UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RONDINELE DE OLIVEIRA MOUTTA

Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para
obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à
utilização em processos de produção de bioetanol

Lorena – SP
2009

RONDINELE DE OLIVEIRA MOUTTA

Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para
obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à
utilização em processos de produção de bioetanol

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial na
área de concentração: Microbiologia
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena – SP
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Moutta, Rondinele de Oliveira

Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol / Rondinele de Oliveira Moutta ; orientador Silvio Silvério da Silva. – Lorena: 2009.

101 pág. : fig.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Hidrólise ácida 2. Palha de cana-de-açúcar 3. Fermentação 4. *Pichia stipitis*
5. Etanol. I. Título

664.117 - CDU

Dedico a Deus em primeiro lugar, autor e consumidor da minha fé, porque me faz acreditar que minhas fronteiras estão além do que meus olhos possam enxergar e à minha família pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pelo apoio e pela orientação dedicados durante a realização deste trabalho.

À Dra. Rita de Cássia pelo acompanhamento e grande auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao Nicanor e à Jussara pelo apoio técnico dedicado durante as análises instrumentais e aos demais pesquisadores que de alguma forma prestaram auxílio, como a prof^a. Graça, prof. George. Prof. Messias e prof^a. Inês.

À Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade de realização do curso de mestrado e ao departamento de biotecnologia da EEL-USP por colocar à disposição a área experimental e os laboratórios.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização desta pesquisa.

A todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e a todos os amigos pelo convívio dentro e fora dos laboratórios e pelo apoio e incentivo durante os momentos difíceis: Juan, Boutros, Bruno, Flavio, Adriana, Ricardo, Priscila, Dani Cortez, Dani Garcia, João Paulo, Robson, Michel, Sérgio, Vinicius, Giovani, Carol, Fernando, Claudio, André, Ismael.

Em especial aos meus queridos pais Ângela e Gutemberg e irmãos Welbert e Loídi pelo apoio incondicional e à minha amada Gabrielle pela compreensão e incentivo.

O homem que parou de aprender, não deveria ter
permissão para andar por aí nesses dias perigosos

M. M. Coady (ca. 1870)

RESUMO

MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol.** 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2009

Este trabalho avaliou a extração de xilose da palha de cana-de-açúcar sob diferentes condições de hidrólise por ácido sulfúrico diluído visando à obtenção de um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e ainda a fermentabilidade deste para a bioconversão a etanol por *Pichia stipitis* Y-7124. Inicialmente caracterizou-se a palha de cana e a fração hemicelulósica representou 30,79% da massa seca da palha, enquanto que a celulose representou 40,84% e a lignina 25,80%. Verificou-se ainda que 26,57% da palha corresponde à xilose, representando 86,27% de sua fração hemicelulósica. As hidrólises ácidas foram realizadas de acordo com um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} visando-se à resposta concentração de xilose (g/L) no hidrolisado hemicelulósico. Levou-se em consideração os fatores: tempo, temperatura, concentração da solução ácida e a relação sólido:líquido. A melhor resposta para a concentração de xilose foi encontrada nas condições do ponto central, com a média da concentração igual a 31,70 g/L. A análise de variância foi realizada para um *screening* do planejamento e observou-se que apenas os fatores concentração da solução ácida e temperatura foram significativos ao nível de 95% de confiança. Em seguida realizou-se ensaios para otimização da hidrólise ácida considerando os fatores temperatura e concentração da solução ácida. As condições de ótimo encontradas foram 130 °C e a solução de ácido sulfúrico em 2,9% m/v, empregadas com uma relação sólido:líquido igual a 1:4 (g/mL) por 30 minutos de reação. Estas condições de ótimo permitiram a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico com concentração igual a 56,5 g/L de xilose, correspondendo à extração de 85,1% da xilose da palha. Posteriormente, ensaios de fermentação foram conduzidos com o hidrolisado hemicelulósico obtido, visando à produção de etanol por *P. stipitis* em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio hidrolisado para avaliar a fermentabilidade do hidrolisado obtido bem como a necessidade de suplementação nutricional e utilizou-se um planejamento experimental fatorial 2^3 de face centrada para verificar a influência dos fatores: concentração de ureia, concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e concentração de extrato de levedura. Os ensaios foram conduzidos a 200 rpm e 30 °C. Verificou-se que o extrato de levedura (5 g/L) exerceu maior influência sobre o processo fermentativo e que o $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) não apresentou significância estatística. A melhor condição na fermentação para produção de etanol por *P. stipitis* encontrada foi empregando-se extrato de levedura (5 g/L), ureia (5 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), em que se obteve um fator de rendimento em etanol $Y_{P/S}$ igual a 0,38 g/g e produtividade volumétrica igual a 0,41 g/L.h, em 60 horas de fermentação.

Palavras-chave: Hidrólise ácida. Palha de cana-de-açúcar. Fermentação. *Pichia sti*
Etanol

ABSTRACT

MOUTTA, R. O. **Acid hydrolisys of sugar cane straw to hemicelulosic hydrolysate attainment aiming at the utilization in bioethanol production processes.** 2009. 101 p. Dissertation (Master in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2009.

This work evaluated the sugar cane straw xylose extration under different diluted sulfuric acid hydrolysis conditions aiming at the attainment of hemicellulosic hydrolysate rich in xylose and their fermentability for ethanol bioconversion by *Pichia stipitis* Y 7124. Previous assays for chemical characterization of the sugar cane straw has been carried. The hemicellulosic fraction represented 30.79% of the dry straw mass, whereas the cellulose represented 40.84% and the lignin represented 25,80%. It was verified despite 26,57% of the straw corresponded to xylose, representing 86,27% of its hemicellulosic fraction. The acid hydrolysis was carried out using an experimental design 2^{4-1} aiming at it the xylose concentration (g/L) response on the hemicellulosic hydrolysate regarding the factors: time, temperature, acid solution concentration and the ratio solid:liquid. The best result for the xylose concentration has been found on the center point conditions, with concentration of 31,70 g/L. The analysis of variance was carried out to one screening of the design and it was observed that only the parameters temperature and acid solution concentration has been significant at 95% reliable level. After that acid hydrolysis assays has been carried regarding the factors temperature and acid solution concentration aiming the acid hydrolysis optimization. The optimum point conditions were 130 °C and the sulfuric acid solution of 2,9% m/v, carried with the ratio solid:liquid of 1:4 (g/mL) at 30 minutes of reaction. Later, fermentation assays was carried out with the hemicellulosic hydrolysate obtained in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of hydrolysate to evaluate the hydrolysate fermentability obtained as well tha needless of nutritional supplementation and for it used an experimental design 2^3 of face centered to verify the influence of the factors: urea concentration, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration and yeast extract concentration. Assays has been carried at 30 °C and 200 rpm. It was verified that the yeast extract (5 g/L) exerts greater influence on the fermentation and the $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) did not present statistic significance. The best conditions were achieved using yeast extract (5 g/L), urea (5 g/L) and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L). with ethanol yield and volumetric productivity of 0,38 g/g and 0,41 g/L.h, respectively, after 60 hours of fermentation.

Keywords: Acid hydrolysis. Sugar cane straw. Fermentation. *Pichia stipitis*. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil (ÚNICA 2009)....	24
Figura 2.2	Estrutura da oferta interna de energia em %, Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2008).....	25
Figura 2.3	Alternativa de aproveitamento dos derivados da cana-de-açúcar (adaptado de DEDINI S/A, 2004).....	26
Figura 2.4	Diagrama de blocos para produção de etanol a partir do caldo de cana ou a partir do bagaço ou palha.....	28
Figura 2.5	Morfologia da cana-de-açúcar, ilustrando as folhas (a) e o caule (b)(NETAFIM, 2009).....	29
Figura 2.6	Estrutura ilustrativa da parede celular de plantas dicotiledôneas e várias monocotiledôneas com predominância de celulose e xiloglucanas (parede tipo I) e de bromeliadas, palmeiras, ciperáceas e pastagens, tendo como principais polímeros que unem as fibras celulose e glucuronoarabinoxilana (parede tipo II) (KLOCK, 2009).....	31
Figura 2.7	Representação das cadeias de celulose com ampliações a partir da parede celular, mostrando ainda as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.....	33
Figura 2.8	Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....	34
Figura 2.9	Fração de uma molécula de lignina segundo Freudenberg, 1968.....	36
Figura 2.10	Ilustração simplificada do mecanismo de hidrólise ácida da hemicelulose (adaptado de Fengel & Wegener, 1989).....	39
Figura 2.11	Efeito indutivo do grupo carboxila na hidrólise ácida (adaptado de Fengel & Wegener, 1989).....	41
Figura 2.12	Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras. Fonte: Parajó, Domínguez e Domínguez (1998a). Adaptado.....	48
Figura 5.1	Efeitos de interação da temperatura (A) e concentração da solução ácida (B) sobre a extração de xilose da palha de cana...	74

Figura 5.2	Superfície de resposta representando a influência da temperatura e da concentração da solução ácida sobre a extração de xilose da palha de cana-de-açúcar no processo de hidrólise.....	74
Figura 5.3	Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana conduzido em frascos Erlenmeyer para avaliação da suplementação nutricional por planejamento experimental central composto 2^3 de face centrada. (a) concentração de xilose, (b) produção de etanol e (c) fermentação na condição do ensaio 8.....	83
Figura 5.4	Resíduos padronizados em função dos ensaios realizados.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos.....	31
Tabela 2.2	Desempenho de micro-organismos fermentadores de xilose a etanol.....	46
Tabela 4.1	Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial do tipo 2^{4-1} para hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar.....	58
Tabela 4.2	Matriz do planejamento fatorial do tipo 2^{4-1} com triplicata no ponto central para avaliação dos efeitos dos parâmetros tempo, temperatura, concentração do ácido e a relação massa seca de palha e volume da solução ácida (REL S:L).....	58
Tabela 4.3	Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial central composto de face centrada 2^2 para hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar....	60
Tabela 4.4	Matriz do planejamento experimental composto central de face centrada 2^2 fixando o tempo em 30 minutos e a relação sólido:líquido em 1:4 (g:L).....	60
Tabela 4.5	Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados na suplementação nutricional do meio de fermentação a partir de um planejamento fatorial composto central de face centrada 2^3 para fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.....	62
Tabela 4.6	Matriz do planejamento experimental composto central de face centrada 2^3 para avaliação do efeito da suplementação nutricional ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.....	63
Tabela 5.1	Composição química da palha quanto a seus constituintes básicos.....	68
Tabela 5.2	Caracterização química da palha de cana.....	68
Tabela 5.3	Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} para extração de xilose da palha de cana-de-açúcar contendo a resposta xilose.....	70
Tabela 5.4	Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a extração de xilose (g/L), teste t de student e nível de significância de cada fator....	71

Tabela 5.5	Matriz do planejamento experimental fatorial composto central de face centrada (CCFC) para extração de xilose da palha de cana-de-açúcar.....	72
Tabela 5.6	Análise de variância do planejamento composto central de face centrada para análise da resposta concentração de xilose em g/L.....	73
Tabela 5.7	Condições preditas pelo modelo estatístico que representam a máxima concentração de xilose em g/L.....	75
Tabela 5.8	Condições de hidrólise ácida empregada a diferentes matérias primas para obtenção de hidrolisado lignocelulósico.....	77
Tabela 5.9	Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar não tratado e tratado	78
Tabela 5.10	Planejamento experimental para avaliação do efeito da suplementação nutricional sobre o fator de rendimento e produtividade volumétrica em etanol na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (item 4.2.2.2).....	84
Tabela 5.11	Resultados da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana conduzidos em frascos Erlenmeyer referentes ao ensaio 8.....	85
Tabela 5.12	Estimativa dos efeitos dos fatores da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a fermentação alcoólica, teste t de student e nível de significância para cada fator considerando as respostas fator de rendimento $Y_{P/S}$ (a) e produtividade volumétrica Q (b) em etanol (a) (referentes ao ensaio 8).....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Breve histórico.....	21
2.1.1. A cana-de-açúcar.....	22
2.1.2. O etanol como combustível.....	23
2.2. Cana-de-açúcar e derivados.....	23
2.2.1. Mercado brasileiro e mundial.....	23
2.2.2. Produção e aproveitamento.....	25
2.2.3. Etanol.....	27
2.2.4. Características morfológicas.....	29
2.3. Materiais Lignocelulósicos.....	30
2.3.1. Composição.....	30
2.3.2. Pré-tratamento	36
2.3.2.1. Hidrólise ácida.....	38
2.3.2.2. Inibidores do processo fermentativo e destoxificação do hidrolisado.....	42
2.4. Fermentação de hidrolisado hemicelulósico	44
2.4.1. Micro-organismos produtores de etanol	44
2.4.1.1 Conversão de xilose a etanol por leveduras	47
2.4.2. Influência de fatores ambientais no processo fermentativo	50
3. OBJETIVOS.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56

4.1. Obtenção e tratamento do hidrolisado hemicelulósico.....	56
4.1.1. Matéria-prima.....	56
4.1.2. Caracterização química da palha de cana-de-açúcar.....	56
4.1.3 . Determinação do teor de lignina insolúvel em meio ácido	57
4.1.4. Determinação do teor de cinzas	57
4.1.5 Determinação das condições iniciais de hidrólise ácida.....	57
4.1.6. Otimização da hidrólise ácida.....	59
4.1.7. Destoxificação do hidrolisado.....	61
4.2. Utilização do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar em processo fermentativo para obtenção de etanol.....	61
4.2.1 Micro-organismo.....	61
4.2.2.Processo fermentativo.....	61
4.2.2.1. Preparo de inóculo.....	61
4.2.2.2 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico.....	62
4.3. Métodos analíticos	63
4.3.1. Determinação do teor de umidade.....	63
4.3.2. Determinação do teor de carboidratos e ácidos orgânicos.....	64
4.3.3. Determinação do teor de lignina solúvel.....	64
4.3.4. Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural	65
4.3.5. Determinação do teor de celulose e hemicelulose.....	65
4.3.6. Determinação do pH.....	66
4.3.7. Determinação da concentração celular.....	66
4.3.8. Análise estatística dos resultados.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1. Caracterização química da palha de cana-de-açúcar.....	67
5.2. Determinação das condições iniciais de Hidrólise ácida de palha	68

5.3. Otimização das condições de hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar.....	71
5.4 Caracterização e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico obtido via hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar	77
5.5. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico obtido de palha de cana-de-açúcar.....	80
6. CONCLUSÕES.....	88
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES.....	99

1. INTRODUÇÃO

As elevações do preço do petróleo e o aumento da preocupação mundial com as questões ambientais vêm estimulando a busca por energias alternativas. As energias renováveis vêm ganhando grande importância, pois possuem a capacidade de substituir, pelo menos em parte, os combustíveis fósseis e são menos poluentes. Diversos países estão interessados na mistura álcool-gasolina com o objetivo de reduzir as emissões de gases de efeito estufa, e alguns já estão iniciando suas produções internas. No entanto, o mercado de energias renováveis possui dificuldades em competir com o de combustíveis fósseis, os quais além de ainda possuírem menores custos de produção, já possuem um mercado consolidado (SOUZA, 2006).

De acordo com o Observatório do Setor Sucroalcooleiro (2009), o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar e de álcool, respondendo por 42% das exportações mundiais de açúcar e 63% das exportações mundiais de álcool. O aumento da demanda pelo álcool combustível e as previsões de crescimento continuado estão impulsionando o setor a realizar novos investimentos na área agrícola e industrial com o objetivo de expandir a capacidade de produção e atender a demanda futura pelo combustível. O mercado interno revela-se promissor ao setor sucroalcooleiro, assim como o mercado internacional.

A análise de dados disponíveis sobre a evolução do mercado interno brasileiro e do internacional revela que a indústria alcooleira se desenvolverá muito nos próximos anos. O Ministério de Minas e Energia (Brasil, 2008) do Brasil avalia que o país precisará dobrar sua produção num horizonte de 5 a 7 anos se quiser suprir as demandas locais e internacionais do combustível. O avanço de novas tecnologias favorecerá o aumento da produtividade agrícola e industrial, aumentando a oferta do produto e a garantia de seu abastecimento.

Uma prática comum nesse setor agrícola são as queimadas, praticadas anteriormente ao corte para a retirada da palha. Essa prática é realizada basicamente com o objetivo de facilitar o corte manual da cana, e eliminar a palha para facilitar o transporte até a usina. Entretanto, além de problemas relacionados ao meio ambiente e à saúde pública, as queimadas podem ser consideradas um desperdício energético, visto que a palha queimada pode ser utilizada para a

geração de energia nas usinas. Algumas empresas já despertaram para esse fato e começam a desenvolver formas de recolher a palha para o uso como combustível nas caldeiras.

A Lei Estadual 11.241 de 2002 prevê a eliminação gradativa até 2021 para áreas mecanizáveis e 2031 para as demais áreas no estado de São Paulo. No Rio de Janeiro, o governo determinou a proibição das queimadas para a colheita de cana no Norte Fluminense a partir do dia 8 de maio de 2009.

De outra forma, a palha de cana sendo um material constituído basicamente de polissacarídeos é ainda matéria-prima em potencial para a obtenção de vários produtos de valor agregado, como de etanol via hidrólise e fermentação alcoólica.

A proposta deste presente trabalho é, em linhas gerais, estabelecer melhores condições de hidrólise da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar para obtenção de um hidrolisado com potencial de utilização em processos de fermentação para produção de etanol, transformando este resíduo agrícola em um subproduto para a indústria alcooleira. Desta forma pretende-se propor um aumento na produtividade do setor sucroalcooleiro e redução de problemas ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Breve histórico

2.1.1 A cana-de-açúcar

Cana de açúcar, uma antiga fonte de energia para os seres humanos e, mais recentemente, um substituto ao combustível fóssil para veículos automotores, foi primeiro cultivado no Sul da Ásia Leste e Índia Ocidental. No período em torno de 327 A.C essa era um importante cultivo no subcontinente africano. A cana foi introduzida no Egito em torno de 647 D.C. e, aproximadamente um século depois na Espanha.

Desde então, o cultivo de cana-de-açúcar foi estendido a quase todas as regiões tropicais e subtropicais. Portugueses e Espanhóis a levaram ao Mundo Novo no início do século XVI, tendo sido introduzida nos Estados Unidos da América (Louisiana) em torno de 1741 (NETAFIM, 2009).

É uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo tropical, gerando centenas de milhares de empregos diretos.

O setor sucroalcooleiro brasileiro despertou o interesse de diversos países, principalmente pelo baixo custo de produção de açúcar e álcool. Este último tem sido cada vez mais importado por nações de primeiro mundo, que visam reduzir a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência de combustíveis fósseis.

No Brasil, a agroindústria da cana-de-açúcar tem adotado políticas de preservação ambiental que são exemplos mundiais na agricultura. Já existem diversas usinas brasileiras que comercializam crédito de carbono, dada a eficiência ambiental.

Geralmente as plantações de cana ocupam vastas áreas contíguas, com o cultivo se caracterizando pela monocultura, baseada em dois modelos predominantes: o corte tradicional com a cana queimada e colheita mista e o corte da cana-crua, sem queima e colheita mecanizada (NETAFIM, 2009).

2.1.2. O etanol como combustível

A utilização do álcool combustível automotivo no Brasil ganhou importância na década de 70 com o lançamento do Programa Nacional do Álcool – PROÁLCOL, criado pelo Decreto 76.593/75. Este programa possuía uma finalidade estratégica de substituir parte da gasolina consumida no mercado interno, reduzindo, assim, as importações de petróleo. O Primeiro Choque do Petróleo, ocorrido em 1973, triplicou o preço do barril do produto, impactando negativamente no balanço de pagamentos dos países importadores. O setor sucroalcooleiro, por sua vez, registrava uma crise de superprodução devido aos elevados investimentos realizados na década de 60 e início da década de 70 e à redução da demanda internacional pelo açúcar (BERTELLI, 2005).

Esses investimentos expandiram a capacidade produtiva do setor tanto de cana como de açúcar. Os preços no mercado internacional, por outro lado, começavam a registrar uma trajetória descendente a partir do final de 1974, ocasionado pela retração do consumo.

A primeira fase do Proálcool, período entre 1975-1979, foi marcada pela utilização da mistura álcool anidro-gasolina, sendo o álcool produzido basicamente pelas destilarias anexas. O excesso de produção de cana e açúcar, assim como a existência de capacidade ociosa das usinas paulistas ocasionaram um aumento substancial da produção de álcool anidro em 1977-78, ultrapassando a demanda pelo produto (SANTOS, 1993).

Na segunda fase do Programa, período entre 1979-1985, foram lançados os carros a álcool. A ocorrência do Segundo Choque do Petróleo, em 1979, e a existência dos estoques elevados de álcool anidro levou o governo a assinar um acordo com a indústria automobilística para que esta passasse a produzir carros a álcool puro. Durante toda a década de 80, os carros a álcool lideraram as vendas de veículos leves e só reverteu essa trajetória ascendente após a crise de desabastecimento do álcool combustível enfrentada pelo setor no final da década de 80.

A década de 90 foi marcada pelo processo de desregulamentação ocorrido no setor sucroalcooleiro, provocando mudanças institucional e organizacional (MORAES, 1999). Este processo iniciou-se em 1990 com a extinção do Instituto do

Açúcar e do Alcool (IAA) e durou toda a década, sendo um processo lento e gradual devido à dificuldade do setor em equilibrar a oferta à demanda. No final da década, os preços dos produtos do setor deixaram de ser fixados pelo governo. O fim da intervenção estatal na indústria sucroalcooleira estimulou a busca por técnicas produtivas mais eficientes que contribuíssem para a redução dos custos e, conseqüentemente, aumento da competitividade dos produtos no ambiente de livre mercado.

Atualmente, o álcool hidratado é competitivo com a gasolina devido à redução de custos no setor, ao elevado preço do barril de petróleo e às diferenças de tributação entre a gasolina e o álcool. As inovações ocorridas na indústria automobilística com o lançamento dos carros bi-combustíveis (*flex-fuel*) renovaram o interesse dos consumidores pelo álcool hidratado. Lançados em 2003, esses novos veículos utilizam álcool hidratado e gasolina C em qualquer proporção e já são líderes das vendas de veículos leves (SOUZA, 2006).

2.2 Cana-de-açúcar e derivados

2.2.1 Mercado brasileiro e mundial

A demanda por energia renovável no Brasil cresceu em todas as fontes, desde 2006. Pela primeira vez a participação da energia hidráulica e eletricidade foi suplantada pelos “derivados da cana-de-açúcar” na matriz energética brasileira (MEB).

Em 2008, o Brasil consolidou sua liderança na produção de etanol e bateu o recorde de exportação do combustível renovável, totalizando 5,16 bilhões de litros. Esse volume corresponde a mais que o dobro das exportações de gasolina pela PETROBRAS no mesmo período (Brasil, 2008) e em 2008 o Brasil registrou o uso de um volume de etanol superior ao de gasolina.

Apesar da produção e do uso crescente do etanol (Figura 2.1) no País e da geração de excedentes para exportação, o setor sucroenergético brasileiro utiliza apenas 1% das terras aráveis brasileiras para o cultivo de cana dedicada à produção de etanol (UNICA, 2008).

No Brasil, a utilização do etanol já substituiu, em termos de volume, mais de 50% da gasolina utilizada no país em veículos leves. Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA, 2009), cerca de 90% dos veículos leves novos comercializados no País são *flex*.

Figura 2.1: Produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil (ÚNICA 2009)

A maior adesão de países importadores de etanol para uso como combustível teve um papel importante no aumento das exportações brasileiras em 2008, segundo Geraldine Kutas, assessora internacional da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2009). Além disso, esta explosão da demanda não se deveu apenas ao aumento do consumo como combustível, mas também pela utilização do produto como insumo industrial.

O aumento do barril do petróleo para além dos US\$100 durante parte do ano e a quebra da safra de milho nos Estados Unidos devido a enchentes na principal região produtora, o Meio-Oeste americano, foram os principais motivos para a forte expansão nas exportações brasileiras de etanol em 2008. Segundo dados da UNICA (2009), o total exportado cresceu 45%, gerando uma receita também recorde de US\$2,39 bilhões, 62% superior à de 2007, de US\$ 1,48 bilhão.

Os derivados da cana-de-açúcar, com participação de 15,9% na MEB e de 34,5% nas fontes renováveis, suplantaram, respectivamente, os 14,9% e 32,4% da hidráulica e eletricidade (Brasil, 2008).

Da oferta interna de energia (OIE) total, 109,7 milhões (ou 45,9%) correspondem à oferta interna de energia renovável. Essa proporção é das mais altas do mundo, contrastando significativamente com a média mundial, de 12,9%, e mais ainda com a média dos países da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômicos (OECD), em sua grande maioria países desenvolvidos, de apenas 6,7% (Figura 2.2).

Figura 2.2: Estrutura da oferta interna de energia em %, Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2008)

2.2.2 Produção e aproveitamento

A cana-de-açúcar é um recurso agrícola natural e renovável que fornece açúcar, além de biocombustível, fibra, fertilizante e diversos outros derivados/co-produtos que podem ser obtidos com sustentabilidade ecológica, como ácidos orgânicos e solventes (Figura 2.3).

O caldo da cana-de-açúcar é usado para produzir açúcar branco, açúcar mascavo, melão e etanol. Os principais subprodutos gerados na agroindústria da cana-de-açúcar são o bagaço, a vinhaça e a torta de filtro.

Melão, o derivado principal, é a mais importante matéria prima para a produção de álcool e, portanto para as indústrias baseadas no álcool. Excesso de bagaço e de palha tem sido usado como matéria prima em outros segmentos industriais e artesanais. Além disso, a geração de energia usando bagaço e/ou palha como combustível é considerado possível na maioria das usinas de cana.

Figura 2.3: Alternativa de aproveitamento dos derivados da cana-de-açúcar (adaptado de DEDINI S/A, 2004)

O agronegócio da cana-de-açúcar movimenta em torno de R\$ 42 bilhões por ano no Brasil. A safra 2007/2008 foi calculada em 493 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 22,3 bilhões de litros de etanol (8,4 bilhões de litros de anidro e 13,9 de hidratado), maior 25% do que a safra 2006/2007 na qual foram produzidos 17,8 bilhões de litros (UNICA; MAPA, 2008). A Empresa de Pesquisa Energética (EPE), vinculada ao Ministério de Minas e Energia (MME), prevê um crescimento de 150% na demanda de etanol no Brasil entre 2007 e 2017, que passaria dos 25,5 bilhões de litros para 63,9 bilhões de litros. Para atingir este volume, serão necessários, segundo a EPE, investimentos de 20 a 25 bilhões de dólares no período, valor que toma como base a construção de 246 novas usinas. Isso exigirá também o crescimento das áreas plantadas (atualmente são 7 milhões de hectares), melhorias no manejo e, principalmente, ganhos de produtividade.

Em termos energéticos, 2/3 da safra de cana-de-açúcar não têm sido aproveitados de forma apreciável em escala comercial. A palha e o bagaço constituem resíduos no campo e na usina, respectivamente. Esforços têm sido empregados na utilização de bagaço e palha como fontes de energia para geração de vapor e eletricidade nas indústrias de açúcar e álcool. Desse modo, haverá cerca de 10 t/ha de palhiço (palha, pontas e folhas verdes) que poderão ser convertidos em energia por diversos processos (MICHELAZZO; BRAUNBECK, 2008). Estudos

devem ser realizados a fim de se verificar a viabilidade deste material como fonte alternativa para a produção de bioetanol e outros produtos de valor agregado como açúcares, solventes e ácidos orgânicos.

A produção de 1 tonelada de cana gera 0,14 toneladas de palha em base seca, o que corresponde a 2600 MJ, sendo equivalente a 0,3 barril de petróleo (MACEDO, 2004). Com a atual produção de cana-de-açúcar e o aproveitamento integral da palha de cana seria possível substituir o equivalente a 186 milhões de barris de petróleo, entretanto tem-se recomendado a permanência de cerca de 50% desta palha no solo para fins de sustentabilidade do solo (RIPOLI, 2008).

2.2.3 Etanol

Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é o mais comum dos álcoois e caracteriza-se por ser um líquido incolor, volátil, inflamável, solúvel em água, com cheiro e sabor característicos. A presença do oxigênio, elemento eletronegativo, em sua estrutura molecular, atrai elétrons de ligação, tornando-o um solvente fortemente polar. Outras características podem ser observadas na Tabela A do Apêndice A.

A produção de etanol pode ser realizada utilizando-se vias degradativa, sintética ou fermentativa. A partir de hidrocarbonetos não saturados, como etileno e acetileno, de gases de petróleo e de hulha, obtém-se etanol por via química. Estes processos são utilizados por países com grandes reservas de petróleo e uma indústria petroquímica avançada, condições necessárias para que sejam economicamente viáveis (ROITMAM, 1988).

A produção de etanol pode ser realizada por via sintética, com os processos tecnológicos de hidratação catalítica direta ou indireta do etileno ou por hidrogenação catalítica do acetileno (MORRISON, 1983).

A via biotecnológica tem sido a mais utilizada atualmente para a produção de etanol, representando cerca de 90% da produção mundial. Esta apresenta menor custo de produção e grande diversificação de matérias primas de origem agrícola, sendo que a cana-de-açúcar e a beterraba correspondem a 60% da produção, enquanto o restante corresponde a grãos, principalmente amido de milho (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Através da fermentação de açúcares

simples obtidos de matérias primas sacaríneas (caldo de cana e suco de beterraba), amiláceas (milho e mandioca) ou lignocelulósicas (bagaço e palha de cana) pode-se obter hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis, viabilizando a fermentação e produção de bioetanol. A Figura 2.4 ilustra a utilização de cana-de-açúcar e alternativas para o aproveitamento de seus resíduos bagaço e palha na produção de açúcar, álcool e energia.

Figura 2.4: Diagrama de blocos para produção de etanol a partir do caldo de cana ou a partir do bagaço ou palha

2.2.4 Características morfológicas

Na classificação taxonômica de Jussieu (1789), *Saccharum* é o nome de um gênero botânico, ordem *Gramineae*, classe *Monocotiledoneas* com estames hipogínicos (WIKIPEDIA, 2009).

É uma planta da família *Poaceae*, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas. As principais características dessa família são a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule em colmos, e as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta, conforme Figura 2.5 (WIKIPEDIA, 2009).

Figura 2.5: Morfologia da cana-de-açúcar, ilustrando as folhas (a) e o caule (b) (NETAFIM, 2009)

A folha da planta da cana-de-açúcar é dividida em duas partes: bainha e lâmina, separadas por uma junta de lâmina. A bainha, como implica seu nome, cobre completamente o talo, estendendo sobre pelo menos um entrenó completo (NETAFIM, 2009).

As folhas são normalmente acopladas de forma alternada aos nós, portanto formando duas fileiras em lados opostos. A planta madura de cana-de-açúcar tem uma superfície de folha superior total em média de $0,5 \text{ m}^2$ e o número de folhas verdes por talo é em torno de 10, dependendo da variedade e condições de crescimento (NETAFIM, 2009).

A junta de lâmina é onde encontram-se duas áreas em forma de calço chamadas de "barbelas". As folhas são numeradas pelo sistema de Kuijper, como foi citado por Casagrande (1991). A primeira folha de cima para baixo do talo com barbelas vistas claramente é designada +1. Para baixo elas recebem, sucessivamente, os números +2, e +3. A folha "da barbela superior visível" (+3) é

um tecido diagnóstico que é frequentemente usado na avaliação do estado nutricional da planta (NETAFIM, 2009).

2.3 Materiais Lignocelulósicos

2.3.1 Composição

A composição básica dos materiais lignocelulósicos (Tabela 2.1) depende do vegetal de origem e, no caso de resíduos agroindustriais, da região, idade e período do ano no momento da colheita do material.

Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são a celulose e a hemicelulose constituindo estruturas duras e fibrosas infiltradas por outra estrutura formada por álcoois aromáticos conhecida como lignina (Figura 2.6), ocorrendo ainda a existência de cinzas e outros componentes classificados como extrativos em pequenas quantidades.

Em madeiras a proporção média entre essas frações é de 50:30:15-35 (celulose:hemicelulose:lignina) e no bagaço de cana-de-açúcar pode apresentar a proporção de 40-50:15-30:10-30.

Apesar de apresentarem grande potencial para a obtenção de diversos produtos de valor agregado significativo, seu aproveitamento de forma economicamente viável ainda consiste em desafios para a biotecnologia, devido à elevada resistência, necessidade de tratamentos prévios, às vezes sob condições drásticas, para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Tabela 2.1: Composição química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos

Resíduos Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3	Cruz et al., 2000
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6	Cruz et al., 2000
Eucalyptus globulus	46,3	17,1	22,9	Cruz et al., 2000
Bagaço de cana	40,19	26,42	25,15	Neureiter et al., 2002
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Mussato; Roberto, 2002.
Palha de trigo	33,81	31,83	20,12	Cândido; Canilha, Silva, 2002
Casca de aveia	30,51	28,63	23,09	Felipe et al., 2003
Eucalyptus grandis	40,20	15,67	26,9	Canettieri; Silva; Carvalho Jr, 2003
Palha de sorgo	34	44	20	Herrera et al., 2004

Figura 2.6: Estrutura ilustrativa da parede celular de plantas dicotiledôneas e várias monocotiledôneas com predominância de celulose e xiloglucanas (parede tipo I) e de bromeliadas, palmeiras, ciperáceas e pastagens, tendo como principais polímeros que unem as fibras celulose e glucuronoarabinoxilana (parede tipo II) (KLOCK, 2009).

Celulose

A celulose é a macromolécula mais abundante na natureza e constitui cerca de 40 – 50% dos materiais vegetais, como em madeiras. Sua característica fibrosa atribui à celulose rigidez e resistência ao estresse. Sua principal função é como componente estrutural em plantas, estando presente nas camadas da parede celular e na lamela média. Geralmente está entrelaçada com uma variedade de polissacarídeos e frequentemente impregnada com lignina (GOLDSTEIN, 1981).

A estrutura da celulose se dá por unidades de glicose com ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), o que permite às moléculas de glicose uma disposição de 180 ° entre si. Esse arranjo torna a cadeia de celulose uma macromolécula linear. A unidade de repetição da celulose é a celobiose, um dímero de glicose formado por ligação glicosídica do tipo β -(1,4), enquanto que a glicose é um monossacarídeo de 6 carbonos do tipo aldose e que forma um anel piranosídico (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os vários grupos OH de sua estrutura permitem que ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares ocorram entre as cadeias gerando regiões cristalinas e bem estáveis. A interação entre essas cadeias vai possibilitar a formação de microfibrilas com alto grau de cristalinidade (FENGEL; WEGENER, 1989). Em algumas regiões dessas fibras que vão se formar ocorrem irregularidades das interações, formando então as regiões chamadas de amorfas na rede cristalina (ROEHR, 2001).

Toda celulose de ocorrência natural apresenta características de classificação da celulose I, com poucas diferenças de acordo com a fonte. A estrutura proposta para a célula unitária e conformação da cadeia de celulose I (Figura 2.7) contém cadeias paralelas que são arranjadas em folhas, estabilizadas por ligações de hidrogênio em duas direções: as ligações intramoleculares OH*3'-OH*5 e OH*6-OH*3' ao longo da cadeia e uma intermolecular OH*6-OH*2 perpendicular ao eixo da cadeia ao longo de uma direção, formando cristais monoclinicos (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.7: Representação das cadeias de celulose com ampliações a partir da parede celular, mostrando ainda as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (KLOCK, 2009).

Polioses (hemiceluloses)

A hemicelulose é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante nos vegetais, presente em todas as camadas da parede celular, mais concentrado principalmente nas camadas primária e secundária, entrelaçado com as fibras de celulose (BISARIA; GHOSE, 1981).

Essas polioses consistem, em sua maior parte, de pentoses e hexoses e são usualmente formadas com um grau de polimerização que varia de 100 a 200 unidades de repetição, que em conjunto atingem uma massa molecular bem menor que a da celulose. Apresentam estrutura amorfa devido à sua configuração bidimensional causada por ramificações na cadeia (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os principais constituintes dessas polioses são as hexoses: β -D-glicose, β -D-manose e α -D-galactose; e as pentoses: β -D-xilose e α -L-arabinose. Esses

monossacarídeos constituem a cadeia principal das hemiceluloses, sendo classificadas de acordo com a predominância dos monossacarídeos. As xilanas e glucomananas são as mais abundantes, podendo ocorrer outras configurações (Figura 2.8). Existem ainda grupos laterais e ramificações como ácidos aldônicos, aldurônicos (urônicos), aldáricos e grupos acetila (FENGEL; WEGENER, 1989).

De forma geral a xilana é um polissacarídeo formado por unidades de xilose que frequentemente carrega substituintes como acetil, arabinosil e glucouranosil (KUHAD; SINGH, 1993). A glucuronoarabinoxilana (GAX) consiste de uma cadeia principal de unidades de D-xilopiranosose com ligações β -(1,4) parcialmente substituída em C-2 por grupos ácido 4-O-metil α -D-glucurônico e em C-3 por unidades de α -L-arabinofuranose (GOLDSTEIN, 1981).

Em plantas folhosas a estrutura GAX (ligam-se invariavelmente à posição O-3) corresponde à maioria das cadeias de xilanas. Grupos feruloil podem esterificar-se na posição O-5 de unidades α -L-arabinose e estão espaçados em cada 50 unidades de xilose.

Figura 2.8: Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranosurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFa = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).

Lignina

A lignina é responsável pela rigidez da parede celular dos vegetais, funcionando como agente permanente de ligação entre as células, conferindo resistência ao impacto, compressão e dobra (LEMOS, 2001). A lignina da parede celular das plantas está sempre associada com a hemicelulose, não só por interação física como também por ligação covalente. Desta forma, a hemicelulose que envolve as fibras da celulose é revestida externamente por este composto fenólico que é altamente resistente ao ataque químico ou enzimático.

A lignina é um composto bastante estável, insolúvel em solventes orgânicos ou mesmo em ácido sulfúrico concentrado a quente. Além disso, os tecidos lignificados resistem também ao ataque microbiano, impedindo a penetração de agentes externos capazes de destruir as células. Sua composição varia de acordo com a origem, desta forma, a lignina não deve ser considerada uma única substância. Sua estrutura principal resulta da polimerização desidrogenativa (iniciada por enzimas) de três álcoois aromáticos, conforme a Figura 2.9 ilustra: trans-coniferílico, trans-sinapílico e trans-para-cumárico (CARAMEZ, 1999). Diferentemente da molécula de celulose, a lignina apresenta estrutura tridimensional, com grau de polimerização em torno de 50 e peso molecular em torno de 90.000.

Do ponto de vista morfológico a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média composta, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo e enrijecendo as paredes celulares (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.9: Fração de uma molécula de lignina segundo Freudenberg (1968).

2.3.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento da matéria prima pode ser considerado a etapa mais crucial na produção de bioetanol, por promover grande impacto sobre todas as outras etapas do bioprocesso, tendo influência sobre a fermentação, recuperação de produto, tratamento do efluente e a demanda energética ao longo da linha de processamento. De acordo com Galbe e Zacchi (2007), para um pré-tratamento ser considerado efetivo, deve apresentar algumas características, como:

- Resultar em alta extração de açúcares;
- Permitir alta digestibilidade da celulose, no caso de subsequente hidrólise enzimática;
- Produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que serão tóxicos ao biocatalisador;

- Ter uma baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário;
- Ter um baixo custo de capital e operacional.

Estratégias de pré-tratamento têm sido categorizadas em pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos, ou ainda uma combinação deles.

Os tratamentos físicos geralmente são empregados como um primeiro estágio na abertura da rede lignocelulósica para daí se aplicar um tratamento hidrolítico químico (ácido ou alcalino) ou biológico (com enzimas ou células). Entre os tratamentos físicos citam-se moagem, trituração ou esfarelamento mecânicos e explosão com vapor (GALBE; ZACCHI, 2007).

A estrutura da parede celular pode ser rompida se submetida a condições drásticas de pH. O tratamento alcalino quebra ligações éster entre ácidos fenólicos na parede celular, enquanto que o tratamento ácido quebra ligações glicosídicas e solubiliza açúcares, não tendo significância quanto às ligações éster.

O uso de solventes também se faz para esses efeitos. O processo chamado de organosolv utiliza uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose (PAN; ARATO, 2005).

Os tratamentos químicos geralmente conduzem à formação de compostos intermediários indesejáveis, que podem ser tóxicos ao biocatalisador. Um método mais brando e mais específico é a hidrólise enzimática. Visto que xilanases e esterases mostram diferentes especificidades de substratos, estas enzimas podem ser usadas como ferramentas analíticas na elucidação das formações estruturais (como frequência, posição) das substituições na hemicelulose, bem como para a remoção específica de monossacarídeos e informações sobre as ligações na parede celular. Entretanto, as tecnologias conhecidas ainda não apresentam custos apreciáveis em escala comercial (FAULDS; KROON, 1999).

Um outro método muito utilizado é a explosão com vapor, que consiste em tratar a matéria prima com vapor saturado sob alta pressão (250 a 650 psi) a temperaturas entre 160 e 240 °C por até 20 minutos. Em seguida, a pressão é retirada e a mudança brusca de pressão causa ruptura das ligações de lignina e hemicelulose à celulose. A adição de SO₂ pode aumentar o efeito desse pré-

tratamento, assim como a recuperação da hemicelulose (TENGBORG; STENBERG, 1998).

A hidrólise ácida, empregando ácido sulfúrico diluído, tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica em materiais lignocelulósicos, devido ao seu baixo custo e alta eficiência (SUN & CHENG, 2005).

2.3.2.1 Hidrólise ácida

Ao contrário da celulose, que é praticamente impermeável à água, a hemicelulose tem uma estrutura mais acessível aos agentes de hidrólise. Tal estrutura possibilita a difusão de ácidos, acelerando o processo hidrolítico. Além disso, a própria hemicelulose facilita sua auto-hidrólise, haja vista que os grupamentos acetila presentes na sua molécula são facilmente liberados mediante uso de vapor gerando ácido acético, que catalisa a hidrólise parcial da hemicelulose (GONG *et. al.*, 1999).

A partir da década de 40, vários processos de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos foram desenvolvidos, em geral empregando ácido sulfúrico diluído, onde o processo mais conhecido é o processo Madison. Esse processo foi desenvolvido em 1945 em escala de bancada para a hidrólise de lascas de carvalho e é realizado em dois estágios: 1º usando ácido sulfúrico 1% / 170°C / 10 min e 2º usando ácido sulfúrico 0,8% / 230°C / 30 seg, onde se obtém um rendimento de 47% (glicose e xilose).

Condições mais moderadas podem ser encontradas na literatura fornecendo melhores rendimentos de hidrólise, reduzindo a formação de compostos tóxicos e preservando uma maior integridade dos açúcares (TAMANINI; HAULY, 2004). Processos utilizando outros ácidos, como ácido clorídrico, fluorídrico e trifluoroacético, também foram propostos, mas não obtiveram sucesso, visto que podem ser mais caros ou posteriormente de difícil remoção, tornando o processo mais dispendioso (DUARTE, 1989).

Em geral a hidrólise ácida é conduzida com ácidos minerais como ácido sulfúrico ou ácido clorídrico em concentrações na faixa de 1 a 5 %, temperaturas em

torno de 150°C e pressões de até 10 atm (SUN; CHENG, 2002). Neste processo, a temperatura e a concentração do ácido são fatores cruciais na formação de compostos tóxicos. Temperaturas menores podem ser mais adequadas quanto à formação de inibidores na hidrólise da fração hemicelulósica, entretanto podem acarretar diminuição do rendimento de extração dos açúcares. De outra forma, temperaturas acima de 160°C favorecem a hidrólise também da fração celulósica, gerando altas quantidades de açúcares e compostos inibidores.

Segundo Herrera *et al.* (2002) o mecanismo reacional da hidrólise ácida (Figura 2.10) de materiais lignocelulósicos pode ser descrito pelas seguintes etapas:

1. difusão dos prótons através da matriz lignocelulósica úmida;
2. protonação do oxigênio da ligação éter entre os monômeros de açúcar;
3. quebra da ligação éter e geração de um carbocátion como intermediário;
4. solvatação do carbocátion com água;
5. regeneração do próton e cogeração do monômero de açúcar, oligômero ou polímero, dependendo da ligação éter rompida;
6. difusão dos produtos na fase líquida (se for permitida, por sua forma e tamanho)
7. reinício do processo a partir do passo 2;

Figura 2.10: Ilustração simplificada do mecanismo de hidrólise ácida da hemicelulose (adaptado de Fengel & Wegener, 1989)

Dos estudos sobre hidrólise de materiais lignocelulósicos Sun e Cheng (2002) concluíram que ácidos concentrados, são tóxicos, corrosivos e abrasivos, requerendo reatores resistentes à corrosão. Além disso, tais ácidos devem ser recuperados após hidrólise para tornar o processo economicamente viável.

Um outro fator importante no processo de hidrólise ácida é o tempo de reação. Se o tempo de reação for maior do que 1h, uma perda significativa na concentração de xilose ocorrerá no processo, devido à degradação da mesma (CRUZ *et al.*, 2000).

Com relação à amostra que será hidrolisada, alguns fatores também devem ser levados em conta, como a fase da amostra, estrutura física e acessibilidade, no caso de hidrólise heterogênea, efeitos de conformação e por fim a estrutura e os substituintes do anel de açúcar (FENGEL; WEGENER, 1989).

As relações teóricas e fundamentais da estrutura molecular, conformação e ligações interunidades de polissacarídeos para dados de hidrólise foram avaliados para numerosos experimentos modelo (SZEJTLI, 1976 apud FENGEL; WEGENER, 1989)¹. O comportamento hidrolítico de ligações glicosídicas é substancialmente influenciado também pela conformação das unidades de açúcares e pelo efeito indutivo nessas moléculas causado por certos substituintes na cadeia (FENGEL; WEGENER, 1989).

A conformação de meia cadeira ocorrendo intermediariamente durante o ataque hidrolítico é causada por uma pequena rotação dos substituintes em torno das ligações entre os átomos de carbono 2 e 3 e entre os átomos de carbonos 4 e 5 respectivamente. Geralmente a hidrólise é suportada se os substituinte axiais mudam para uma posição equatorial. Como a taxa de hidrólise aumenta com o número de grupos axiais, os β -anômeros são hidrolisados mais rapidamente do que as correspondentes α -formas, com exceção da L-arabinose (NAKANO; SHAFIZADEH, 1963 apud FENGEL; WEGENER, 1989).¹

Outros efeitos de conformação são a hidrólise mais rápida das ligações em finais redutores quando comparadas aos finais não redutores das cadeias de

¹ SZEJTLI, J.; BUDAI, ZS. Acta Chim. **Acad. Sci. Hung.** v. 91, n. 73, 1976; NAKANO, J. RANBY, B. G. **Svensk Papperstid.** v. 65, p. 29-33. 1962; SHAFIZADEH, F. **Tappi.** v. 46, p. 381-383. 1963.

polissacarídeos e o efeito de impedimento de substituintes C5 na hidrólise (TIMELL, 1964b; HARRIS, 1975 apud FENGEL; WEGENER, 1989)².

Estrutura de anéis furanosídicos são hidrolisadas mais rapidamente do que as de anéis piranosídicos, devido à maior tensão angular estrutural existente na sua conformação quando comparado a aneis piranosídicos. Por exemplo, em madeiras α -D-galactofuranosídeos são hidrolisados cerca de 100 vezes mais rápidas do que α -D-galactopiranosídeos (SHAFIZADEH, 1963 apud FENGEL; WEGENER, 1989)³.

O efeito indutivo descreve o fato de que diferentes substituintes no anel causam uma alteração na densidade eletrônica do oxigênio do anel. Substituintes eletrofílicos tais como grupos carboxila e carbonila reduzem a protonação e impedem a fissão C-O, daí havendo um efeito estabilizador sobre a ligação glicosídica.

A Figura 2.11 demonstra o efeito indutivo causado pela presença do ácido glucurônico na cadeia glicosídica. O grupo carboxila induz diferentes densidades eletrônicas no átomo de oxigênio das ligações glicosídicas entre A-B e B-C. a nucleofilidade mais elevada no oxigênio entre B e C reduz a capacidade de protonação. Daí a ligação é estabilizada enquanto a ligação glicosídica entre A e B é ativada pelo mesmo efeito (MARCHESSAULT, RANBY 1959; RANBY 1961; DARUWALLA, NARSIAN 1966 apud FENGEL; WEGENER, 1989).⁴

Figura 2.11: Efeito indutivo do grupo carboxila na hidrólise ácida (adaptado de Fengel & Wegener, 1989)

² TIMELL, T. E. **Chem. Ind.** p. 503-504. 1964; HARRIS, J. F. **Appl. Polym. Symp.** v. 28, p.131-144;

³ SHAFIZADEH, F. **Tappi.** v.46, p. 381-383. 1963;

⁴ MARCHESSAULT, R. H.; RANBY, B. G. **Svensk Papperstid.** v.62, p. 230-240. 1959; RANBY, B.G. **J. Polym. Sci.** v. 53, p.131-140. 1961; DARUWALLA, E. H. NARSIAN, M. G. **Tappi** v. 49, p.106-111. 1966

Os principais problemas da hidrólise ácida estão relacionados à formação de componentes tóxicos, oriundos não só da hidrólise em si, mas também gerados por corrosão dos equipamentos. Tais subprodutos, caso não sejam removidos, certamente acarretarão problemas inibitórios no metabolismo celular, quando os hidrolisados forem usados em bioconversões. Etapas de remoção desses compostos inibidores têm sido empregadas visando melhorar os rendimentos nos processos de bioconversão.

2.3.2.2 Inibidores do processo fermentativo e destoxificação do hidrolisado

Os tipos de compostos tóxicos que são inibidores da fermentação e suas concentrações em hidrolisados lignocelulósicos dependem da matéria prima e das condições operacionais empregadas para a hidrólise. Logo, as variáveis de processo da fermentação – tais como condições fisiológicas das células, concentração de oxigênio dissolvido e pH do meio – estão também associadas com a toxicidade desses compostos, em geral acentuando seus efeitos tóxicos (TAHERZADEH *et al.*, 2000). Os compostos tóxicos podem afetar os organismos fermentativos inibindo o metabolismo a um ponto além do qual a utilização eficiente de açúcares é reduzida e a formação de produtos diminui. De acordo com Olsson, L. e Hahn-Hägerdal (1996) e Parajó *et al.* (1998), os compostos tóxicos podem ser divididos em quatro grupos: produtos de degradação de açúcares, produtos de degradação da lignina, compostos derivados da estrutura lignocelulósica e íons de metais pesados.

Palmqvist e Hahn-hägerdal (2000b) relacionaram os principais produtos e subprodutos gerados durante o processo de hidrólise ácida de hemicelulose. De acordo com esses autores, a celulose pode ser degradada à glicose e a hemicelulose à xilose, arabinose, manose, galactose e ácido acético. Sob altas pressões e temperaturas glicose e xilose são degradadas a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente. Ácido levulínico e ácido fórmico são gerados pela degradação de HMF e compostos fenólicos são gerados a partir da degradação parcial de lignina, como siringaldeído, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanilínico, vanilina e ácido ferúlico (FENGEL; WEGENER, 1989). Extrativos da matéria prima (como resinas, taninos e terpenos) e ácido acético, derivado de grupos acetila

presentes na estrutura da hemicelulose, são liberados no hidrolisado durante o processo hidrolítico. De acordo com McMillan (1994) esses extrativos produzem menos inibição do crescimento microbiano do que derivados de lignina ou ácido acético. Íons de metais pesados como ferro, cromo, níquel e cobre podem originar da corrosão de equipamentos da hidrólise, e sua toxicidade inibe enzimas das vias metabólicas dos micro-organismos.

Vários estudos empregando hidrolisados hemicelulósicos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar compostos tóxicos e minimizar seus efeitos negativos na fermentação. Taherzadeh *et al.*, (2000) têm reportado que novas espécies microbianas engenheiradas metabolicamente toleram inibidores e podem diminuir a necessidade de destoxificar hidrolisados. Entretanto, os compostos aos quais essas espécies dão resistência ainda não são definidos.

Diversos métodos de destoxificação – incluindo biológicos, físicos e químicos – têm sido proposto para transformar inibidores em compostos inativos ou reduzir suas concentrações. A efetividade de um método de destoxificação depende do tipo de hidrolisado hemicelulósico e da espécie microbiana empregada, pois cada tipo de hidrolisado tem um diferente grau de toxicidade e cada espécie de micro-organismo tem um diferente grau de tolerância a inibidores (LARSSON *et al.*, 1999).

Entre os métodos de destoxificação mais conhecidos encontram-se elevação de pH com CaO e Ca(OH)₂, seguido de ajuste de pH para a condição de fermentação com H₂SO₄ e H₃PO₄ (ALVES, 1997), utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1998). Alguns tratamentos, apesar de se mostrarem eficientes na remoção de inibidores, podem criar condições que afetam as características do meio e geram uma maior condição de estresse ao micro-organismo. Por exemplo, tratamentos com variação de pH podem desencadear aumentos excessivos na força iônica do meio. Outros tratamentos podem provocar uma diminuição na concentração de açúcares do hidrolisado, como em precipitações ou uso de carvão ativado.

2.4 Fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Quando hemiceluloses são hidrolisadas, uma mistura de monossacarídeos pode ser produzida. Os açúcares predominantes liberados são xilose, glicose e, em concentrações bem menores, arabinose galactose e manose. Quando micro-organismos são expostos a essa mistura de açúcares, os fenômenos de diauxia e taxas diferenciais de utilização de açúcares são frequentemente observados. A utilização diferencial de açúcares por um dado micro-organismo é ditada pela assimilação do açúcar, taxas de utilização e pelo grau de repressão catabólica que afeta a atividade específica enzimática e biossíntese. Como via de regra, os micro-organismos preferem glicose ou galactose seguido por xilose e arabinose. Usualmente, hexoses em hidrolisado podem ser completamente fermentadas dentro de poucas horas. Entretanto, a completa conversão de xilose a etanol levará 48 a 72 horas ou mais (GONG *et al.*, 1999).

2.4.1 Micro-organismos produtores de etanol

A xilose pode ser metabolizada por bactérias, fungos ou leveduras (Tabela 2.2). Em bactérias, a etapa inicial do metabolismo de xilose envolve enzimas indutivas (enzimas que transportam xilose, como xilose isomerase, xiluloquinase). A isomerização direta de xilose a xilulose é o primeiro passo na utilização de xilose por bactérias. Elas produzem uma variedade de produtos finais, incluindo etanol. Linhagens de bactérias têm sido modificadas geneticamente para produzir etanol eficientemente como produto majoritário de seu metabolismo (PADUKONE *et al.*, 1995; ZANGH *et al.*, 1995)

Em leveduras e fungos filamentosos, a xilose é metabolizada via reações redox acopladas. A xilose redutase é a enzima envolvida na redução de xilose a xilitol. Eventos enzimáticos seqüenciais, como a oxidação de xilitol a xilulose, conduzem à utilização de xilose. Muitas leveduras utilizam a xilose diretamente, mas a capacidade de produção de etanol é muito limitada. Apenas poucas espécies de leveduras produzem efetivamente etanol de xilose; essas incluem *Pachysolen*

tanophilus, *Cândida shehatae* e *Pichia stipitis* (NIGAM *et al.*, 1985) . A produção de etanol de xilose por essas três linhagens de leveduras tem sido estudada extensivamente. Linhagens de micro-organismos geneticamente modificados têm sido construídas visando à conversão mais efetiva de xilose a etanol, como a levedura *S. cerevisiae* 1400 - pLNH33 (KRISHNAN *et al.*, 1997) e linhagens de bactérias como *K. oxytoca* M5A1 (OHTA *et al.*, 1991), *E coli* (ALTERTHUM; OHTA, 1990) e *Z. mobilis* (ZHANG *et al.* 1995).

Tabela 2.2: Desempenho de micro-organismos fermentadores de xilose a etanol

Espécie	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)
Bactérias naturalmente ocorrentes				
<i>Bacillus marcerans</i> DMS 1574	20	3,3	0,16	0,03
<i>Bacteróides polypragmatus</i> NRCC 2288	44	6,5	0,15	0,09
<i>Clotridium saccharolyticum</i> ATCC 35040	25	5,2	0,21	0,05
<i>C. thermohydrosulfuricum</i> 39E	5	2,0	,39	
Bactérias recombinantes^a				
<i>Escherichia coli</i> B, pLOI297 (pdc, adhB)	80	39,2	0,49	0,70
<i>E. coli</i> KO11 (pdc, adhB, frd)	80	41,6	0,52	0,87
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 (pdc, adhB)	100	46,0	0,46	0,96
<i>K. planticola</i> SDF20 (pdc, pfl)	17	7,70	0,44	0,18
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4 (Pzb5)	25	11,0	0,44	0,57
Leveduras naturalmente ocorrentes				
<i>Candida shehatae</i> CBS 4705	50	24,0	0,48	0,19
<i>C. shehatae</i> CSIR-Y492	90	26,0	0,29	0,66
<i>C. sp.</i> CSIR-62 A/2	50	20,1	0,40	0,42
<i>C. tenuis</i> CBS 4435 (11) ^b	20	6,4	0,32	0,03
<i>Clavispora sp.</i> UWO (PS) 83-877-1 (11) ^b	20	5,9	0,30	0,11
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 (eth) ^c		10	0,29	0,14
<i>P. tannophilus</i> RL 171	50	13,8	0,28	0,28
<i>P. segobienseis</i> CBS 6857	20	5,0	0,25	0,02
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773 (5) ^b	20	5,9	0,30	0,02
<i>P. stipitis</i> CBS 5774	50	18,5	0,49	0,55
<i>P. stipitis</i> CBS 5775	25	7,8	0,31	0,38
<i>P. stipitis</i> CBS 5776	50	22,3	0,45	0,34
Leveduras recombinantes^a				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (XYL 1, XYL 2)	21,7	1,6	0,07	0,07
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (xyl A)	50	21	0,42	0,19
Fungos filamentosos				
<i>Fusarium avenaceum</i> VTT-D-80146 (5) ^b	50	12	0,24	0,07
<i>F. clamydosporum</i> VTT-D-77055	50	11	0,22	0,07
<i>F. culmorum</i> VTT-D-80148 (3) ^b	50	12	0,24	0,07
<i>F. lycopersici</i> ATCC 16417	50	16	0,32	0,17
<i>F. oxysporum</i> VTT-D-80134 (3) ^b	50	25	0,50	0,17
<i>F. sambucium</i> VTT-D-77056	50	13	0,26	0,08
<i>F. solani</i> VTT-D-77057	50	11	0,22	0,07
<i>Molina sp.</i>	50	12,6	0,25	0,08
<i>Paecilomyces sp.</i> NFI ATCC 20766	100	39,8	0,40	0,24

^a Os genótipos relevantes estão dentro dos parênteses, sendo: pdc, piruvato descarboxilase; pfl, piruvato formatilase; adhB, álcool desidrogenase II; frd, fumarato redutase; pZB5 carrega os genes de xilose isomerase, xiluloquinase, transcetolase e transaldolase; XYL 1, xilose redutase; XYL 2, xilitol desidrogenase; xyl A, xilose isomerase

^b Os parênteses denotam o número de linhagens investigadas

^c Micro-organismo mutante

Fonte: OLSSON, L. e HAHN-HÄGERDAL, 1996

2.4.1.1 Conversão de xilose a etanol por leveduras

Gong *et al.* (1999) apresentam uma série de características gerais de leveduras que fermentam xilose a etanol:

(1) Requerimento de oxigênio (LAPLACE *et al.*, 1991):

- oxigênio é requerido para a assimilação eficiente de xilose;
- sob baixas condições de oxigênio dissolvido, o sistema de transporte de elétrons não é capaz de oxidar o NADH eficientemente. Isto causa um desbalanço de NADH/NAD⁺ que conduz ao acúmulo de xilitol;
- um aumento na concentração de oxigênio dissolvido aumentará o crescimento celular e a fermentação de xilose a etanol;
- quando o oxigênio está em excesso, a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) será aumentada resultando em crescimento celular excessivo e assimilação do etanol produzido;
- a assimilação de etanol conduz ao acúmulo de acetaldeído e ácido acético;
- níveis ótimos de oxigênio dissolvido levarão ao menor acúmulo de xilitol com rendimento de etanol mais alto;

(2) Desbalanço de cofatores:

- xilose redutase e xilitol desidrogenase têm diferentes requerimentos de cofator;
- diferentes fontes de nitrogênio afetam o nível de atividade da enzima xilitol desidrogenase (PALNITKAR; LACHKE, 1992);
- diferentes concentrações de oxigênio dissolvido afetam o balanço de cofatores;

(3) Baixa tolerância a etanol:

- a fermentação pode começar a sofrer inibição a concentrações de etanol de 42 a 45 g/L;

(4) Xilitol, glicerol, arabitol e acetato são os subprodutos comuns;

(5) Maior sensibilidade aos inibidores da fermentação do que leveduras que fermentam glicose;

(6) A produtividade específica de etanol de xilose é no mínimo uma ordem de grandeza menor do que a de fermentação de glicose por *S. cerevisiae*.

Via metabólica

A fermentação alcoólica de xilose por leveduras pode ser dividida em quatro etapas principais (Figura 2.12). Primeiro ocorre a redução de xilose a xilitol mediada por NADPH/NADH ligado à xilose redutase (XR). Em seguida ocorre a oxidação de xilitol a xilulose, mediada pelo NAD^+ ligado à xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose-5-fosfato, um intermediário chave, é gerada da fosforilação da xilulose pela xilulose quinase. A xilulose-5-fosfato é então canalizada à via das pentoses-fosfato para ser metabolizada à biossíntese ou a etanol (PARAJÓ, 1998).

Figura 2.12: Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.

Fonte: Parajó, Domínguez e Domínguez (1998a). Adaptado.

A xilose redutase é NADPH dependente e a xilitol desidrogenase é NAD^+ dependente. A regeneração do NADPH ocorre na via das pentoses fosfato e a regeneração do NAD^+ ocorre somente na cadeia respiratória com o oxigênio como aceptor final de elétrons. Porém, sob suprimento limitado de oxigênio, não ocorre a completa reoxidação do cofator, levando a um desequilíbrio redox. Uma baixa concentração de NAD^+ diminui a taxa de oxidação do xilitol, mas não afeta sua produção na mesma extensão, induzindo sua excreção no meio de cultivo. Um alto grau de aeração favorece o crescimento celular, prejudicando o acúmulo do xilitol (AGUIAR J.R. *et. al.*, 2002). A fosforilação da D-xilulose a D-xilulose-5-fosfato é catalisada pela enzima xilulose quinase e envolve gasto de energia na forma de ATP. A D-xilulose-5-fosfato formada pode ser convertida a piruvato através da conexão com a via das pentoses fosfato. O piruvato obtido pode ser descarboxilado a acetaldeído e reduzido a etanol ou a acetil-CoA e pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico que acoplado à cadeia de transporte de elétrons, regenera NAD^+ e ATP (MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Rendimento de etanol

As moléculas de etanol podem ser produzidas a partir de três moléculas de xilose usando uma combinação de vias pentose fosfato e fermentativa. A equação global para as reações que conduzem à produção de etanol pode ser descrita como segue:

Os valores representam o rendimento teórico máximo – vale ressaltar que para a glicose tem-se o mesmo rendimento teórico. Do carbono total contido na xilose, 2/3 vão para etanol e o restante é perdido como CO_2 . O rendimento máximo de 0,51g/g (100% de conversão) poderia ser alcançado apenas se nenhuma molécula de substrato fosse assimilada para a formação de massa celular, ou oxidado através do ciclo do ácido tricarboxílico. Entretanto, um mínimo de substrato deve ser desviado para manutenção celular. De acordo com dados da DEDINI S/A Industrias de Base (2004) eficiências em torno de 92% tem sido reportadas na

produção de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar (tendo glicose como substrato) por usinas de grande porte no Brasil.

Pichia stipitis

Pichia stipitis é a levedura natural mais efetiva para a conversão de xilose a etanol. Esta levedura apresenta muitas características comuns às de *Candida shehatae*. Toivola *et al.* (1984) realizaram um programa de *screening* sistemático com linhagens de cerca de 200 espécies de leveduras e identificaram *P. stipitis* como umas das espécies que produzem etanol de xilose com melhores rendimentos e produtividade. Há muitos estudos que tem explorado a propriedade desta levedura em relação a seu requerimento de oxigênio, tolerância a etanol, balanço de cofatores, etc. A produção de etanol de xilose por *P. stipitis* exhibe as seguintes características (DU PREEZ *et al.* 1989; SLININGER *et al.*, 1991):

- (1) Traços de oxigênio são requeridos para sustentar o crescimento celular e manutenção;
- (2) *P. stipitis* apresenta uma tolerância maior a etanol (64 g/L) do que outras leveduras que fermentam xilose a etanol;
- (3) Comparado à *C. shehatae*, *P. stipitis* apresenta menor produtividade específica em etanol, mas maior rendimento.
- (4) a produção de xilitol por *P. stipitis* é muito maior do que a de algumas outras leveduras que fermentam xilose.

2.4.2 Influência de fatores ambientais no processo fermentativo

Um processo biotecnológico utilizando micro-organismos para obtenção de produtos de interesse, como na produção de bioetanol, depende de diversos fatores para que ocorra de forma eficiente como aeração, pH, temperatura, concentração dos componentes nutricionais, concentração de células, concentração de produtos formados e agitação.

O suprimento de oxigênio é um dos fatores mais importantes na fermentação alcoólica de xilose por leveduras, pois influencia no crescimento celular, no rendimento e produção de etanol bem como na formação de subprodutos. Isso indica que a taxa de aeração é determinante na quantidade de carbono utilizada pela célula para o crescimento celular ou produção de etanol, existindo um nível de oxigenação que levaria ao máximo rendimento e produtividade em etanol coincidentes com baixo rendimento em biomassa (SCHNEIDER, 1989; RIZZI *et al.* 1989).

De acordo com Nigam (2001) níveis insuficientes de aeração na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* Y-7124 levam a um consumo lento de xilose, por outro lado, níveis excessivos de aeração reduzem o rendimento devido à oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado. Segundo Taniguchi *et al.* (1997), em cultivo anaeróbio *Pichia stipitis* CBS 5773 consumiu uma quantidade insignificante de xilose, não sendo capaz de produzir etanol.

Um processo de bioconversão pode ser fortemente afetado por mudanças no pH do meio. Du-Preez (1994) reportou que o rendimento em etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 7126 sofreu grande influência por variações de pH entre 2,5 e 6,5, estando o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. Roberto *et al.* (1994) reportaram que a variação do pH inicial entre 4,0 e 6,0 exerceu pouca influência sobre os parâmetros fermentativos por *Pichia stipitis* Y 7124, obtendo-se nesta faixa de pH $Y_{p/s}$ entre 0,34 e 0,37 g/g, $Y_{x/s}$ entre 0,11 e 0,14 g/g e produtividades em torno de 0,90 g/L.h.

Em geral, a temperatura ótima de produção de etanol para espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses, como *Pichia* e *Cândida*, encontram-se na região de 30 a 32 °C, embora esta faixa de temperatura ótima de processo possa variar dependendo da cepa, do tipo de substrato e ainda da concentração de açúcar (DU PREEZ, 1994).

Uma avaliação da faixa de temperatura capaz de favorecer o processo de bioprodução de etanol a partir de xilose foi descrito por Slininger e Bothast (1990), que em seus estudos observaram que a máxima produtividade e concentração de etanol obtidas pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, a partir de 40 g/L de xilose, ocorreu na faixa de temperatura entre 23 e 30 °C, variando pouco nesta região, e quando a concentração inicial de xilose foi elevada para 150 g/L esta faixa foi deslocada para 27 e 33 °C. Du Preez *et al.* (1986) relataram que para leveduras como *P. stipitis* CBS 7126 e *Cândida shehatae* CBS 2779 a máxima velocidade

específica de crescimento, produtividade específica e produtividade volumétrica em etanol ocorre em 30 °C, sendo observado nesta temperatura um curto tempo de fermentação, e que para *P. stipitis* o coeficiente de conversão em etanol permanece constante, com um valor de 0,42 g/g até 33 °C. Quando a temperatura foi elevada para 36 °C houve um decréscimo para 0,29 g/g na conversão em etanol.

Em investigações realizadas com *Pichia stipitis* Y-7124 encontrou-se que o rendimento da fermentação alcoólica permanece constante entre 20 e 110 g/L de xilose e, embora não se tenha verificado acúmulo de xilitol em concentrações acima de 110 g/L, apresentam-se rendimentos gradativamente menores (LAPLACE *et al.*, 1991). De acordo com Roberto *et al.* (1991), em investigações com esta mesma linhagem, *P. stipitis* foi inibida em concentrações iniciais entre 76 e 99 g/L, ao passo que o rendimento em etanol foi somente afetado para concentrações acima de 145 g/L.

Adicionalmente, existem notificações que afirmam que o acúmulo de xilitol durante fermentações com leveduras obedece mais às condições ambientais, como a disponibilidade de oxigênio a alta densidade celular, do que à concentração inicial de substrato (DU PREEZ *et al.* 1986).

A tolerância das leveduras ao etanol é de vital importância para alcançar níveis altos de produção e viabilizar a destilação do meio fermentado. Essa tolerância difere entre as leveduras e é afetada também pelas condições de cultivo, especialmente pela temperatura (DU PREEZ *et al.* 1987).

Em fermentações realizadas com várias linhagens de *C. shehatae* e *P. stipitis*, conduzidas em batelada alimentada com níveis de oxigênio baixos, o crescimento celular foi mais sensível ao efeito inibitório do etanol adicionado do que o efeito gerado pelo micro-organismo. As linhagens *C. shehatae* CSRI Y 633 e CSRI Y 492 e *P. stipitis* CBS 7126 apresentaram-se como as melhores produtoras, alcançando concentrações entre 44 e 47 g/L de etanol (DU PREEZ *et al.* 1989).

Meyrial *et al.* (1995) concluíram que a tolerância a etanol por *P. stipitis* (NRRL Y-7124) dependente da fonte de carbono (glicose ou xilose). Esta relação entre a tolerância e a fonte de carbono foi estudada a partir do crescimento e atividade da ATPase presente na membrana plasmática para cultivo com glicose ou xilose, sendo melhores as atividades apresentadas em processos realizados utilizando a glicose. Nessa mesma linhagem, em estudos sobre o efeito do etanol sobre a fermentação foi observado que na medida em que se aumenta a concentração desse produto no

meio o rendimento em xilitol, soluto compatível ao efeito inibidor, aumenta linearmente e, conseqüentemente, apresenta-se uma diminuição proporcional no rendimento em etanol (DELGENES *et al.*, 1988).

Os meios de cultivo podem ser complexos ou quimicamente definidos. Os meios complexos são formulados com base em subprodutos industriais e extratos naturais, tais como: melaço, milhocina, hidrolisados hemicelulósicos e outros. Sua composição é complexa e variável e contém fontes de diferentes elementos químicos (NIGAM, 2002). Os meios complexos são adequados em nível industrial por serem mais baratos e porque, em certos casos, se obtêm melhores rendimentos e produtividades volumétricas. Estes meios podem requerer suplementação nutricional com compostos que proporcionem quantidades adicionais de alguns elementos, como N, Mg e P (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelo agente biológico. Buscam-se, então, as fontes adequadas que possuam os componentes necessários ao bom desempenho da célula (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Os micro-organismos necessitam, para suas funções estruturais e fisiológicas, de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e, em alguns casos, cloro. Em adição, requerem elementos-traços, os quais desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas. Estes últimos incluem manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro e são, em geral, necessários em quantidades relativamente baixas (RHODES; FLETCHER, 1963; MADIGAN *et al.*, 2000).

Existe uma grande disponibilidade de fontes de nitrogênio orgânico de grande aplicação em bioprocessos industriais, como a ureia. Dentre as principais fontes de nitrogênio complexas empregadas em bioprocessos, o extrato de levedura tem sido um dos mais utilizados em desenvolvimento de pesquisa por ter uma composição rica em vitaminas do complexo B e aminoácidos (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

Os nutrientes inorgânicos podem agir de quatro formas no interior da célula: entrar no metabolismo promovendo a síntese de compostos essenciais ao funcionamento da célula; estimular o metabolismo como co-fator para reações enzimáticas; inibir o metabolismo e, finalmente, contribuir para as propriedades osmóticas (JENNINGS, 1988).

Amartey e Jeffries (1994) compararam diferentes fontes de nitrogênio e outros nutrientes, tais como: extrato de malte, extrato de levedura, peptona, sais (MgSO_4 e KH_2SO_4) e CSL (corn steep liquor, um subproduto da fabricação de amido de milho) para a bioconversão de xilose em etanol por *Pichia stipitis* CBS 6054. Estes autores observaram que os melhores resultados obtidos em crescimento celular e produção de etanol foram para os meios contendo CSL, mesmo quando utilizado como única fonte de nutrientes, tendo concluído que CSL pode ser usado como uma fonte barata de nitrogênio e outros nutrientes para fermentação de xilose por *P. stipitis* CBS 6054.

Silva (2007) estudou a influência da suplementação nutricional em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na fermentação alcoólica por *P. stipitis* Y-7124 utilizando ureia, MgSO_4 e extrato de levedura. O estudo concluiu que apenas a adição de 3 g/L de extrato de levedura foi necessária para uma conversão de 0,29 g/g e uma produtividade igual a 0,24 g/L.h de xilose em etanol.

3. OBJETIVOS

Geral

Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia que permita a obtenção de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar como fonte de açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol.

Específicos

- Caracterizar quimicamente a palha de cana-de-açúcar;
- Determinar condições de hidrólise ácida que permitam extração de açúcares fermentescíveis verificando a influência dos parâmetros tempo, temperatura, a relação entre a massa seca de palha e o volume de solução ácida além da concentração da solução ácida sobre a hidrólise da palha;
- Otimizar as condições de hidrólise ácida e determinar um modelo matemático que represente o processo de hidrólise;
- Realizar ensaios de fermentação alcoólica do hidrolisado hemicelulósico obtido de palha de cana a fim de se verificar a viabilidade da utilização deste resíduo agrícola na produção de bioetanol;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e tratamento do hidrolisado hemicelulósico

4.1.1 Matéria-prima

A palha de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi cedida pela usina São Francisco, localizada em Sertãozinho, SP. Após secagem ao sol a palha foi moída a 20 mesh (0,85 mm) em moinho de facas e estocada em sala de armazenagem à temperatura ambiente para posterior utilização.

4.1.2 Caracterização química da palha de cana-de-açúcar

A caracterização da palha de cana foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009). A palha foi moída e passada em peneira de 20 mesh e determinada a sua umidade.

Para a caracterização, adicionou-se a um béquer de 100 mL 2 g da palha em base seca e 10 mL de ácido sulfúrico 72% m/m. Em seguida manteve-se a mistura em banho termostático a 45°C sob agitação por 7 minutos.

A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a amostra transferida quantitativamente para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume de água a 275 mL. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o frasco Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado a uma pressão de 1,05 bar (121 °C) por 30 minutos.

Após a descompressão, o frasco Erlenmeyer foi retirado da autoclave e resfriado à temperatura ambiente. A mistura reacional foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico contendo o hidrolisado foi armazenado para posterior

análise de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel.

4.1.3 Determinação do teor de lignina insolúvel em meio ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa a 105 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa seca de palha, após descontar a massa de cinzas.

4.1.4 Determinação do teor de cinzas

A amostra resultante da etapa de determinação de lignina insolúvel foi colocada em cadinho de porcelana e submetida a uma pré-calcinação à temperatura de 400 °C, por 1 hora, com o cadinho tampado. Em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material a 800 °C por 2 horas. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

A massa real de lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa obtida da etapa de determinação de lignina insolúvel e a massa obtida de cinzas.

4.1.5 Determinação das condições iniciais de hidrólise ácida da palha

A palha de cana foi submetida à hidrólise química com ácido sulfúrico diluído e os ensaios experimentais foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 10 g de palha seca e a reação conduzida em autoclave nas condições determinadas por um planejamento estatístico fatorial fracionado 2^{4-1} . Os níveis dos fatores

estudados, com seus valores reais e codificados, estão apresentados na Tabela 4.1 enquanto que o delineamento experimental verifica-se na Tabela 4.2. Nesta fase foi investigada a influência dos fatores: relação entre a massa seca do resíduo e a solução ácida (REL S:L), concentração da solução ácida, temperatura e tempo de reação sobre a resposta concentração de xilose (g/L).

Tabela 4.1: Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial do tipo 2^{4-1} para hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar.

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Tempo (minutos)	10	35	60
Temperatura (°C)	110	120	130
Conc ácido (% m/v)	0,5	2,0	3,5
Relação S:L (g/mL)	1:2	1:6	1:10

Os parâmetros foram analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao valor codificado do nível inferior dos parâmetros, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior; a resposta investigada foi a concentração de xilose em g/L.

Tabela 4.2: Matriz do planejamento fatorial do tipo 2^{4-1} com triplicata no ponto central para avaliação dos efeitos dos parâmetros tempo, temperatura, concentração do ácido e a relação massa seca de palha e volume da solução ácida (REL S:L).

ENSAIOS	TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	CONC ÁCIDO (% m/v)	REL S:L
1	10	110	0,5	1:2
2	60	110	0,5	1:10
3	10	130	0,5	1:10
4	60	130	0,5	1:2
5	10	110	3,5	1:10
6	60	110	3,5	1:2
7	10	130	3,5	1:2
8	60	130	3,5	1:10
9	35	120	2,0	1:6
10	35	120	2,0	1:6
11	35	120	2,0	1:6

A eficiência de extração de xilose foi calculada a partir da equação (2):

$$\frac{C * V}{M} * 100\% \quad (2)$$

onde:

C: Concentração de xilose no hidrolisado (g/L);

V: volume de solução ácida utilizada na relação sólido;líquido;

M: massa de xilose obtida na caracterização da palha de cana

A relação entre os valores codificados e os valores reais foi calculado com utilização da equação (3):

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\frac{\Delta X}{2}} \quad (3)$$

onde:

x_i : valor codificado da variável independente;

X_i : valor real da variável independente;

X_0 : valor real da variável independente no ponto central;

ΔX : média da distância entre os níveis inferior e superior

4.1.6 Otimização da hidrólise ácida

Nesta fase, a partir dos resultados obtidos de concentração de xilose e eficiência de extração de xilose no planejamento fatorial fracionado, conforme item 4.1.5, foram selecionadas as variáveis a serem consideradas na etapa de otimização da hidrólise. Esta otimização foi realizada utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR), de acordo com Barros Neto *et al.* (2001). Os ensaios experimentais foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 10 g de palha seca e a reação conduzida em autoclave de acordo com um planejamento composto central de face centrada, tendo como parâmetros independentes a temperatura e a concentração da solução de ácido sulfúrico. O tempo de reação foi fixado em 30

minutos e a relação S:L em 1:4 (g:mL). Os níveis investigados para cada parâmetro estão apresentados na Tabela 4.3 e o delineamento experimental pode ser observado na Tabela 4.4.

Os hidrolisados obtidos foram filtrados, caracterizados e armazenados em câmara fria a 0,5 °C.

Tabela 4.3: Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial central composto de face centrada 2^2 para hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar.

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	110	120	130
Conc ácido (% m/v)	0,5	2,0	3,5

Os parâmetros foram analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao valor codificado do nível inferior dos parâmetros, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior; a resposta investigada foi a concentração de xilose em g/L.

Tabela 4.4: Matriz do planejamento experimental composto central de face centrada 2^2 fixando o tempo em 30 minutos e a relação sólido:líquido em 1:4 (g:L).

ENSAIOS	TEMPERATURA (°C)	CONCENTRAÇÃO ÁCIDA (% m/v)
1	110	0,5
2	130	0,5
3	110	3,5
4	130	3,5
5	110	2,0
6	130	2,0
7	120	0,5
8	120	3,5
9	120	2,0
10	120	2,0
11	120	2,0
12	120	2,0

4.1.7 Destoxificação do hidrolisado

O processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana foi realizado empregando-se CaO seguido de utilização de carvão ativo (C 1012.01AH, Hiperquímica) a 3% m/v no meio a 45°C por 30 minutos e agitação de 200 rpm, de acordo com Mussato e Roberto (2004).

4.2 Utilização do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar em processo fermentativo para obtenção de bioetanol

4.2.1 Micro-organismo

A levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria - Illinois (EUA) foi empregada como agente de fermentação do hidrolisado hemicelulósico para a obtenção de bioetanol. A cultura foi conservada a 4°C em meio de manutenção agar extrato de malte.

4.2.2 Processo fermentativo

4.2.2.1 Preparo de inóculo

O preparo do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 1000mL contendo 400 mL de meio sintético composto de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 30 g/L de glicose. O cultivo foi conduzido em agitador rotatório (New Brunswick, Scientific Co., EUA) com agitação de 200 rpm a 30°C por 24 horas. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação (Beckman J6 HC, rotor JS – 4.2) a 2560 x g por 15 minutos e utilizadas para o preparo de uma suspensão

de células com concentração igual a 57 g/L, a qual foi empregada como inóculo nos ensaios de fermentação em frascos Erlenmeyer.

4.2.2.2 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico

Para definir as condições de fermentação foi realizado um planejamento experimental fatorial composto central de face centrada 2^3 com o objetivo de avaliar a influência dos fatores nutricionais: concentração de ureia, concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e concentração de extrato de levedura (g/L). A concentração inicial de células e a velocidade de agitação do meio de fermentação foram fixadas em 1,0 g/L e 200 rpm, respectivamente. Os ensaios foram realizados visando às respostas fator de rendimento e produtividade em etanol. Estes ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de hidrolisado destoxificado suplementado de acordo com o delineamento experimental apresentado na Tabela 4.5 e na Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados na suplementação nutricional do meio de fermentação a partir de um planejamento fatorial composto central de face centrada 2^3 para fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Ureia (g/L)	0	2,5	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	0	0,5	1,0
Extrato de levedura (g/L)	0	2,5	5,0

Os parâmetros foram analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao nível inferior do parâmetro, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior; as respostas investigadas serão o fator de rendimento e a produtividade em etanol.

Tabela 4.6: Matriz do planejamento experimental composto central de face centrada 2^3 para avaliação do efeito da suplementação nutricional ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.

ENSAIOS	FATORES		
	UREIA	MgSO ₄ *7H ₂ O	EXTRATO DE LEVEDURA
1	0	0	0
2	5,0	0	0
3	0	1,0	0
4	5,0	1,0	0
5	0	0	5,0
6	5,0	0	5,0
7	0	1,0	5,0
8	5,0	1,0	5,0
9	0	0,5	2,5
10	5,0	0,5	2,5
11	2,5	0	2,5
12	2,5	1,0	2,5
13	2,5	0,5	0
14	2,5	0,5	5,0
15	2,5	0,5	2,5
16	2,5	0,5	2,5
17	2,5	0,5	2,5

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada em balança analítica, modelo MB 200, por exposição do material a radiação infravermelha em temperatura de 105°C por 30 minutos.

4.3.2 Determinação do teor de carboidratos e ácidos orgânicos

A caracterização dos hidrolisados obtidos nas etapas de hidrólise ácida foi realizada, quanto aos carboidratos e ácidos orgânicos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a 45 °C.

Inicialmente o pH das amostras de hidrolisado foi ajustado para a faixa de 1 a 3 e os compostos fenólicos presentes nas amostras foram removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters). Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A.

4.3.3 Determinação de lignina solúvel

O teor de lignina solúvel foi determinado por absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Foram colocados 5 mL do hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química da palha em um balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se 40 gotas de NaOH 6,5 N. O volume foi completado com água destilada e a mistura resultante analisada por espectrofotometria. A concentração de lignina solúvel no hidrolisado foi calculada a partir da equação 4.

$$C_{Lig} = \frac{(A_{280nm} - \epsilon_{HMF} \cdot C_{HMF} - \epsilon_{Furf} \cdot C_{Furf} - 0,0457)}{21,7973} \quad (4)$$

onde:

C_{Lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);

A_{280nm} : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;

ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹);

$\epsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural (146,85 L.g⁻¹);

C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);

C_{Furfural} : Concentração de furfural no hidrolisado (g/L)

4.3.4 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

O teor de furfural e hidroximetilfurfural foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a 25 °C.

O hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química da palha de cana foi previamente diluído com água na razão de 1:5, sendo posteriormente filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,47 μm (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras, e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 μl . Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com soluções padrão desses compostos.

4.3.5 Determinação do teor de celulose e hemicelulose

O teor de celulose foi calculado dividindo-se o valor da concentração de glicose por 1,111, enquanto que o teor de hemicelulose foi calculado dividindo-se a concentração de xilose mais arabinose por 1,136 somado à concentração de ácido acético dividido por 1,389, conforme metodologia descrita por Rocha, 2000.

4.3.6 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria em aparelho Micronal modelo B474, com correção de temperatura.

4.3.7 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada em espectrofotômetro Beckman DU 640B, por absorção a 600nm. Os valores de concentração foram obtidos a partir de curva de calibração previamente preparada de peso seco em função da absorvância.

4.3.8 Análise estatística dos resultados

Os resultados do delineamento experimental, relativos à investigação dos parâmetros considerados e a determinação da melhor condição de hidrólise da palha de cana-de-açúcar, foram analisados por metodologia de Superfície de Resposta (*RSM*). Para a composição de modelos, bem como a respectiva superfície de resposta, foram considerados os parâmetros estatisticamente significativos. A validade do modelo matemático gerado foi verificada em função dos coeficientes de regressão, bem como por meio da análise de variância (BARROS NETO *et al.* 2001).

Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa STATISTICA versão 5.0 e MINITAB versão 15.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química da palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar foi submetida a ensaios experimentais segundo metodologia descrita no item 4.1.2 a partir de 2g de amostra em base seca para sua caracterização e os resultados estão apresentados quanto aos constituintes básicos (Tabela 5.1) e quanto às frações macromoleculares (Tabela 5.2).

Com relação à quantificação dos monômeros de açúcares, verificou-se que 26,57% da palha corresponde à xilose, representando 86,27% de sua fração hemicelulósica. A arabinose é o segundo açúcar mais abundante na fração hemicelulósica da palha e apresentou uma relação de 5,9 vezes menor que o teor de xilose (4,5% da palha de cana). Esses resultados estão de acordo com a literatura, onde se relata cerca de 80% de açúcares totais em hemicelulose de bagaço de cana (AGUILAR *et al.*, 2002; MOSIER *et al.*, 2005).

A hemicelulose de gramíneas como a palha de cana é caracterizada como arabinoxilana, apresentando um teor de glicose insignificante (FENGEL; WEGENER, 1989), assim o teor de glicose obtido no hidrolisado hemicelulósico pode ser considerado unicamente da fração celulósica, advindo de regiões amorfas nas fibras desta fração.

Substituintes como grupos glucouranosil e acetila constituem ainda a xilana caracterizada em proporções da ordem de 0,06 e 0,10, em relação à xilose, respectivamente (Tabela 5.1).

A fração hemicelulósica representou 30,79% da palha, enquanto que a celulose correspondeu à maior parte do material, representando 40,84% da mesma. Este valor para o teor de hemicelulose é superior a valores encontrados para outros resíduos lignocelulósicos como *Eucalyptus globulus* com 17,1% (CRUZ *et al.*, 2000), bagaço de cana com 26,2% (NEUREITER *et al.*, 2002) e palha de arroz com 22% (MUSSATO; ROBERTO, 2002). Os resultados encontrados estão entre os mais elevados, comparando-se aos reportados por Cruz *et al.* (2000) para folhas ou sabugo de milho, com 34,7% de hemicelulose. O teor de celulose encontrado é

equivalente a resultados reportados por vários autores para bagaço de cana e madeiras (CANETTIERI *et al.*, 2003).

Tabela 5.1: Composição química da palha quanto a seus constituintes básicos

Açúcares (g/g de palha)			Ácidos (g/g de palha)	
Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Glucurônico	Acido Acético
0,4295	0,2657	0,0450	0,0161	0,0259

Média de valores dos ensaios conduzidos em triplicata

Tabela 5.2: Caracterização química da palha de cana

<i>Constituintes</i>	<i>Palha in natura</i>		
Celulose	40,84%	±	0,9%
Hemicelulose	30,79%	±	1,0%
Lignina Insolúvel	20,58%	±	0,2%
Lignina Solúvel	5,22%	±	0,6%
Lignina Total*	25,80%	±	0,1%
Cinzas	2,56%	±	0,1%
Total	100,00%	±	2,4%

*Incluindo extrativos

5.2 Determinação das condições iniciais de Hidrólise ácida da palha

As condições de hidrólise investigadas para cada fator nos ensaios do planejamento experimental fracionado da hidrólise ácida da palha de cana podem ser observadas na Tabela 5.3 juntamente com as respostas obtidas de concentração de xilose expressa em gramas/litro.

A hemicelulose é considerada mais susceptível à degradação do que a celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Com isso, é possível se obter um hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses (principalmente xilose) com maior facilidade no

processo de disponibilização dos açúcares do que no processo hidrolítico para disponibilização de glicose da fração celulósica.

A concentração de xilose apresentou uma variação de 0,33 g/L (ensaio 1) a 33,05 g/L (ensaio 12), alcançando rendimento de extração de xilose de até 74,6%.

As melhores respostas para a concentração de xilose foram encontradas nas condições do ponto central (ensaios 9 a 12), em torno de 31,70 g/L (Tabela 5.3), seguida do ensaio 7 (22,99 g/L) em que os fatores temperatura e concentração ácida estão em seus níveis superiores. O ensaio 8, com todos os fatores em seus níveis superiores apresentou uma resposta de 20,26 g/L de xilose. Esse valor um pouco inferior ao resultado do ensaio 7, pode ser justificado por degradação da xilose em função do tempo de reação mais elevado. Visto que as melhores respostas para a concentração de xilose foram obtidas nas condições do ponto central (Tabela 5.3), estima-se que a região investigada a partir dos 4 fatores em questão e seus níveis seja modelada por uma função quadrática.

De acordo com a Tabela 5.3, os menores valores para concentração de xilose (ensaios 1, 2 e 3) foram obtidos quando se utilizou o nível inferior da solução ácida (0,5 % m/v) enquanto que os maiores valores foram obtidos quando se utilizou o nível superior (3,5 % m/v), sugerindo que este fator tenha maior influência sobre a extração de xilose.

Em contraste com o ensaio 2, o ensaio 7 foi realizado quando se utilizou a temperatura e a concentração da solução ácida em seus níveis superiores e o tempo e a relação sólido:líquido (REL S:L) em seus níveis inferiores, apresentando a maior resposta (22,99 g/L). Deduz-se então que a temperatura e a concentração da solução ácida exerçam maior influência sobre o processo de hidrólise para extração de xilose do que o tempo e a relação S:L.

De acordo com a literatura, o tempo, a temperatura, a concentração da solução ácida e a relação sólido:líquido têm sido considerados os fatores de maior influência sobre o processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Kumar *et al.* (2009) conduziram ensaios de hidrólise ácida de *water-hyacinth* utilizando H_2SO_4 2% v/v, com uma relação S:L de 1:10 m/v, por 7 horas em frascos agitados e temperatura ambiente. Canettieri *et al.* (2004) realizaram um planejamento experimental para hidrólise ácida de *Eucalyptus grandis* e obtiveram como a melhor condição: H_2SO_4 0,65% m/v, 157 °C por 20 minutos e uma relação S:L igual a 1:8,6. Pessoa Jr. *et al.* (1997), também em planejamento experimental, determinaram as

melhores condições para hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar como sendo: 100 mg de H_2SO_4 por grama de matéria seca numa relação S:L igual a 1:10 com um tempo de 10 minutos e temperatura de 121 °C.

Tabela 5.3: Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} para extração de xilose da palha de cana-de-açúcar contendo a resposta xilose

ENSAIO	TEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	CONC. ÁCIDO (% m/v)	REL S:L (g/mL)	XILOSE (g/L)
1	10	110	0,5	1:2	0,33
2	60	110	0,5	1:10	0,87
3	10	130	0,5	1:10	1,06
4	60	130	0,5	1:2	11,67
5	10	110	3,5	1:10	14,84
6	60	110	3,5	1:2	4,61
7	10	130	3,5	1:2	22,99
8	60	130	3,5	1:10	20,26
9	35	120	2	1:6	33,05
10	35	120	2	1:6	32,77
11	35	120	2	1:6	29,53
12	35	120	2	1:6	31,44

A Tabela 5.4 apresenta o efeito quantitativo estimado que cada um dos fatores possui sobre a concentração de xilose com significância estatística ao nível de 95% de confiança. Verifica-se que apenas os fatores concentração da solução ácida e temperatura apresentaram significância e ainda que esses fatores exercem efeito positivo sobre a resposta. Pelos valores dos efeitos obtidos por meio do teste t verifica-se que o fator concentração da solução ácida exerce maior influência sobre a resposta do que os outros fatores, seguido da temperatura.

Sugere-se que o tempo de 10 minutos seja suficiente para que as reações de hidrólise ocorram dentro da região investigada e que para tempos maiores que esse não ocorram aumentos expressivos na concentração de xilose no hidrolisado.

Um mínimo de volume de solução ácida se faz necessário para que se possa impregnar o sólido a ser hidrolisado, de forma que o ácido tenha mobilidade no meio úmido para efetuar as reações hidrolíticas. Em função disto o fator relação S:L foi investigado e a análise estatística não apresentou significância, ao nível de 95% de confiança, na região investigada. Isto induz à utilização deste fator no nível inferior

(1:2 em g:mL). Vale ressaltar que valores da relação S:L inferiores a este podem gerar grandes dificuldades de processo para a recuperação do hidrolisado.

Tabela 5.4: Estimativa dos efeitos dos fatores sobre a extração de xilose (g/L), teste t de student e nível de significância de cada fator.

FATORES	Efeitos	Erro padrão	t (6)	p
Mean/Interc.	9,5800	1,6945	5,6537	0,0013
Curvatura	44,2344	5,8698	7,5360	0,0003
Conc Acido	12,1919	3,3889	3,5976	0,0114
Temperatura	8,8340	3,3889	2,6067	0,0403
Tempo	-0,4495	3,3889	-0,1326	0,8988
Rel S:L	-0,6435	3,3889	-0,1899	0,8557

R²: 0,9273; R² ajustado: 0,8668; nível de significância a 95% de confiança (p < 0,05)

5.3 Otimização das condições de hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar

Após a verificação de que apenas os fatores temperatura e concentração da solução ácida foram significativos na região investigada, optou-se por realizar os ensaios de otimização das condições de hidrólise fixando o tempo em 30 minutos e a relação S:L em 1:4 g/mL – embora a relação S:L de 1:2 pudesse ser utilizada, uma relação S:L de 1:4 permitiu maior viabilidade operacional na recuperação do hidrolisado.

Um planejamento fatorial completo 2² foi realizado com o objetivo de otimizar as condições de hidrólise ácida da palha de cana e os experimentos realizados estão indicados na Tabela 5.5, onde se apresenta ainda as respostas obtidas em cada ensaio. Em seguida realizou-se os ensaios experimentais adicionais para os pontos axiais de um planejamento central composto de face centrada (CCFC), que completam a tabela. Os ensaios foram realizados visando à extração de xilose em termos de concentração de xilose e eficiência de extração, expressa em porcentagem de xilose extraída em relação à fração de xilose presente na palha. Posteriormente prosseguiu-se a análise estatística considerando como resposta a concentração de xilose em gramas/litro.

Tabela 5.5: Matriz do planejamento experimental fatorial composto central de face centrada (CCFC) para extração de xilose da palha de cana-de-açúcar

ENSAIOS	TEMPERATURA (°C)	CONC ÁCIDO (% m/v)	XILOSE* (g/L)	EFICIÊNCIA** (%)
1	110	0,5	0,59	0,88
2	130	0,5	0,98	1,48
3	110	3,5	14,47	21,78
4	130	3,5	47,50	71,51
5	110	2,0	29,76	44,80
6	130	2,0	47,67	71,77
7	120	0,5	0,69	1,04
8	120	3,5	34,12	51,37
9	120	2,0	33,44	50,34
10	120	2,0	31,63	47,62
11	120	2,0	34,79	52,37
12	120	2,0	33,86	50,97

*Variável dependente no delineamento experimental. **Eficiência de extração de xilose em relação à fração de xilose presente na palha; os ensaios de hidrólise foram realizados com o tempo fixado em 30 minutos e a relação S:L fixada em 1:4 g/mL.

Considerando a influência de cada fator sobre a resposta, observa-se que quando a concentração da solução ácida foi fixada em seu nível inferior, encontrou-se valores de concentração de xilose no hidrolisado muito baixos (ensaios 1 e 2), mesmo tendo variado a temperatura do nível inferior ao superior. Entretanto, quando se fixou a temperatura em seu nível inferior conduziu-se a variação da concentração da solução ácida, a concentração de xilose no hidrolisado aumentou significativamente, variando de 0,88g/L para 14,47g/L.

Os maiores valores de extração de xilose foram obtidos com a temperatura em seu nível superior (130°C), com a concentração da solução ácida variando de 2,0% a 3,5%. Esses valores correspondem aos ensaios 4 e 6, para os quais não houve diferença estatística entre eles. Para estes ensaios foi possível obter-se uma concentração em torno de 47,5 g/L de xilose, com uma extração em torno de 71,5% de xilose da estrutura hemicelulósica.

Sugere-se que a concentração da solução ácida tenha maior influência sobre a extração de xilose da palha de cana, no entanto as maiores respostas de extração ocorreram em níveis elevados dos 2 fatores.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada considerando-se a resposta concentração de xilose (Tabela 5.6) e observou-se que tanto a temperatura quanto a concentração da solução ácida foram significativas ao nível de 95% de confiança e que a interação entre estes 2 fatores também foi significativa.

O modelo gerado apresentou um coeficiente de determinação ajustado de 0,94, significando que 94% das variações totais em torno da média, provocadas pelas condições empregadas experimentalmente, foram explicadas pela regressão. Este fato indica que este modelo matemático gerado ajusta-se adequadamente às respostas. Pela ANOVA verifica-se ainda que o modelo não apresenta falta de ajuste ($p > 0,05$), indicando que este pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 5.6: Análise de variância do planejamento composto central de face centrada para análise da resposta concentração de xilose em g/L

FONTE	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	3233,09	4	808,27	114,18	< 0.0001
A	439,18	1	439,18	62,04	0.0001
B	1467,32	1	1467,32	207,28	< 0.0001
B²	1060,30	1	1060,30	149,78	< 0.0001
AB	266,29	1	266,29	37,62	0.0005
Residual	49,55	7	7,08	-	-
Falta de ajuste	44,28	4	11,07	6,30	0.0813
Erro Puro	5,27	3	1,7582	-	-
SQ Total	3282,65	11	-	-	-

SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática; R^2 : 0,9849; R^2 ajustado: 0,9763; Valores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$); A: termo linear da temperatura; B: termo linear da concentração da solução ácida; B²: termo quadrático da concentração da solução ácida; AB: termo de interação entre os fatores A e B.

O efeito de sinergia dos 2 fatores pode ser visualizado na Figura 5.1. Com a concentração da solução ácida no nível inferior a variação de temperatura praticamente não exerceu efeito de extração de xilose sobre a palha de cana, enquanto que com a solução ácida em seu nível de concentração superior o processo de extração apresentou grande sensibilidade à variação de temperatura.

Figura 5.1: Efeitos de interação entre os fatores temperatura (A) e concentração da solução ácida (B) sobre a extração de xilose da palha de cana-de-açúcar

Para uma visualização com maior clareza da influência dos fatores sobre a extração de xilose, uma superfície de resposta foi gerada (Figura 5.2) representando as respostas obtidas dentro da região investigada. Nesta figura, pode-se verificar uma curvatura da superfície quando os fatores variam de seus níveis inferiores aos níveis superiores, observando-se um ponto de máximo que corresponde à extração de 71,77% de xilose.

Figura 5.2: Superfície de resposta representando a influência da temperatura e da concentração da solução ácida sobre a extração de xilose da palha de cana-de-açúcar no processo de hidrólise ácida.

Uma análise do comportamento da concentração de xilose em função da temperatura e da concentração da solução ácida pode ser realizada por meio do modelo preditivo gerado a partir dos coeficientes da regressão, obtido pela metodologia de superfície de resposta, onde C corresponde à resposta em g/L, A corresponde à concentração da solução ácida em % m/v e T corresponde à temperatura em °C:

$$C = 35,19 + 8,56*A + 15,64*B - 18,80*B^2 + 8,16*A*B \quad (5)$$

A partir do modelo empírico gerado pela análise estatística (equação 5), pode-se prever as condições que permitem a máxima extração de xilose, em g/L de xilose no hidrolisado hemicelulósico, dentro da região investigada em função dos fatores temperatura e concentração da solução ácida. Essas condições, com a respectiva concentração máxima de xilose obtida podem ser observadas na Tabela 5.7, onde se verifica uma predição de 51,27 g/L de xilose (77,2% de extração) nas condições de temperatura igual a 130 °C (valor codificado igual a 1) e concentração da solução ácida igual a 2,93% m/v (valor codificado igual a 0,62).

Tabela 5.7: Condições previstas pelo modelo estatístico que representam a máxima concentração de xilose em g/L

	Coeficientes da regressão	Valores codificados	Valores dos termos
Constante	35,192	-	-
A	8,556	1,000	8,556
B	15,638	0,610	9,539
B²	-18,800	0,372	-6,995
AB	8,159	0,610	4,977
Concentração predita	-	-	51,268
-95,% Conf.	-	-	48,565
+95,% Conf.	-	-	53,972
Concentração obtida	-	-	56,522

A: termo linear da temperatura; B: termo linear da concentração da solução ácida; B²: termo quadrático da concentração da solução ácida; AB: termo de interação entre os fatores A e B.

Visando validar o modelo preditivo obtido e verificar a sua predição de 51,27 g/L para extração de xilose pelo processo de hidrólise ácida, realizou-se novos

ensaios de hidrólise nas condições de máximo, onde a temperatura empregada foi de 130 °C e a concentração da solução ácida foi de 2,9% m/v. Os ensaios foram realizados em triplicata e pôde-se obter um hidrolisado hemicelulósico com concentração de xilose igual a 56,522 g/L, correspondendo a um rendimento de extração igual a 85,09% de xilose.

A hidrólise ácida tem sido empregada a diferentes materiais lignocelulósicos visando à extração de açúcares fermentescíveis. A Tabela 5.8 apresenta dados comparativos de hidrólise ácida empregada a diferentes resíduos agroindustriais e o rendimento expresso em concentração de xilose obtida, bem como um resumo dos resultados obtidos neste trabalho para hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar.

Pode-se observar pela Tabela 5.8 que os resultados obtidos neste trabalho se comparam com outros da literatura, empregando-se outros resíduos como farelo de cevada, sabugo e folhas de milho, em que Cruz *et al.* (2000) obtiveram valores em torno de 45 g/L de xilose. Felipe *et al.* (2003) obtiveram 32,33 g/L de xilose em condições semelhantes de hidrólise ácida de casca de aveia.

Tabela 5.8: Condições de hidrólise ácida empregada a diferentes matérias primas para obtenção de hidrolisado lignocelulósico

Matérias primas	[H ₂ SO ₄]	Temp* (°C)	Relação S:L**	Tempo (minutos)	Xilose (g/L)	Referências
Bagaço de cana (bc)	100 mg/g bc	121	1:10	10	15,7	Alves et al., 1998
Farelo de cevada	3% m/v	130	1:8	15	45,4	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	2% m/v	130	1:8	15	42,9	Cruz et al., 2000
Folhas de milho	3% m/v	130	1:16	15	48,1	Cruz et al., 2000
Palha de trigo	1% m/v	140	1:15	20	15,33	Canilha, 2001
Palha de arroz	0,35% m/v	120	-	30	18,33	Mussato e Roberto, 2002
Casca de aveia	0,35% m/v	156	1:4,5	27	32,33	Felipe et al., 2003
<i>Eucalyptus grandis</i>	0,65% m/v	157	1:8,6	20	19,21	Canettieri et al., 2004
Resíduo de cervejaria	140 mg/g	120	1:12	37	15,48	Mussato e Roberto, 2005
Sugar-Maple	2,0% m/v	105	-	20	29,2	Stoutenburg et al., 2008
Palha de cana	2,9% m/v	130	1:4	30	56,5	Presente trabalho

*Temperatura; **Relação sólido:líquido

5.4. Caracterização e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico obtido via hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar

Após a realização da hidrólise ácida nas condições ótimas de temperatura e concentração da solução ácida, o hidrolisado hemicelulósico obtido foi tratado com elevação de pH por CaO e em seguida utilizou-se carvão ativo 3%, conforme descrito no item 4.1.7, para a destoxificação do mesmo. O hidrolisado hemicelulósico foi caracterizado quanto a açúcares e compostos inibidores (Tabela 5.9).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.9 pode-se observar que as condições ótimas de hidrólise ácida permitiram alcançar uma extração de xilose correspondente a uma concentração de 62,52 g/L.

Tabela 5.9: Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar não tratado e tratado

CONCENTRAÇÕES (g/L)						
	GLICOSE	XILOSE	ARABINOSE	HAc	FURF	HMF
HNT	9,50	62,52	9,89	3,19	0,5576	0,1714
HT	8,56	58,70	8,78	3,00	0,0302	0,0021

HAc: ácido acético; FURF: furfural; HMF: hidroximetilfurfural; HNT: hidrolisado não tratado; HT: hidrolisado tratado (tratado com CaO seguido por tratamento com carvão ativo 3% m/v)

Após tratamento empregado para destoxificação do hidrolisado, a concentração de xilose foi determinada como sendo 58,70 g/L, indicando uma perda de 6,11% da massa de xilose.

Em termos de açúcares totais (considerando apenas glicose, xilose e arabinose) no hidrolisado hemicelulósico não tratado, encontrou-se um valor de 81,91 g/L, enquanto que após o tratamento químico a concentração de açúcares totais foi igual a 76,04 g/L, promovendo uma perda igual a 7,17% desses açúcares.

Quanto aos compostos considerados inibidores do processo fermentativo, pode-se verificar na Tabela 5.9 que houve uma redução de 3,19 a 3,00 g/L na concentração de ácido acético, não sendo possível afirmar que houve remoção deste inibidor pelo processo de destoxificação empregado. Os compostos inibidores derivados de furanos têm sido citados como os de maior efeito inibitório e o processo de destoxificação apresentou remoção de grande parte destes, tendo sido a concentração de furfural reduzida em 94,58% (0,0302 g/L) e a de hidroximetilfurfural reduzida em 98,77% (0,0021g/L).

A primeira etapa do processo de destoxificação, com elevação de pH por CaO, provocou a maior perda de açúcares. Devido a precipitações que ocorrem nesta etapa, uma fração dos açúcares é arrastada fisicamente e perdida junto com o precipitado que se forma. Quando se utiliza carvão ativo, uma fração de açúcares também é perdida devido à adsorção na superfície do carvão.

Comparando com dados da literatura, os resultados deste trabalho no processo destoxificação do hidrolisado hemicelulósico se apresentam como satisfatórios. Roberto *et al.* (1991) observaram que concentrações de furfural menores que 0,5 g/L não interferiram no crescimento celular de *P. stipitis*, enquanto que Delgenes *et al.* (1996) verificaram que concentrações de 2 g/L inibiram o

crescimento celular de *P. stipitis* em 99%. Nigam (2001) encontrou que concentrações de 1,5 g/L provocaram diminuição no rendimento e produtividade de etanol iguais a 90,4% e 85,1%, respectivamente.

A toxicidade do hidroximetilfurfural é considerada equivalente à do furfural (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b), entretanto sua concentração em hidrolisado hemicelulósico é menor devido principalmente à sua menor concentração em hemiceluloses. De acordo com Delgenes *et al.* (1996), o crescimento de *P. stipitis* foi reduzido em 43%, 70% e 100% quando a concentração de hidroximetilfurfural no meio de fermentação foi de 0,5, 0,75 e 1,5 g/L, respectivamente.

A toxicidade do ácido acético varia de acordo com as condições de cultivo empregadas na fermentação. Van Zyl *et al.* (1991), usando *P. stipitis* para produzir etanol de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, encontrou que o grau de inibição causado pelo ácido acético depende não apenas de sua concentração, mas também da concentração de oxigênio dissolvido e do pH do meio de fermentação. Em meio com pH igual a 6,5 e concentrações de ácido acético acima de 4 g/L a produção de etanol começou a apresentar diminuição, caindo para 50% quando a concentração de ácido acético foi de 15 g/L. Em meio com pH igual a 5,1 a mesma redução na concentração de etanol foi observada (50%) quando a concentração de ácido acético foi de apenas 1 g/L, e não se observou produção de etanol quando a concentração de ácido acético foi de 10 g/L de hidrolisado. De acordo com Felipe *et al.* (1995), concentrações de ácido acético em torno de 1 g/L melhoraram a bioconversão de xilose em xilitol, mas concentrações acima de 3 g/L causaram inibição ao processo fermentativo.

Dias *et al.* (2009) demonstraram que a influência de mais de 1 componente tóxico presente em hidrolisados hemicelulósicos sobre a fermentação, é maior do que a influência de cada 1 isoladamente, devido a um efeito de sinergia entre eles. Estes autores conduziram ensaios de fermentação por *P. stipitis* em meio sintético (glicose 20 g/L e xilose 15 g/L) e encontraram que a fermentação com suplementação de ácido acético igual a 3 g/L, conduziu a uma velocidade específica máxima de crescimento foi igual a $0,06\text{ h}^{-1}$. Quando o hidrolisado foi suplementado apenas com furfural 2 g/L velocidade específica máxima da fermentação foi igual a $0,11\text{ h}^{-1}$. quando realizou-se a mistura binária de ácido acético com furfural nas

mesmas concentrações (3 g/L e 2 g/L, respectivamente) não houve crescimento celular nem consumo de açúcares.

5.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico obtido de palha de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico obtido de palha de cana (Tabela 5.9, item 5.4) apresentou concentração de ácido acético elevada (3,19 g/L). Após a suplementação nutricional e inoculação da biomassa realizadas para a condução do processo fermentativo do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, verificou-se um valor de pH igual a 5,4 no meio de fermentação. De acordo com Van Zyl *et al.* (1991) em meio com pH igual a 5,1 uma redução de 50% na concentração de etanol foi observada quando a concentração de ácido acético foi de apenas 1 g/L. A baixa fermentabilidade provocada pela influência de componentes tóxicos tem sido verificada por outros autores (ROBERTO *et al.*, 1991; AMARTEY; JEFFRIES, 1996; DÍAS *et al.*, 2009) Desta forma admitiu-se a necessidade de conduzir ensaios fermentativos do hidrolisado já destoxificado.

A fermentação conduzida em frascos Erlenmeyer para avaliação da fermentabilidade e dos efeitos da suplementação nutricional pode ser representada pela Figura 5.3. Comportamento semelhante foi observado quando a levedura *P. stipitis* Y-7124 foi cultivada em hidrolisados hemicelulósicos de outros materiais lignocelulósicos, tais como *water-hyacinth* (NIGAM, 2002), palha de arroz (SILVA, 2007) e madeira *sugar maple* (STOUTENBURG, 2008).

Após 15 horas de fermentação a glicose (Apêndice C, Figura C1) já havia sido consumida em todos os ensaios do delineamento experimental, enquanto que o consumo de xilose prosseguiu do início ao final de 110 horas de processo, tendo sido mais lento quando ainda havia glicose no meio. Gong *et al.* (1999) reportaram a assimilação de glicose preferencialmente em relação a pentoses. O comportamento de leveduras cultivadas em misturas de açúcares, em geral, apresenta uma inibição, ou retardamento, da utilização de xilose pela presença de glicose no meio, observando-se que os açúcares são assimilados sequencialmente sendo a glicose o primeiro a ser consumido (DU PREEZ, 1994; AGBOGBO, 2006).

A concentração celular apresentou uma fase de adaptação ao meio (fase lag) correspondente a 36 horas. Após este intervalo de tempo verificou-se um crescimento exponencial com a concentração celular atingindo níveis de 15 a 22 g/L de células em 60 horas de fermentação (Apêndice c, Figura C). Esse crescimento celular foi correspondente à elevação de pH, de seu valor inicial de 5,4 para 5,9 (Tabela 5.11). A valores de pH próximos ou maiores do que o pKa do ácido acético (pKa igual a 4,8), este é capaz de se difundir através da membrana plasmática por estar na sua forma não dissociada e causar redução do pH intracelular (pH próximo de 7) provocando inibição do metabolismo celular ou morte celular (LAWFORD; ROUSSEAU, 1998). O efeito inibitório do ácido acético sobre a bioconversão de xilose a etanol por *P. stipitis* pode ser potencializado pela presença de outros compostos tóxicos no hidrolisado, tais como furfural e hidroximetilfurfural. (DÍAS *et al.*, 2009).

Após 60 horas a concentração de biomassa celular sofreu redução em alguns ensaios, indicando uma fase de morte celular, provavelmente ocorrida pelo esgotamento da fonte de carbono.

Os teores de arabinose e ácido acético não sofreram redução e observou-se formação de glicerol (Tabela 5.10) como subproduto da fermentação a partir de 60 horas corridas de processo.

A produção de etanol ocorreu em todos os 16 ensaios do delineamento experimental (Figura 5.3b), mesmo sem a adição de nutrientes (ensaio 1, Tabela 5.10). Isto evidencia a potencialidade de utilização do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em processos fermentativos para a obtenção de etanol. A baixa produtividade obtida no ensaio 1 ($Q = 0,11$ g/L.h) indica que haja necessidade de suplementação nutricional ao meio de fermentação a fim de se melhorar o desempenho do processo fermentativo.

Como pode ser verificado nos gráficos de consumo de xilose e produção de etanol (Figuras 5.3a e 5.3b), o ensaio 8 apresentou os melhores resultados, em relação a consumo de xilose e produção de etanol, com 60 horas de fermentação. Após este tempo, a concentração de xilose havia sido consumida em 96% e a concentração de etanol sofreu redução. Esta redução na concentração de etanol pode ser explicada admitindo-se assimilação do mesmo pela levedura numa condição de estresse por escassez da fonte de carbono (Tabela 5.10). Em condições de anaerobiose durante a fermentação (causada pela aceleração do

crescimento celular), se produz glicerol para regenerar o excesso de NADH produzido na biossíntese e manter o balanço redox intracelular (ROSSEL, 2006).

A considerar o desempenho do processo em todos os ensaios, o ensaio 8 apresentou as melhores respostas referentes à conversão de xilose em etanol até 60 horas de fermentação, apresentando um fator de rendimento $Y_{P/S}$ igual a 0,38 g/g, o que corresponde a 74,5% de eficiência de conversão, e produtividade volumétrica em etanol igual a 0,41 g/L.h (Tabela 5.10).

O crescimento celular e a formação de subprodutos são indesejáveis em processos fermentativos, pois reduzem o desempenho do processo no sentido da formação do produto principal. No ensaio 8 (Tabela 5.11), em 60 horas de fermentação observou-se uma elevada concentração celular, igual a 19,4 g/L e formação de glicerol igual a 0,26 g/L (Tabela 5.10). Isto sugere que, embora o ensaio 8 tenha apresentado o melhor resultado de conversão de xilose em etanol para o delineamento experimental conduzido, estudos mais específicos devem ser realizados com o objetivo de promover menor crescimento celular e formação de subprodutos.

Tendo em vista os resultados do ensaio 8 como os melhores dentro da região investigada no delineamento experimental para 60 horas de fermentação (Figura 5.3), escolheu-se este para análise estatística dos resultados.

Figura 5.3: Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana conduzido em frascos Erlenmeyer para avaliação da suplementação nutricional por planejamento experimental central composto 2^3 de face centrada. (a) concentração de xilose, (b) produção de etanol e (c) fermentação na condição do ensaio 8.

Tabela 5.10: Planejamento experimental para avaliação do efeito da suplementação nutricional sobre o fator de rendimento e produtividade volumétrica em etanol na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar (item 4.2.2.2)

	UREIA	MgSO ₄	EXTRATO DE LEVEDURA	GLICOSE (g/L)	XILOSE (g/L)	ARABINOSE (g/L)	ACIDO ACÉTICO (g/L)	GLICEROL (g/L)	ETANOL (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q (g/L.h)
1	-	-	-	0,31	40,92	10,54	-	0,31	5,82	0,22	0,11
2	+	-	-	0,29	32,10	11,95	0,13	0,33	8,76	0,24	0,15
3	-	+	-	0,31	42,72	10,99	-	0,30	5,82	0,28	0,10
4	+	+	-	0,29	36,05	11,74	0,07	0,33	9,20	0,30	0,15
5	-	-	+	0,35	12,88	12,60	0,19	0,31	20,38	0,38	0,34
6	+	-	+	0,32	5,21	10,25	0,09	0,25	21,50	0,36	0,36
7	-	+	+	0,32	17,94	11,88	0,18	0,27	18,81	0,36	0,31
8	+	+	+	0,25	2,37	12,13	0,23	0,26	24,74	0,38	0,41
9	-	0	0	0,28	27,55	11,15	0,20	0,28	12,34	0,34	0,21
10	+	0	0	0,29	12,17	11,48	0,14	0,30	17,50	0,34	0,29
11	0	-	0	0,28	17,86	10,91	0,15	0,28	16,28	0,38	0,27
12	0	+	0	0,29	19,95	11,18	0,20	0,32	16,19	0,35	0,27
13	0	0	-	0,28	37,48	11,03	0,08	0,25	8,82	0,30	0,15
14	0	0	+	0,32	6,63	10,61	0,15	0,27	20,94	0,32	0,35
15	0	0	0	0,29	22,43	11,11	0,15	0,29	15,76	0,35	0,26
16	0	0	0	0,29	17,98	10,58	0,25	0,30	15,04	0,30	0,25

Tempo de fermentação considerado de 60 horas; fermentação em frascos Erlenmeyer

Em análise da Tabela 5.10, verifica-se que os maiores resultados em rendimento e produtividade em etanol foram obtidos quando o meio suplementado continha extrato de levedura em seu nível superior (5 g/L) e que os menores resultados foram obtidos quando da ausência deste suplemento no meio de fermentação (ensaios 1 a 4). Isto indica que o extrato de levedura exerce maior efeito sobre os parâmetros da fermentação, provavelmente por este ser fonte de aminoácidos essenciais, proteínas responsáveis pelo crescimento celular e vitaminas do complexo B (BATISTA *et al*, 2003).

Tabela 5.11. Resultados da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana conduzidos em frascos Erlenmeyer referentes ao ensaio 8

TEMPO (h)	GLICOSE (g/L)	XILOSE (g/L)	CÉLULAS (g/L)	ETANOL (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{X/P}$ (g/g)	Q (g/L.h)	pH
0	7,86	59,15	1,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,40
15	0,40	50,68	3,38	6,27	0,39	0,11	0,28	0,42	5,43
36	0,35	38,68	3,20	11,80	0,42	0,06	0,13	0,33	5,91
60	0,25	2,37	19,38	24,74	0,38	0,28	0,72	0,41	6,59
84	0,23	0,35	17,57	20,66	0,31	0,24	0,77	0,25	7,23
110	0,22	0,24	15,37	9,23	0,14	0,21	1,49	0,08	7,65

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de substrato (glicose e xilose) em etanol; $Y_{X/S}$: fator de rendimento de substrato em massa celular; $Y_{X/P}$: fator de rendimento de células em relação a etanol formado; Q: produtividade volumétrica em etanol

De acordo com a análise estatística realizada para estimativa dos efeitos dos fatores nutricionais sobre a fermentação alcoólica (Tabela 5.12a), o fator de rendimento $Y_{P/S}$ sofreu influência significativa apenas do termo linear da concentração de extrato de levedura. Quando se analisou a resposta produtividade Q (Tabela 5.12b), encontrou-se significância para os fatores concentração de extrato de levedura (A) e de ureia (C), indicando não ser necessária a adição do suplemento $MgSO_4$ (B).

Tabela 5.12: Estimativa dos efeitos dos fatores da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a fermentação alcoólica, teste t de student e nível de significância para cada fator considerando as respostas fator de rendimento $Y_{P/S}$ (a) e produtividade volumétrica Q (b) em etanol referentes ao ensaio 8.

(a)

FATORES	EFEITOS	ERRO PADRÃO	t (6)	p
Mean/Interc	0,3382	0,0158	21,4473	0,0000
A	0,0905	0,0211	4,2978	0,0051
A ²	-0,0733	0,0410	-1,7868	0,1242
B	0,0198	0,0211	0,9399	0,3836
B ²	0,0373	0,0410	0,9086	0,3986
C	0,0108	0,0211	0,5138	0,6257
C ²	-0,0077	0,0410	-0,1885	0,8567
AB	-0,0258	0,0236	-1,0959	0,3151
AC	-0,0093	0,0236	-0,3949	0,7066
BC	0,0135	0,0236	0,5713	0,5885

R²: 0,81; R² ajustado: 0,52; nível de significância a 95% de confiança (p < 0,05); A: extrato de levedura; B: MgSO₄; C: ureia.

(b)

FATORES	EFEITOS	ERRO PADRÃO	t (6)	p
Mean/Interc	0,2603	0,0072	35,9336	0,0000
A	0,2248	0,0097	23,2263	0,0000
A ²	-0,0283	0,0188	-1,4995	0,1844
B	0,0050	0,0097	0,5141	0,6256
B ²	0,0169	0,0188	0,8988	0,4034
C	0,0600	0,0097	6,2031	0,0008
C ²	-0,0269	0,0188	-1,4270	0,2035
AB	0,0073	0,0108	0,6769	0,5237
AC	0,0052	0,0108	0,4820	0,6469
BC	0,0240	0,0108	2,2227	0,0679

R²: 0,99; R² ajustado: 0,97; nível de significância a 95% de confiança (p < 0,05); A: extrato de levedura; B: MgSO₄; C: ureia.

O gráfico dos resíduos padronizados em função das corridas (Figura 5.4) apresenta uma distribuição aleatória dos resultados dos ensaios. Isto sugere que aparentemente não houve problemas na condução dos ensaios experimentais, visto que não há qualquer tendência na distribuição dos resultados.

Figura 5.4: Resíduos padronizados em função dos ensaios realizados

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, considera-se que a palha de cana-de-açúcar seja uma matéria prima promissora para a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico, o qual pode ser utilizado visando-se à produção biotecnológica de diferentes produtos industriais, como o bioetanol.

A fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar representou 30,79 % do material seco. A hidrólise ácida deste resíduo permitiu a obtenção de um hidrolisado com concentração de até 56,5 g/L de xilose a partir da extração de 85,1% d xilose.

Com relação aos parâmetros com significância estatística no processo de hidrólise ácida para extração de xilose da palha de cana-de-açúcar, encontrou-se significância para a temperatura e a concentração da solução ácida, enquanto que o tempo e a relação sólido:líquido não foram significativos. As condições de ótimo para a realização da hidrólise ácida foram 130 °C e a solução de ácido sulfúrico em 2,9% m/v, empregadas com uma relação sólido:líquido igual a 1:4 (g/mL) por 30 minutos de reação.

O processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico foi eficiente para remoção dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural mas não para a remoção de ácido acético. O processo de destoxificação conduziu ainda à perda de 7,9% dos açúcares presentes no hidrolisado.

A produção de etanol ocorreu em todos os ensaios do delineamento experimental realizado para fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana pela levedura *P. stipitis* Y-7124, mesmo sem a adição de nutrientes. Isto evidencia a potencialidade de utilização deste resíduo para a obtenção de etanol.

A análise estatística realizada para avaliação da suplementação nutricional demonstrou que os ensaios de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana para conversão de xilose em bioetanol podem ser conduzidos apenas com a adição dos suplementos ureia (5 g/L) e extrato de levedura (5 g/L), permitindo verificar que o fator de rendimento de xilose em etanol sofreu influência apenas do extrato de levedura suplementado, enquanto que a produtividade volumétrica em etanol sofreu influência ainda da concentração de ureia no meio.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Pesquisa e desenvolvimento para ampliação de escala do processo de hidrólise ácida da palha de cana-de-açúcar e recuperação do hidrolisado hemicelulósico.
- ✓ Maior análise exploratória da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha para fermentação, considerando outros nutrientes e outros fatores, como pH, agitação e aeração e condução de ensaios fermentativos em biorreator.
- ✓ Análise de viabilidade econômica da obtenção de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana visando à utilização deste em processos biotecnológicos.
- ✓ Alternativas para o aproveitamento integral da palha de cana.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR JR, W. B.; FARIA, L. F. F.; COUTO, M. A. P. G.; ARAUJO, O. Q. F.; PEREIRA JR, N. P. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.49-59, 2002.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.5, n.4, p.309-318, 2002.
- ALVES, L. A. **Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 1997. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - FAENQUIL, Lorena – SP – Brasil. 1997.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. E. S.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-98, 1998.
- AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.
- ANFAVEA. **Anuário da indústria automobilística brasileira**. Disponível em: <http://www.anfavea.com.br/anuario.html> . Acesso: 06 de setembro de 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S; BRUNS, R.E. In: **Como fazer experimentos**: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BATISTA, F. R. X.; PEREIRA, C. A; MENDONÇA, R. Z.; MORAES, A. M. Avaliação de Suplementos na formulação de meios de cultura para células de inseto Visando a Substituição do Soro Fetal Bovino, In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, v. 1, p.1-7, 2003.
- BERTELLI, L. G. **A verdadeira história do PROÁLCOOL**. *JORNAL CANA*. NOV. 2005. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/pdf/143/%5Cmerccot.pdf>. Acesso: 06 de setembro de 2009.
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrats, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90 – 103, 1981.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano nacional de agroenergia**: 2006 – 2011. Brasília DF, 2005. Disponível em: www21.sede.embrapa.br. Acesso: 15 ago. 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Balanco de energia na produção de cana-de-açúcar e álcool nas usinas cooperadas** – apêndice I: área agrícola, In: CONVENÇÃO SOBRE MUDANÇA DO CLIMA. Distrito Federal, 1996. Disponível em: <http://www.mct.gov.br>. Acesso: 3 fev. 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira**; exercício de 2007. Outubro de 2008.

CALDAS, A.; MELO, N. A. C.; JOHN, V. M.; PIRES SOBRINHO, C. W. A. Tecnologias alternativas para habitação: o uso de cinzas residuais para produção de novos materiais e componentes construtivos. In: IV CONGRESSO INTERNACIONAL DE GESTÃO DA QUALIDADE NA CONSTRUÇÃO CIVIL. GEQUACIL/POLI. Recife, PE, 2000

CÂNDIDO, E. J.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A. Determinação da composição química da palha de trigo. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 7, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM. p.108, 2002.

CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A. E.; CARVALHO JR, J. A. Tratamento químico de resíduos de *Eucalyptus grandis* com ácido diluído. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003.

CANETTIERI EV, ALMEIDA E SILVA J.B., CARVALHO JR, J.A. Hidrolisis acida de biomasa: optimizacion de la extraccion de xilosa a partir de residuos de *Eucalyptus grandis*. CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZUCAR Y DERIVADOS DE LA CANA - DIVERSIFICACION 2004.

CARAMEZ, M. **Produção de endoxilanases termoestáveis por *Termomyces lanuginosus* IOC-4145 em meio semi-sólido.** 1999. Dissertação (Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - EQ – UFRJ, Rio de Janeiro, 1999.

COSTA, S. M. **Caracterização de polpas químicas obtidas de um pré- tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar em biorreatores de 20 L.** 198 f. 2005. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - EEL-USP, Lorena – São Paulo, 2005.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food biotechnology**, v.14, p.79-97, 2000.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico.** 2006. Tese (Doutorado em biotecnologia industrial) - EEL – USP, Lorena, SP. 2006.

DELGENES, J., MOLETTA, R., NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.19, 220– 225. 1996.

DELGENES, J. P.; MOLLETA, R.; NAVARRO, J. M. Continuous production of ethanol from a glucose, xilose and arabinose mixture by a flocculant strain of *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n.10, p. 752-730. 1988.

DUARTE, C. H.: **Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com ácido clorídrico concentrado.** 1989. Tese (Doutorado) - Departamento de Química - UNICAMP 1989.

DUNNING, J.W.; DALLAS, D. E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analitical Chemistry**. v.21, n.6, p. 727-729, 1949.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-Xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. v.16, 944-956. 1994.

DU PREEZ J.C.; VAN DRIESSEL B.; PRIOR B.A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 30 p. 53-58. 1989.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 25. p. 521-525, 1987.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 8, p. 360-364, 1986.

FAULDS, C. B.; KROON, PAUL A. BARTOLOMÉ B.; WILLIAMSON G. Hydrolysis of Hemicelluloses Using Combinations of Xylanases and Feruloyl Esterases. **Methods in Biotechnology: Carbohydrate Biotechnology Protocols**. HUMANA PRESS v. 10, p. 183-189, 1999.

FELIPE, M.G.A., VEIRA, M.V., VITOLO, M., MANCILHA, I.M., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**. V. 35, 171–177. 1995.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V; CÂNDIDO, E. J; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2003. CDROM.

FENGEL, D.; WEGENER, G.. **Wood Chemistry, Ultra structure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FREUDENBERG, K., NEISH, A.C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin : Springer-Verlag, 1968. 129p.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production; **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** Series Editor: T. Scheper; p. 41-67, 2007.

MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D. J.; WEYERS, D. B.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 1 – 20, 2006.

GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton: CRC press, 1981. 309p.

GONG, C.S.; · CAO, N.J. · J. DU · G.T. TSAO; Ethanol Production from Renewable Resources; **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 207-241, 1999.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, *in press*. publicado na web em 3/7/09.

HERRERA, A., TÉLLEZ-LUIST, S.J., RAMÍREZ, J.A., VÁSQUES, M. Production of Xylose from Sorghum Straw Using Hydrochloric Acid. **Journal of Cereal Science**, v. 510, p. 01-08, 2002.

HERRERA, A.; SIMÓN, J. T. L.; CABRIALES, J. J. G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v.63, n.1, p.103-109, 2004.

ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; TANTIMONGCOLWAT, T.; KONGPANPEE, T.; PRABKATE, P.; PRACHAYASITTIKUL, V. Appropriate Technology for the Bioconversion of *Water Hyacinth* (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. **EXCLI Journal**, v. 6, p. 167-176, 2007.

JENNINGS, D. H. Inorganic Nutrition. In: **PHYSIOLOGY OF INDUSTRIAL FUNGI**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988.

Klock, U. MADEIRA : UM MATERIAL HETEROGÊNEO. Disponível em: www.madeira.ufpr.br/.../quimicadamadeira/ultraestruturaParedecelular.ppt. Acesso: 17 de novembro, 2009.

KRISHNAN, M. S.; HO NWY, TSAO, G. T. Fermentation kinetics of ethanol production from glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* 1400(pLNH33). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 78, n. 1-3, 1999.

KUMAR, A.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of *water-hyacinth* (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.100, p. 3293–3297, 2009

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Currente and future prospects. **Critical reviews in biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

LAPLACE, J. M.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. **Biotechnology Letters**. v.13, p. 445-450, 1991.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JÉONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 77– 79, p. 91–103, 1999.

LEMOS J. L. S. **Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana**. 2001. Tese (Doutorado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - EQ – UFRJ, RJ, 2001.

MACEDO, I. C. Gerando energia elétrica com biomassa da cana: início de um ciclo virtuoso. In: SEMINÁRIO DE GERAÇÃO DISTRIBUÍDA INEE, RJ 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. & PARKER, J. BROCK. **Biology of Microorganisms**. 9th ed. Prentice-Hall, Inc. 2000.

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

MEYRIAL V.; DELGENES J.P.; ROMIEU C.; MOLLETA R.; GOUNOT A.M. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown D-xylose or D-glucose. **Enzyme Microbiology Technology**, v.17, p. 535–540, 1995.

MICHELAZZO, M. B., BRAUNBECK O. A. Tráfego controlado na mecanização da cana-de-açúcar. In: WORKSHOP INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA & TECNOLOGIA E SUSTENTABILIDADE, 2008.

MOLINA Jr, W. F. **Enfardamento de Resíduo de Colheita de Cana-de-açúcar (*Saccharum spp*): Avaliação dos Desempenhos Operacional e Econômico**. 1991. Tese (Mestrado) - ESALQ, Piracicaba - USP, São Paulo, 1991.

MORAES, M. A. F. D. **A Desregulamentação do Setor Sucroalcooleiro Brasileiro**. 1999. 291 f. Tese (Doutorado em Ciências), Economia Aplicada – Esalq, Piracicaba, São Paulo, 1999.

MORRISON, R. T.; BOYD R. N. **Química Orgânica** 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96. p. 673-686, 2005.

MUSSATO, S I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.28, p.34-39, 2002.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnology Progress**, v.20, p.134-139, 2004.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xilitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2453 - 2460, 2005.

NETAFIM. **Cana-de-açúcar**. Disponível em <http://ethanolicrop.com/> Acesso: 06 de setembro de 2009.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.49-58, 2002.

NIGAM, J. N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicelluloses acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose fermenting yeast. **Journal of biotechnology**, v. 97, p. 107 - 116, 2002.

NIGAM, J. N. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis* **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 26, n. 3, p.145 – 50, 2001.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17–27. 2001.

NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and Screening of Yeasts That Ferment D-Xylose Directly to Ethanol **Applied Environmental Microbiology**, v. 50(6), p. 1486-1489 1985.

Observatório do Setor Sucroalcooleiro. Disponível em <http://www.observatoriodacana.org/node/258>
Acesso: 22/07/2008.

OHTA, K.; ALTERTHUM, F.; INGRAM, L. O. Effects of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Envir. Microbiol.**, v. 56, p. 463, 1990.

OHTA, K.; BEALL, D. S.; MEJIA, J. P.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2810, 1991.

OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; SCHUWAN, R. F. Produção de enzimas hidrolíticas extracelulares por *Fusarium* em sistema de batelada simples. **Revista Interação**, n.2, 2000. Disponível em:<<http://interacao.unis.edu.br/n2/art2.htm>>. Acesso: 14 out. 2003.

OLIVERIO, J. L. A indústria brasileira das produtoras de biocombustíveis. In: EXPO CENTER NORTE, SP. 2004.

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

PADUKONE, N.; EVANS, K. W.; MCMILLAN, J. D.; WYMAN, C. E. Characterization of recombinant *E. coli* ATCC11303 (pLOI297) in the conversion of cellulose to ethanol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 850, 1995.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000b.

PALNITKAR, S. AND A. LACHKE. Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Canadian Journal of Microbiology**. 38:258-260. 1992

PAN, X.J., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K., XIAO, Z.Z., ZHANG, X., SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnol. Bioeng.** v. 90. p. 473–481. 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v.65, p.203-212, 1998.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química – UFRJ. **Séries em Biotecnologia**, v. 1. 2008.

PESSOA JR, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid Hydrolysis of Hemicellulose from Sugarcane Bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 291-297, 1997.

RIPOLI, M. L. C. **Mapeamento do palhiço enfardado de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e do seu potencial energético**. 2002. 91f. Tese (Mestrado em agronomia). Faculdade de agronomia, Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

RIZZI, M.; KLEIN, C.; SCHULTZE, C.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Xylose Fermentation by Yeasts. Use of ATP balances for modeling oxygen limited growth and fermentation with the yeast *Pichia stipitis* with xilose as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 509 – 514. 1989.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Influence of kLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Engineering, Knowle**, n.21, p.505- 508, 1999.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; SATO, S.; SILVA, S. S. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. **Bioresource Technology**, n.51, p.255-257, 1995.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**. v. 26, n. 1, p. 15-21. 1991.

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. Tese (Doutorado em biotecnologia industrial), Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, Brasil. 2000.

RHODES, A. & FLETCHER, D. L. **Principles of Industrial Microbiology**. Oxford: Pergamon Press, 1963.

ROEHR M. **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. Weinheim WILEY-VCH, 2001.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.; AZEVEDO, J. L.. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: editora Manoli Ltda. 1988. 186 p.

SANTOS, M. H. C. **Política e Políticas de uma energia alternativa: o caso do Proálcool**, RJ ed. Notrya, 1993.

SCHNEIDER, H. Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, p. 1 – 40. 1989.

SENE, L.; CONVERTI, A.; ZILLI, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 738–743, 2001.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007.144f. Dissertação (mestrado em biotecnologia industrial) - EEL – USP Lorena, SP 2007.

SLININGER PJ, BRANSTRATOR LE, BOTHAST RJ, OKOS WR, LADISCH MR. Growth, death, and oxygen uptake kinetics of *Pichia stipitis* on xylose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 37, p. 973-980, 1991.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 35, n.7, p. 727 - 731. 1990.

SOUZA, O.; SANTOS, I. E. Importância dos resíduos agropecuários na alimentação animal. **Boletim pecuário**. 2002. Disponível em: <<http://www.boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php?arquivo=artigo544.txt>>. Acesso: 11 out. 2003.

SOUZA, R. R. **Panorama, oportunidades e desafios para o mercado mundial de álcool automotivo**. 2006. Dissertação (Mestrado Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos) – Escola de Química, UFRJ, R. J. 2006.

STOUTENBURG, M. R.; PERROTTA, J. A.; AMIDON, T. E.; NAKAS J. P. Ethanol production from a membrane purified hemicelulosic hydrolysate derived from sugar maple by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Bioresources**, v. 3, n.4, p. 1349 – 1358. 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1 - 11, 2002.

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

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

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. In: **Seminário de Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 83, p. 364-370. 1997.

TENGBORG, C.; STENBERG, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G.; LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 70/72, n.3, 1998.

THROOP D.; KLINGNER R. E. In: SYMPOSIUM ON MASONRY: OPPORTUNITIES FOR THE 21TH CENTURY. 2002

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. **Applied Environmental Microbiology** p. 47. p. 1221-1223. 1984.

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em <http://www.unica.com.br/noticias/Default.asp?sqlPage=40> Acesso: 10 de maio, 2009.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 13, p. 82–86, 1991.

VAN ZYL, W. H.; LYND, L. R.; DEN HAAN, R.; MCBRIDE J. E. Consolidated Bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*; **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** Series Editor: T. Scheper; p. 41-67, 2007.

VILLA, P.; FELIPE, M. G. A.; RODRIGUEZ, R. C. L.; VITOLO, M.; LUIS DOS REIS, E.; SILVA, S. S.; NAPOLES, A. I.; MANCILHA, I. M. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: ESBES-2 EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2. Porto-Portugal, 1998.

WEIL, J.; WESTGATE, P.; KOHLMANN, K.; LADISCH, M. R. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p.1002, 1994.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **App. Microb. Biotechnology**, v. 56, p. 17 – 34, 2001.

ZHANG, M.; EDDY, C.; DEANDA, K.; FINKELSTEIN, M.; PICATAGGIO, S. **Science**, v. 267, p.240, 1995.

ZHANG, M.; FRANDEN, M. A.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J.; FINKELSTEN, M.; PICATAGGIO, S. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 51/52, p. 527, 1995.

APÊNDICES

Apêndice A. Características do etanol para comercialização

Tabela A: Características do álcool etílico de acordo com o Regulamento Técnico Nº 03/91, aprovado pela Portaria nº 23, de 29.10.91, do DNC

CARACTERÍSTICAS		UNIDADES	ANIDRO	HIDRATADO
Acidez total (em ácido acético)		mg/L	30 máx	30 máx.
Aparência		-	Límpido e isento de material em suspensão	
Condutividade elétrica		us/m	500 máx.	500 máx.
Íons	Cloreto (Cl ⁻)	mg/Kg	-	1 máx.
	Sulfato(SO ₄ ⁻)	mg/Kg	-	4 máx.
Massa específica a 20°C		Kg/m ³	791,5 máx.	809,3 ± 1,7
Material não volátil a 105°C		mg/L	30 máx.	30 máx.
Metais	Cobre (Cu)	mg/Kg	0,07 máx.	-
	Ferro (Fe)	mg/Kg	-	5 máx.
	Sódio (Na)	mg/Kg	-	2 máx.
Potencial hidrogeniônico		pH	-	7,0 ± 1
Teor alcoólico		°INPM	99,3 mín.	93,2 ± 0,6

Apêndice B. Curvas de calibração de compostos inibidores e de concentração celular da levedura *Pichia stipitis* utilizada nas etapas de fermentação

B1. Curvas de calibração para inibidores

5-hidroxiacetilfurfural: $y = 1,56 \cdot X \cdot 10^8 + 6,27 \cdot 10^2$

furfural: $y = 2,14 \cdot X \cdot 10^8 + 5,44 \cdot 10^2$

B2. Curva de calibração de para crescimento celular

Apêndice C. Resultados da fermentação em frascos Erlenmeyer

Figura C1. Perfil do consumo de glicose durante os ensaios fermentativos do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana referentes ao planejamento experimental composto central 2^3 de face centrada conduzidos em frascos Erlenmeyer.

Figura C2. Perfil do crescimento celular durante os ensaios fermentativos do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana referentes ao planejamento experimental composto central 2^3 de face centrada conduzidos em frascos Erlenmeyer.