siringaldeído (HMF + SRG) foi verificada uma diminuição de 36% e 29% da R_m , respectivamente em relação ao ensaio contendo apenas siringaldeído. Deste modo a interação desses inibidores parece ser sinérgica.

Figura 26. Percentagem de inibição das velocidades máximas de produção de H_2 nos ensaios em batelada com a adição dos inibidores individualmente e em associação, em relação ao ensaio controle.

No ensaio ao qual foi adicionado os 3 inibidores, foi observada uma diminuição da R_m por volta de 60% em relação ao controle.

Não existem muitos relatos na literatura a respeito da interação entre os compostos inibidores gerados pela hidrólise de materiais lignocelulósicos. Recentemente, Liu et al. (2014) realizou ensaios de produção de H_2 com cultura mista adicionando uma combinação de 5-HMF e furfural (inibidores pertencentes a mesma classe – derivados de furano). Estes autores constataram que há um impacto negativo na velocidade de produção de H_2 pela adição destes inibidores. Porém, surpreendentemente a inibição dos compostos em conjunto foi menor do que quando testados individualmente na mesma concentração. Em um trabalho mais antigo Myers e Montgomery (1991) verificaram que o ácido acético e derivados de furanos afetaram negativamente o crescimento celular em culturas puras, de maneira que em presença de ambos os compostos a diminuição foi bem superior à causada pelos compostos individuais.

Porém, em estudos de produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae*, Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000) e Larsson et al. (1998) demonstraram que a interação inibitória entre esses dois compostos é apenas aditiva.

Na tabela 11 estão apresentadas as concentrações dos metabólitos solúveis e o rendimento de produção de H_2 dos ensaios contendo os inibidores individuais e em associação. As concentrações da glicose utilizada para o cálculo do rendimento representa a diferença entre a concentração inicial e a final. As concentrações dos metabólitos também representam a diferença entre a concentração final e a inicial nos ensaios.

Tabela 11. Rendimento da produção de H_2 e concentração de ácidos orgânicos e etanol produzidos durante os ensaios de fermentação com a adição de diferentes inibidores individuais e associados.

Ensaio	Metabólitos solúveis da fermentação (g.L ⁻¹)				Rendimento Yp/s (mol _{H₂} /mol _{Gli})
	Ácido acético	Ácido butírico	Ácido láctico	Etanol	
Controle	0,305 ± 0,007 ^a	0,670 ± 0,009 ^a	0,408 ± 0,022 ^a	3,104 ± 0,024 ^a	1,088 ± 0,023 ^a
Ácido acético	3,250 ± 0,009 ^b	2,294 ± 0,123 ^b	0,039 ± 0,015 ^b	0,508 ± 0,147 ^b	0,483 ± 0,008 ^b
5-HMF	0,292 ± 0,022 ^a	0,453 ± 0,019 ^a	0,089 ± 0,004 ^c	3,123 ± 0,477 ^a	0,491 ± 0,059 ^b
Siringaldeído	0,321 ± 0,009 ^a	1,320 ± 0,001 ^c	0,013 ± 0,001 ^b	1,530 ± 0,011 ^b	0,727 ± 0,138 ^b
AAc + HMF	0,878 ± 0,038 ^c	2,288 ± 0,100 ^{bd}	0,104 ± 0,012 ^d	0,779 ± 0,120 ^b	0,466 ± 0,077 ^d
AAc + SRG	0,816 ± 0,006 ^d	2,108 ± 0,169 ^{bc}	0,106 ± 0,002 ^d	0,692 ^b	0,377 ± 0,002 ^c
HMF + SRG	0,298 ± 0,003 ^a	1,762 ± 0,028 ^a	0,203 ± 0,001 ^c	2,761 ± 0,422 ^{ab}	0,319 ± 0,043 ^c
AAc+HMF+SGR	0,631 ± 0,025 ^e	1,536 ± 0,076 ^f	0,066 ^{bd}	1,074 ± 0,061 ^b	0,264 ± 0,004 ^e

As letras a, b, c, d, e diferentes na mesma coluna de cada parâmetro de Gompertz representam diferença significativa (P<0,05)

Como pode ser observado na tabela 11 nos ensaio com o ácido acético em associação com o 5-HMF (AAc + HMF) a concentração de ácido butírico aumentou em média $2,288 \pm 0,100$ g.L⁻¹, valor significativamente igual ao produzido pelo ensaio que continha apenas ácido acético ($2,294 \pm 0,022$ g.L⁻¹). Porém, esse valor foi 5 vezes maior do que o detectado no ensaio que continha apenas 5-HMF ($0,453 \pm 0,019$ g.L⁻¹), evidenciando que há forte influência do ácido acético na formação do ácido butírico. Por outro lado, em relação à concentração de etanol como metabólito, nos ensaios com estes dois inibidores associados foi verificada um aumento de $0,779 \pm 0,120$ g.L⁻¹, valor significativamente igual aos testes com apenas ácido acético. Entretanto, nos ensaios com apenas 5-HMF a concentração de etanol é 4 vezes menor, indicando que a adição do ácido acético também contribuiu para a formação de etanol.

Para os ensaios que continham ácido acético e siringaldeído em associação foi observada uma produção de $2,108 \pm 0,169$ g.L⁻¹ de ácido butírico, valor semelhante aos encontrados no ensaio com ácido acético apenas. Entretanto, este valor é quase duas vezes

superior aos ensaios que continham apenas siringaldeído. Isto indica mais uma vez que o ácido acético contribui para a formação do ácido butírico. Já a concentração de etanol se assemelha ao exemplo anteriormente descrito (AAc + HMF), pois o ensaio AAc + SRG produziu $0,692 \text{ g.L}^{-1}$, valor significativamente igual ao ensaio com ácido acético e aproximadamente duas vezes menor do que o ensaio com siringaldeído apenas. Assim, pode-se observar que os ensaios que contêm ácido acético associado a outro inibidor prevaleceram metabólitos presentes nos ensaios que contêm apenas ácido acético, principalmente o ácido butírico e o etanol.

O ensaio contendo HMF + SRG apresentou uma concentração de $0,298 \pm 0,003 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, valor similar ao encontrado para o ensaio controle. Porém, a concentração de ácido butírico é superior ($1,762 \pm 0,028 \text{ g.L}^{-1}$), indicando que a associação desses dois inibidores leva a preferência da rota do ácido butírico, de menor rendimento em H_2 . Outro ponto que deve ser destacados são as concentrações de etanol e de ácido láctico produzidos durante o ensaio com HMF + SRG, que foram de $0,203 \pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,761 \pm 0,422 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, valores superiores a todos os demais ensaios com associação de inibidores. Estas elevadas concentrações de etanol e ácido láctico auxiliam a explicar o baixo rendimento de produção de H_2 alcançado neste ensaio ($0,319 \pm 0,043 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$), quando comparado ao controle ($1,088 \pm 0,023 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$) e aos ensaios contendo apenas HMF ($0,491 \pm 0,059 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$) e apenas SRG ($0,727 \pm 0,138 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$). Em recente revisão a respeito dos efeitos de derivados da hidrólise de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H_2 por fermentação, Monlau et al. (2014) relaciona a presença de ácido acético com aumento da concentração de ácido láctico.

Por fim observou-se que no ensaio ao qual foi adicionado os 3 inibidores em conjunto (AAc + HMF + SRG) foi obtido o menor rendimento comparados aos demais, apenas $0,264 \pm 0,004 \text{ mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{glicose}}$ e representa dentre todas as combinações a que mais se assemelha a um hidrolisado lignocelulósico real. Estes resultados demonstram que concentrações relativamente baixas de inibidores causam uma elevada inibição da produção de H_2 pela cultura mista estudada, e que as combinações entre os inibidores acentuou ainda mais este efeito. Portanto, a utilização de hidrolisados de materiais lignocelulósicos depende do desenvolvimento de métodos de hidrólise que diminuam a formação destes compostos, ou de métodos de pós-tratamento dos hidrolisados que amenizem este efeito e tornem os hidrolisados substratos aptos à fermentação.

5.5. Ensaio de produção de H_2 com um hidrolisado de bagaço de cana

Foram realizados ensaios de fermentação para investigar a possibilidade de utilização de um hidrolisado de bagaço de cana como substrato para a produção de H_2 por fermentação. A figura 27 apresenta os resultados dos ensaios de produção de hidrogênio, nos quais o hidrolisado (L), o hidrolisado + resíduo sólido do bagaço (L+S), hidrolisado + resíduo sólido do bagaço + enzima (L+S+E), apenas o resíduo sólido do bagaço (S), o resíduo sólido do bagaço + enzima (S+E) e por fim o hidrolisado tratado com carvão ativado (Hid + Carvão) foram utilizados como substratos. O controle foi composto por uma solução de glicose contendo na mesma concentração de açúcares redutores do hidrolisado (cerca de 20 g.L^{-1}).

Figura 27. Ensaio cinético de produção de H_2 por fermentação em diferentes ensaios com hidrolisado lignocelulósico.

Nota-se que no ensaio que continha o hidrolisado líquido, salvo aquele tratado com carvão ativado, não foi observada a produção de H_2 . Em ensaio com o bagaço residual após o pré-tratamento ácido (S) e o ensaio com o bagaço residual com enzima (S+E) houve a produção de hidrogênio, evidenciando que o pré-tratamento ácido tornou o bagaço resultante em um resíduo fermentável. Por fim, no teste utilizando o hidrolisado após tratamento com carvão ativado (item 4.8.2), foi obtido um volume de H_2 superior ao do teste controle.

Os parâmetros cinéticos dos ensaios de fermentação foram obtidos por meio do ajuste do modelo de Gompertz modificado e compõem a tabela 12. Com base nestes valores pode-se

destacar que no ensaio com o hidrolisado tratado com carvão ativado ocorreu um aumento aproximado de 25% do volume máximo de H_2 (P), em relação ao controle, porém a velocidade de produção (Rm) foi 16,5% menor. A utilização do hidrolisado também aumentou a fase lag em relação ao ensaio controle, por volta de 50 h, mesmo depois do tratamento com o carvão ativado.

Tabela 12. Parâmetros do modelo de Gompertz modificado, obtidos a partir dos ensaios cinéticos de fermentação para produção de H_2 utilizando hidrolisado de bagaço de cana e bagaço pré-tratado como substrato.

Ensaio	P (mL)	Rm (mL.h ⁻¹)	Fase-Lag (h)	R ²
Controle	91,17 ± 3,989 ^a	7,255 ± 1,178 ^a	23,57 ± 0,274 ^a	0,996
L	0 ^b	0 ^b	0 ^b	--
L + S	0 ^b	0 ^b	0 ^b	--
L + S + E	0 ^b	0 ^b	0 ^b	--
S	27,56 ± 0,099 ^c	5,597 ± 0,588 ^c	48,37 ± 0,948 ^c	0,990
S + E	35,86 ± 2,402 ^d	5,932 ± 0,152 ^c	47,58 ± 0,263 ^c	0,996
Hidro + Carvão	114,6 ± 2,667 ^e	6,047 ± 0,021 ^c	73,38 ± 0,149 ^d	0,998

As letras a, b, c, d, e diferentes na mesma coluna de cada parâmetro de Gompertz representam diferença significativa (P<0,05)

Pesquisas demonstram que o uso de hidrolisados causa o retardamento do crescimento celular levando a uma diminuição significativa do rendimento de H_2 , devido a uma perda de açúcares totais com a formação de inibidores de fermentação (CHEN et al., 2013).

Para entender melhor o comportamento observado nos ensaios de fermentação foi analisada a composição química do hidrolisado de bagaço de cana e do bagaço pré-tratado em termos de concentração de açúcares e de inibidores no início dos ensaios, cujos resultados se encontram nas tabelas 13 e 14, respectivamente.

Tabela 13. Concentrações de monossacarídeos e açúcares redutores totais (ART) nos ensaios com hidrolisados e com bagaço pré-tratado

Ensaio	ART (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)	Arabinose (g.L ⁻¹)
Controle	20,81 ± 1,935 ^a	19,93 ± 1,945 ^a	0 ^a	0 ^a
L	19,61 ± 2,351 ^a	3,750 ± 0,786 ^b	3,703 ± 0,034 ^b	2,730 ± 0,797 ^b
L + S	18,72 ± 2,762 ^a	2,748 ± 0,032 ^b	7,460 ± 0,211 ^c	2,042 ± 0,023 ^b
L + S + E	20,42 ± 0,923 ^a	3,981 ± 0,080 ^b	7,029 ± 0,227 ^c	2,101 ± 0,120 ^b
S	6,712 ± 2,172 ^b	0,640 ± 0,094 ^c	1,492 ± 0,029 ^d	0 ^a
S + E	7,692 ± 2,512 ^b	0,574 ± 0,013 ^c	1,185 ± 0,050 ^e	0 ^a
Hidro + Carvão	16,82 ± 2,082 ^a	3,259 ± 0,030 ^b	1,981 ± 0,106 ^f	0,876 ± 0,022 ^c

As letras a, b, c, d, e diferentes na mesma coluna de cada parâmetro representam diferença significativa (P<0,05)

Conforme apresentado pela tabela 13, todos os substratos utilizados apresentaram uma concentração de ART suficiente para produção de H_2 . Os hidrolisados líquidos apresentaram concentração de ART variando de 18,72 ± 2,762 até 20,42 ± 0,923 g.L⁻¹ e com valores consideráveis de monossacarídeos, especialmente de xilose. Para ensaios contendo bagaço

residual pré-tratado (S) e bagaço residual pré-tratado + enzima (S+E) foi detectada uma concentração de ART solúvel ($6,712 \pm 2,172$ e $7,692 \pm 2,512$ g.L⁻¹, respectivamente) e menor de monossacarídeos tais como a glicose ($0,640 \pm 0,094$ e $0,574 \pm 0,013$ g.L⁻¹, respectivamente) e xilose ($1,492 \pm 0,029$ e $1,185 \pm 0,050$ g.L⁻¹, respectivamente). Mesmo com concentrações de ART e monossacarídeos inferiores aos apresentados pelos outros substratos, foi possível produzir H₂ com os bagaços pré-tratados (S e S+E), sem a necessidade do tratamento com carvão ativado. Fato que indica que a presença de inibidores é um fator determinante para produção de H₂ por fermentação.

Como pode ser observado nas tabelas 13 e 14 o tratamento do hidrolisado com carvão ativado diminuiu, não apenas as concentrações dos inibidores (tabela 14), mas também dos ART e monossacarídeos, em especial a xilose (tabela 13). Entretanto, apenas após o tratamento com carvão foi possível chegar a volumes de H₂ similares ao controle, indicando a importância do tratamento com carvão.

A tabela 14 apresenta as concentrações de ácido acético, furfural e 5-HMF, analisados nos substratos antes dos ensaios de fermentação.

Tabela 14. Concentração de ácido acético, furfural e 5-HMF nos ensaios com hidrolisado no início dos testes.

Ensaio	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Furfural (mg.L ⁻¹)	5-HMF (mg.L ⁻¹)
Controle	0 ^a	0 ^a	0 ^a
L	$1,553 \pm 0,041$ ^b	$83,40 \pm 2,203$ ^b	$8,656 \pm 0,007$ ^b
L + S	$2,302 \pm 0,019$ ^c	$156,9 \pm 0,108$ ^c	$17,10 \pm 0,243$ ^c
L + S + E	$2,189 \pm 0,016$ ^d	$163,1 \pm 4,578$ ^d	$17,14 \pm 0,394$ ^c
S	$0,020 \pm 0,001$ ^e	$0,733 \pm 0,191$ ^e	$1,595 \pm 0,054$ ^d
S + E	$0,176 \pm 0,003$ ^f	$0,822 \pm 0,056$ ^e	$2,102 \pm 0,001$ ^e
Hidro + Carvão	$0,612 \pm 0,025$ ^g	0 ^f	0 ^f

As letras a, b, c, d, e, f e g diferentes na mesma coluna de cada parâmetro representam diferença significativa (P<0,05)

A concentração de ácido acético detectado no hidrolisado (L) foi de $1,553 \pm 0,041$ g.L⁻¹. Se compararmos este valor com o estudo realizado anteriormente (item 5.1, tabela 3), esta concentração de ácido acético representaria uma diminuição superior a 30% da produção máxima de H₂. Nos substratos L+S e L+S+E a concentração desse composto foi de aproximadamente 2,5 g.L⁻¹, valor que ocasionava uma diminuição de 43,2% na produção máxima, segundo os estudos anteriores. Já para os ensaios que produziram H₂ (S e S+E) as concentrações de ácido acético encontradas são bem inferiores do que os testados anteriormente.

Para o furfural verifica-se que as concentrações encontradas nos substratos são inferiores às testadas anteriormente (item 5.1, tabela 4). A menor concentração de furfural

testada no item 5.1 ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) era aproximadamente 3 vezes menor do que a concentração detectada no L e 1,5 vezes menor do que em L+S e L+S+E. Nos substratos S e S+E foram detectadas concentrações 340 vezes menor do que a menor concentração testada no item 5.1 para o furfural.

Em relação ao 5-HMF, a concentração encontrada em L é 11 vezes menor do que a menor concentração desse composto estudada neste trabalho no item 5.1. Já em L+S e L+S+E a concentração média de 5-HMF é cerca de 6 vezes menor do que a menor concentração estudada. Esses dados vêm por confirmar e dar propriedade ao estudo, pois mostra que existe uma relação sinérgica complexa entre esses inibidores e que a presença desses inibidores inviabilizam o uso do hidrolisado para produção de H_2 .

Estes resultados sugerem fortemente, confirmando o que foi observado durante este estudo, que não é apenas um único inibidor o responsável pela inibição da produção de H_2 , mas o conjunto deles. Estudos relacionados ao potencial de inibição de compostos derivados da hidrólise de matérias lignocelulósicas são limitados na quantidade de compostos investigados e nas suas interações. Além dos inibidores orgânicos, como os estudados aqui, segundo Behera et al (2014), a presença de metais nos hidrolisados, como potenciais inibidores da fermentação, tem sido negligenciada. Portanto, um estudo mais aprofundado com relação à caracterização química de hidrolisados de materiais lignocelulósicos é necessário para a maior compreensão dos responsáveis pela toxicidade destes hidrolisados.

6. CONCLUSÕES

O estudo provou que é possível a utilização de uma cultura mista advinda de um sistema de tratamento de vinhaça para produção de H_2 por fermentação, após um simples tratamento térmico da cultura.

Este estudo revela que alguns derivados da hidrólise de materiais lignocelulósicos inibem a produção fermentativa de H_2 em diferentes graus. Dentre os compostos inibidores testados o ácido 4-hidroxibenzóico apresenta o maior efeito inibitório, seguido pelo 5-HMF e furfural, e dos outros derivados da lignina, siringaldeído e vanilina. O ácido acético apresentou o menor efeito inibitório sobre a produção de H_2 , quando testado isoladamente. Porém, a associação de ácido acético com 5-HMF e siringaldeído promoveu uma inibição maior da produção de H_2 do que quando estes compostos foram testados isoladamente,

comprovando a existência de efeitos aditivos e/ou sinérgicos destes compostos sobre a inibição da produção de H_2 .

Não foi possível utilizar o hidrolisado ácido de bagaço de cana para a produção de H_2 , sem um prévio tratamento por carvão ativado, mas o pré-tratamento ácido tornou a bagaço apto à fermentação.

O tratamento do hidrolisado de bagaço de cana com carvão ativo, diminuiu a concentração de açúcares, mas também a concentração de compostos inibidores do hidrolisado, tornando-o um substrato mais promissor do que a glicose para a produção de H_2 por fermentação.

Este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento sobre a inibição de alguns compostos constituintes dos hidrolisados de materiais lignocelulósicos sobre a produção de H_2 por fermentação, tornando cada vez mais viável o uso destes materiais para uma produção sustentável de H_2 .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando células produzidas pelo fungo *Aspergillus Niger*. 106 p. Dissertação (mestrado) – Centro de Engenharia e Ciências exatas. Universidade do Oeste do Paraná. Toledo. 2010.

ALVES, Regina Estevam. Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-11082011-143629/>>. Acesso em: 2014-12-22.

ANWARA, Z., GULFRAZB, M., IRSHADA, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 7 (2). p 163–173. 2014.

APHA, AWWA, WEF.. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19th. edn. American Public Health Association. Washington, DC, 1995.

ASGHER, M., AHMAD, Z., IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**. v 44, 488-495. 2013.

ASGHER, M., SHAHID, M., KAMAL, S., IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic**, v 101. p 56-66. 2014.

ANTAL, M. J., LEESOMBOON, T., MOK, W.S., RICHARDS, G. N. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from d-xylose **Carbohydrate Resource**. v 217. p 71–85.1991.

AHMAD, T. KENNE, L., OLSSON, K. THEANDER, O. The formation of 2-furaldehyde and formic acid from pentoses in slightly acidic deuterium oxide studied by ¹H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Resource**. v 276. p 309– 320. 1995.

BADSHAH, M. Evaluation of process parameters and treatments of different raw materials for biogas production. Tese de Doutorado. University of Lunds; 2012.

BALAT, H.; KIRTAY, E. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35, p 7416. 2010.

BARAKAT, A., MONLAU, F., STEYER, J.P., CARRERE, H. Effect of lignin derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**. v 104. p 90-99. 2012.

BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v 36. p 91–106. 2014.

BRODEUR, G., YAU, E., BADAL, K., COLLIER, J., RAMACHANDRAN, K.B., RAMAKRISHNAN, R. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**. v 2011. 17 p. 2011.

BUITRÓN, G., CARVAJAL, C. Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. **Bioresource Technology**. v. 101 (23): 9071-9077. 2010.

CARERE, C.R., SPARLING, R., CICEK, N., LEVIN, D.B. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International Journal Molecular Sciences**. v 9. p 134213–134260. 2008.

CAO, G.L., GUO, W.Q., WANG, A.J., ZHAO, L., XU, C.J., ZHAO, Q.L. Enhanced cellulosic hydrogen production from lime-treated cornstalk wastes using thermophilic anaerobic microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37 (17). p 13161-13166. 2012.

CAO, G., REN, N., WANG, A., LEE, D.J., GUO, W., LIU, B. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.34(17). p 7182-7188. 2009.

CHAUBEY, R., SAHU, S., JAMES, O.O., MAITY, S. A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources.

CHAGANTIA, S. R., LALMANB, J. A., HEATH, D. D. 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37(11). p 9002–9017. 2012.

CHENG, X.Y., LIU, C.Z. Fungal pretreatment enhances hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stalk. **Applied Energy**. v 91(1). p 1-6. 2012.

DADI, A.P., VARANASI, S., SCHALL, C.A. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. **Biotechnology Bioengineering**. v 95. p 904–910. 2006.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 26(1): 13-28, 2008.

DE VRIJE, T., REITH, J.H., WIJFFELS, R.H., BARTEN, H. Biomethanation and biohydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation. p. 103–23. 2003.

DATAR,R.; HUANG,J.; MANESS,P.C.; MOHAGHEGLI,A.; CZERNIK,C.; CHORN, T,E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32 (8): 932–939, 2007.

DONGA, L., ZHENHONGA, Y., YONGMINGA, S., XIAOYINGA, K., YU, Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 34(2). p 812–820. 2009.

DUARTE, L.C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F.M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 413-425, 2005.

ELSHARNOUBY, O.; HAFEZ, H.; NAKHLA, G.; NAGGAR, M., H., N. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 38, p. 4945-4966, 2013.

ENDLER, A., PERSSON, S. Cellulose Synthases and Synthesis in Arabidopsis. **Molecular Plant**. v. 4(2). p 199-211. 2011.

EZEJI, T., QURESHI, N., BLASCHEK, H.P. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 97(6):1460–1469, 2007.

FANGKUM, A., REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 36(14). p 8687-8696. 2011.

FERNANDES, A.N., THOMAS, L.H., ALTANER, C.M., CALLOW, P., FORSYTH, V.T., APPERLEY, D.C., KENNEDY, C.J., JARVIS, M.C. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.108(47). p 1195-203. 2011.

FUKUZAKI, S., NISHIO, N., SHOBAYASHI, M., NAGAI, S. Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Appl Environ Microbiol.* **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56(3): 719–723, 1990.

GHAFFAR, S.H., FAN, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. **Biomass and Bioenergy**. v. 57. p 264–279. 2013.

GIRISUTA, B. Levulinic Acid from Lignocellulosic Biomass. Tese (doutorado) University of Groningen. Reino Unido. 2007.

GIOANNIS, G., MUNTONI, A., POLETTINI, A., POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. **Waste Management**. v. 33 (6): 1345-1361. 2013.

GONZALEZ-GIL, G.; KLEEREBEZEM, R.; LETTINGA, G. Assessment of metabolic properties and kinetic parameters of methanogenic sludge by on-line methane production rate measurements. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58(2): 248-254. 2002.

GUPTA, R. Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factors influencing the cellulose hydrolysis [Ph.D. Thesis]. Auburn, Alabama: Auburn University; 2008.

HAN, H., WEI, L., LIU, B., YANG, H., SHEN, J. Optimization of biohydrogen production from soybean straw using anaerobic mixed bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy** v.37(17). p 13200-13208. 2012.

HAO, X., WENXIAO, P., RUOXI, W., DONGJU, Z., CHENGBU, L. Understanding the mechanism of cellulose dissolution in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid via

quantum chemistry calculations and molecular dynamics simulations. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**. v 26. p 329.2012.

HAMELINCK, C. N., VAN HOOIJDONK, G., FAAIJ, A.PC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. **Biomass and Bioenergy**. v. 28, p 384-410. 2005.

HARMSSEN, P., HUIJGEN, W., BERMUDEZ-LOPEZ, L., BAKKER, R. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, 1st ed. Wageningen: **Food & Biobased Research**. 2010.

HARMSSEN. P., HUIJGEN. W., BERMUDEZ, L., BAKKER, R. LITERATURE review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass Wageningen UR Food & Biobased Research. 2010.

HAWKES, F.R., DINSDALE, R., HAWKES, D.L., HUSSY, I. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 27 (11e12). p 1339-1347. 2002.

HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xilose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33 (6): 786-792, 2003.

JONSSON, L.J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**. v 6. p 16. 2013.

JUNG, K.W., KIM, D.H., SHIN, H.S. Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions. **Bioresourse Technology**. v. 102(3). p 2745-2750. 2011

KANG, J.H.; KIM, D.; LEE, T.J. Hydrogen production and microbial diversity in sewage sludge fermentation preceded by heat and alkaline treatment. **Bioresourse Technology**, v.109, p. 239–243, 2012.

KANG, S., LI, X., FAN, F., CHANG, J. Hydrothermal conversion of lignin: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v 27. p 546–558. 2013.

KAPDAN, I.K., KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p 569–582, 2006

KAWAGOSHI, Y., OKI, Y., NAKANO, I., FUJIMOTO, A., TAKAHASHI, H., Biohydrogen production by isolated halotolerant photosynthetic bacteria using long-wavelength light-

emitting diode (LW-LED). **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35(24). p 13365–13369. 2010.

KHANNA, N., KUMAR, K., TODI, S., DAS, D. Characteristics of cured and wild strains of *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 for the improvement of biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37 (16), p. 11666-11676, 2012

KIM, J.P; KIM, K.R.; CHOI, S.P.; HAN, S.J.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Repeated production of hydrogen by sulfate re-addition in sulfur deprived culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37. p 13387–13391. 2010

KIM, T.H., GUPTA, R., LEE, Y.Y. Pretreatment of biomass by aqueous ammonia for bioethanol production. In: *Biofuels: methods and protocols*. v. 581. p 79–91.2009.

KIRTAY, E. Recent advances in production of hydrogen from biomass. **Energy Conversion and Management**, v. 52 (4). p. 1778-1789.2011.

KRISHNA, R.H. Review of Research on Production Methods of Hydrogen: Future Fuel. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**. v. 1(2). p 84-93. 2013.

KONGJAN, P., ANGELIDAKI I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70°C) by mixed culture fermentation. **Water Research**. v 43(5). p 1414–1424. 2009.

KOTAY, M.K., DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource - prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 33. p 258-263. 2008.

KUMAR, R., HU, F., SANNIGRAHI, P., JUNG, S., RAGAUSKAS, A. J., WYMAN, C. E. Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion. **Biotechnology and Bioengineering**. v 110. p 737–753. 2013.

LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B., TENGBORG, C., STENBERG, K., ZACCHI, G., NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**. v 24. p 151-159. 1998.

LAKANIEMI, A.M., TUOVINEN, O.H., PUHAKKA, J.A. Anaerobic conversion of microalgal biomass to sustainable energy carriers – A review. **Bioresource Technology**. v. 135. p 222-231. 2013.

LAY, C.H.; LIN, H.C., SEM, B.; CHU, C.Y.; LIN, C.Y. Simultaneous hydrogen and ethanol production from sweet potato via dark fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 27, p. 155–164, 2012.

LEE, D-J., SHOW, K-Y., SUD, A. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. **Bioresource Technology**. v. 102. p 8393–8402. 2011

LI, X. Bioethanol production from lignocellulosic feedstock using aqueous ammonia pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation (SSF): Process development and optimization [M.Sc. thesis]. Ames, Iowa: Department of Agricultural Engineering, Iowa State University; 2010.

LIN, Y.H; ZHENG, H.X.; JUAN, M.L. Biohydrogen production using waste activated sludge as a substrate from fructose-processing wastewater treatment. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, p. 221–230, 2012.

LISSENS, G., THOMSEN, A.B., DE BAERE, L., VERSTRAETE, W., AHRING, B.K. Thermal wet oxidation improves anaerobic biodegradability of raw and digested biowaste. **Environmental Science & Technology**. v 38. p 3418–3424. 2004.

LIU, C.M., CHU, C.Y., LEE, W.Y., LI, Y.C., WU, S.Y., CHOU, Y.P. Biohydrogen production evaluation from rice straw hydrolysate by concentrated acid pre-treatment in both batch and continuous systems. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 38(35). p 15823-15829. 2013.

LIU, Z.L., SLININGER, P.J., DIEN, B.S., BERHOW, M.A., KURTZMAN, C.P., GORSICH, S.W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5- hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 31(8). p 345-352. 2004.

LIU, Z., ZHANG, C., WANG, L., HE, J., LI, B., ZHANG, Y., XING, X.H. Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource Technology**. v 175. p 152–159. 2015.

LO, Y.C., SU, Y.C., CHENG, C.L., CHANG, J.S. Biohydrogen production from pure and natural lignocellulosic feedstock with chemical pretreatment and bacterial hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 36(21). p 13955-13963. 2011.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 20, 75-81, 1998.

MATHEWS, J., WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34, p 7404. 2009.

MAYORGA, S.G., HUFTON, J.R., SIRCAR, S.,GAFFNEY.T.R. Sorption enhanced reaction process for production of hydrogen, Air Products and Chemicals, **Inc. Air Products Cooperative Agreement Instrument**. 1997. Disponível: www.osti.gov.

MAZLOOMI, K., SULAIMAN, N. B., MOAYEDI, H. Electrical Efficiency of Electrolytic Hydrogen Production. **International Journal of Electrochemical Science**. v. 7. p 3314 – 3326. 2012.

MENON, V., RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 38(4), p 522-550. 2012.

MIKULÁASOVÁ, M., VODNY, S., PEKAROVICOVÁ, A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. **Biomass**. v.29(10) 719-721, 1990.

MIRAHMADI, K., KABIR, M.M., JEIHANIPOUR, A., KARIMI, K., TAHERZADEH, M.J. Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. **Bioresources**. v 5(2). p 928–938. 2010.

MODIG, T., LIDEN, L., TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**. v. 363: 769–776. 2002.

MONLAU, F., AEMIG, Q., TRABLY, E., HAMELIN, J., STEYER, J.P., CARRERE, H. Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. **International Journal of Hydrogen Energy**. 2013. v 38(28). p 12273-12282. 2013.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G.S., NAJAFI, G.H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v 27. p 77–93. 2013.

MOSIER, N., HENDRICKSON, R., BREWER, M., HO, N., SEDLAK, M., DRESHEL, R. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v 125. p 77–97. 2005.

MONNAPPA, A.K., LEE, S., MITCHELL, R.J. Sensing of plant hydrolysate-related phenolics with an aaeXAB: luxCDABE bioreporter strain of *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**. v. 127: 429–434. 2013.

MYERS, R. H., MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimisation using designed experiments. Editora Wiley. 1991

NALLAPETA, S., NIGAM, V.K., SURVAJAHALA, P., MOHAN, K. Screening and selection of white rot fungi for biological delignification of agricultural residues. **International Journal Advanced Biotechnology Resources**. v 3:790–796. 2012.

NIKLAS, M.; JAKOB, H.; MATS, K.; RINALDI, R.; SCHÜTH, F. Catalytic milling: A new entry point for lignocellulose biorefineries. Max-Planck-Institut für Kohlenforschung. Forschungsbericht 2013.

NING, Y. Y., JIN, D. W., SHENG, G. P., HARADA, H., SHI, X. Y., Evaluation of the stability of hydrogen production and microbial diversity by anaerobic sludge with chloroform treatment. **Internacional. Journal Renewable Energy**, v.38, p. 253-257, 2012.

NIU., K., ZHANG., X., TAN, W-S., ZHU, M-L. Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumoniae* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35, p 71–80. 2010.

NTAIKOU, I. KOUTROS, E. KORNAROS, M. Valorisation of wastepaper using the fibrolytic/hydrogen producing bacterium *Ruminococcus albus*. **Bioresource Technology**, v. 100 (23): 5928–5933, 2009.

NTAIKOU, I., ANTONOPOULOU, G., LYBERATOS, G., Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. **Waste Biomass Valorization**. v.1. p 21-39. 2010.

OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Quimica Nova*. v 33(7). p 1549-1558. 2010

O-THONGA, S., HNIMANB, A., PRASERTSANB, P., IMAI., T. Biohydrogen production from cassava starch processing wastewater by thermophilic mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 36(5). p 3409–3416. 2011.

OZKAN, L., ERGUDER, T.H., DEMIRER, G.N. Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield. **International Journal of Hydrogen Energy** v 36(1). p 382-389. 2011.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**. v 74(1). p 17-24. 2000.

PAN, X., XIE, D., YU, Y.W. The bioconversion of mountain pine beetle-killed Lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. **Biotechnology Bioengineering**. v 101. p 39–48. 2008

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

PEIXOTO, G., PANTOJA-FILHO, J. L. R., AGNELLI, J. A. B., BARBOZA, M., ZAIAT, M. Hydrogen and Methane Production, Energy Recovery, and Organic Matter Removal from Effluents in a Two-Stage Fermentative Process. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 168(3): 651-671, 2011.

PERERA, K.R.J., KETHEESAN, B., ARUDCHELVAM, Y., NIRMALAKHANDAN, N. Fermentative biohydrogen production II: net energy gain from organic wastes. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37 (1).p 167-178. 2012

PHILIP, T.P., ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**. v.16 (4): 743 – 762, 2009.

PHOWANA, P., DANVIRUTAI, P. Hydrogen production from cassava pulp hydrolysate by mixed seed cultures: Effects of initial pH, substrate and biomass concentrations. **Biomass and Bioenergy**. v 64. p 1–10. 2014

PHOWAN, P., REUNGSANG, A., DANVIRUTAI, P. Bio-hydrogen production from cassava pulp hydrolysate using co-culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. **Biotechnology**. v. 9(3). p 348-354. 2010.

QUEMENEUR, M.; HAMELIN, J., BARAKAT, A., STEYER, J. P., CARRERE, H., TRABLY, E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 37(4): 3150-3159, 2012.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E., FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. Biotechnology Research Centre, Autonomous University of Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. Capítulo 6. 2013.

RAN, C.Q., ZHANG, F.J., SUN, H.J., ZHAO, B.D. Effect of culture medium on hydrogen production by sulfur-deprived marine green algae *Platymonas subcordiformis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 14. p 835-841. 2009.

RASMUSSENA, H., SØRENSENA, H. R., MEYERB, A.S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**. v. 385(19). p 45–57. 2014.

RIA-MILLATI, I., SYAMSIAH, S., NIKLASSON, C., CAHYANTO, M.N., LUNDQUIST, K., TAHERZADEH, M.J. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. **Bioresources**. v 6. p 1–36. 2011.

ROE, A.J., MCLAGGAN, D., DAVIDSON, I., O'BYRNE, C., BOOTH, I.R. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. **Journal of Bacteriology**. v. 180:767-772, 1998.

ROSA, M.F.; SOUZA-FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, M.C.B.; MORAIS, J.P.S.; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. Resumos do II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA, Foz do Iguaçu, Brasil, 2011.

ROSTRUP-NIELSEN, J.R., HANSEN, J.H.B. CO₂-reforming of methane over transition metals. *Journal of Catalysis*. v 144(1). p 38–49. 1993

RUGGERI, B., TOMMASI, T. Efficiency and efficacy of pretreatment and bioreaction for bio-H₂ energy production from organic waste. **International Journal of Hydrogen Energy** v 37(8), p 6491-6502.2012.

SÁ, L. R. V., CAMMAROTA, M. C., FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Química Nova**. v.37 (5). 2014.

SCHARA, G.V., MAEDA, T., WOOD, T.K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbiology Biotechnology**. v 1. p 107-125. 2008.

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; OKINO, S.; ICHIHASHI, O.; KAWAGUCHI, H.; WATANABE T. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73 (7): 2349-2353, 2007.

SARAPHIROMA, P., REUNGSANG, A. Biological hydrogen production from sweet sorghum syrup by mixed cultures using an anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). **International Journal of Hydrogen Energy**. v 36(14).p 8765–8773. 2011.

SARIPANA, A. F., REUNGSANG, A. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose for bio-hydrogen production by anaerobic mixed cultures in elephant dung. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 39(17). p 9028–9035. 2014.

SARITHA, M., ARORA, A., LATA. Biological pretreatment of lignocellulosic substrate for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian Journal of Microbiology**. v 52(2). p 122-130.2012.

SEN, B., SUTTAR, R.R. Mesophilic fermentative hydrogen production from sago starch-processing wastewater using enriched mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37(20). p 15588–15597. 2012.

SHANMUGAMA, S. R., CHAGANTIB, S. R., LALMANA, J. A., HEATH, D. Using a statistical approach to model hydrogen production from a steam exploded corn stalk

hydrolysate fed to mixed anaerobic cultures in an ASBR. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 39. p 10003–10015. 2014.

SHARMA, R., PALLED, V., SHARMA-SHIVAPPA, R.R., Osborne, J. Potential of potassium hydroxide pretreatment of switchgrass for fermentable sugar production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v 169. p 761–772. 2013.

SIERRA, R., GRANDA, C.B., HOLTZAPPLE, M.T. Lime pretreatment. *Biofuels: methods and protocols*. p. 115–24. 2009

SILVERSTEIN, R.A., CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R.R. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**. v 98. p 3000–3011. 2007.

SINGH, L., WAHID, Z. A. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v 25. p 70–80. 2015.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 7460–7478, 2011.

SOUZA, R. L., YU, H., RATABOUL, F., ESSAYEM, N. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) Production from Hexoses: Limits of Heterogeneous Catalysis in Hydrothermal Conditions and Potential of Concentrated Aqueous Organic Acids as Reactive Solvent System. **Challenges**. v 3. p 212–232. 2012.

STÅHLBERG, T., FU, W., WOODLEY, J. M. RIISAGER, A. "Synthesis of 5-(Hydroxymethyl)furfural in Ionic Liquids: Paving the Way to Renewable Chemicals" **ChemSusChem**. v 4, p 451–458. 2011

STAŃCZYK. K., KAPUSTA. K., WIATOWSKI. M., ŚWIĄDROWSKI. J., SMOLIŃSKI. A., ROGUT. J., KOTYRBA. A. Experimental simulation of hard coal underground gasification for hydrogen production. **Fuel**. v . 91(1).p 40–50. 2012

SUWANSAARD, M., CHOORIT, W., ZEILSTRA-RYALLS, J.H., PRASERTAN, P. Phototropic H₂ production by a newly isolated strain of *Rhodospseudomonas palustris*. **Biotechnology Letters**. v. 32 (11). p 1667–1671. 2010.

TABIL, L., ADAPA, P., KASHANINEJAD, M. Biomass feedstock pre-processing-Part-1: Pretreatment. In: M.A.D.S. Bernardes, editor. *Biofuel's engineering process technology*. **Biofuel's Engineering Process Technology**. p. 411–438 (Chapter 18). 2011.

TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal Molecular Sciences**. v 9. p 1621–1651. 2008.

TAI, J., ADAV, S. S., SU, A., LEE, D.J. Biological hydrogen production from phenol-containing wastewater using *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 35 (24): 13345 – 13349, 2010.

TALEBNIA, F., KARAKASHEV, D., ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**. v 101. p 4744–4753. 2010.

UDDIN, S., HADI, S.M. Reaction of furfural and methylfurfural with DNA: use of single-strand-specific nucleases. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology** . v.29(10): 719-721, 1995.

URSÚA. A., GANDÍA. L. M., SANCHIS. P. Hydrogen Production From Water Electrolysis: Current Status and Future Trends. **IEEE Xplore**. v. 100(2). p 410 – 426. 2012.

VAAJE-KOLSTAD, G., WESTERENG, B., HORN, S.J., LIU, Z., ZHAI, H., SORLIE, M., EIJSINK, V.G.H. An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. **Science**. v 330(6001). p 219-22. 2010.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; POGGI-VARALDO, H.M. Hydrogen production by fermentative consortia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 1000-1013, 2009.

VEERAVALLI, S. S., CHAGANTI, S. R., LALMAN, J.A., HEATH, D. D. Effect of furans and linoleic acid on hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 38:12283–12293, 2013.

WALTON, S., VAN HEININGEN, A., VAN WALSUM, P. Inhibition effects on fermentation of hardwood extracted hemicelluloses by acetic acid and sodium. **Bioresource Technology**. v. 101(6). p 1935–1940. 2010.

WANG, Y., ZHAOA, Q. B., YANG, M., YUA, H.Q., HARADAB, H., LIB, Y.Y. Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 33 (4): 1164-1171, 2008.

WANG. Z., HUANG. H., LIU. H., ZHOU. X. Self-sustained electrochemical promotion catalysts for partial oxidation reforming of heavy hydrocarbons. **International Journal of Hydrogen Energy**. v 37(23). p 17928–17935. 2012.

WANG, Z., KESHWANI, D.R., REDDING, A.P., CHENG, J.J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource Technology**. v 101. P 3583–3585. 2010.

WANITWATTANARUMLUG, B., LUENGARUEMITCHAI, A., WONGKASEMJIT, S. Characterization of corn cobs from microwave and potassium hydroxide pretreatment. *Int J Chem Bio Eng.* v 6. p 354–358. 2012.

WU, W., HICKEY, R., JAIN, M., ZEIKUS, G. Energetics and regulations of formate and hydrogen metabolism by *Methanobacterium formicicum*. **Archives of Microbiology.** v. 159 (1): 57 – 65, 1993.

XIAN-JUN, Z., YU, H-Q. Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures. **Journal of Environmental Management**, v. 74(1): 65-70.

XIAO, L.P., SUN, Z.J., SHI, Z.J., XU, F., SUN, R.C. Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production. **Bioresources.** v 6. p 1576–1598.2011.

ZAKZESKI, J., BRUIJNINCX, P. C. A., JONGERIUS, A. L., WECKHUYSEN, B. M. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews.** v 110, p 3552–3599. 2010

ZHANG, M.L., FAN, Y.T., XING, Y., PAN, C.M., ZHANG, G.S., LAY, J.J. Enhanced biohydrogen production from Corn stalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. **Biomass Bioenergy.** v.31(4). p 250-254. 2007.

ZHAO, L., CAO, G.L., WANG, A.J., REN, H.Y., DONG, D., LIU, Z.N. Fungal pretreatment of cornstalk with *Phanerochaete chrysosporium* for enhancing enzymatic saccharification and hydrogen production. **Bioresource Technology.** v. 114. p 365-369. 2012.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal Agricultural Biological Engineering.** v 2:51–68.2009.

ZHENG, Y., TSAO, G.T. Avicel hydrolysis by cellulase enzyme in supercritical CO₂. **Biotechnology Letters.** v 18. p 45145–45164.1996.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F., LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science.** v. 42. p 35–53. 2014.

ZHU, J.Y. Physical pretreatment-woody biomass size reduction-for forest biorefinery. Sustainable production of fuels, chemicals and fibers from forest biomass. ACS symposium series; Chapter 4. p 89–107. 2011.

ZHU, L., JIN, J., LIN, H., GAO, K., XU, X. Succession of microbial community and enhanced mechanism of a ZVI-based anaerobic granular sludge process treating chloronitrobenzenes wastewater. **Journal of Hazardous Materials.** v 285(21). p 157–166. 2015.

ANEXO I