**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Escola de Engenharia de Lorena

LUMA CLAUDIO DA SILVA RODRIGUES SOARES

# Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos

Lorena - SP
2012

LUMA CLAUDIO DA SILVA RODRIGUES SOARES

# Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos

Dissertação apresentado 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. Sílvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Julho, 2012

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.

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Soares, Luma Claudio da Silva Rodrigues
Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos / Luma Claudio da Silva Rodrigues Soares. – 2012. –ed. reimpr., corr.– 2012.

112 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Destoxificação biológica 3. Hidrolisado hemicelulósico. I. Título

664.113 - CDU

*Dedico essa dissertação aos meus pais*
*que sempre me conduziram pelo caminho*
*do bem e me deram todo suporte  e carinho*
*para o meu crescimento profissional.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por nunca me deixar desistir dos meus objetivos quando o desanimo me tomava e, principalmente pelo maravilhoso dom da vida a mim concedido.

Aos meus pais, Deborah e Epaminondas, e à minha irmã, Aline, que sempre me apoiaram e que diariamente enchem a minha vida de amor, carinho, companheirismo e felicidade.

Ao meu querido Luis Henrique, que teve muita paciência e carinho comigo ao longo desses dois anos de trabalho.

À minha família e amigos que, de forma geral, me fizeram/fazem a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva que me acolheu como aluna, me concedeu um projeto acreditando em meu potencial como pesquisadora e por fazer de tudo que estava ao seu alcance para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte do meu trabalho e por me coorientar de forma incisiva.

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva por me auxiliar na análise estatística do meu trabalho, sempre tão gentil.

A todo corpo docente do Departamento de Biotecnologia, em especial a Dra. Rita, ao Dr. Walter e a Dra. Maria das Graças muito obrigada pela atenção e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, em especial a Danielle, Samira, Kelly, Eduardo, Bruna, Sabrina, Rafael, Bruno, Thais e Raquel que estiveram presentes em cada etapa do meu trabalho, me ajudando e fazendo com que meus dias de trabalho fossem os mais produtivos.

Aos meus amigos da UNESP - Rio Claro, em especial a Weilan, Sadala, Ifê, Dirce, Silvio, Amanda, Paula, Ita, Virgínia, Carol e Pedro que me acolheram com muito carinho e me proporcionaram momentos únicos.

Aos funcionários da USP, em especial a Nadir, Isnaldi, Sandra, Ana Beatriz, André, Paulo, Nicamor, Regina, Dora e Joel, sem vocês, com certeza, meu trabalho não teria sido executado com êxito.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES pela bolsa concedida durante os anos de curso.

# RESUMO

Soares, L. C. S. R**. Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos.** 2012. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Durante a etapa de pré-tratamento ácido, necessária para o rompimento da matriz lignocelulósica e liberação de açúcares, diversos compostos tóxicos são formados e liberados no hidrolisado hemicelulósico. Estes compostos afetam negativamente o processo de fermentação, sendo necessária uma etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico. Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um método de destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico. Com este propósito foram selecionadas leveduras, em meio de cultura sintético, capazes de utilizar furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído como fontes de carbono e energia. As leveduras *Issatchenkia occidentalis* M1 e *Issatchenkia occidentalis* Y1'a foram as que demonstraram os melhores resultados de remoção destes compostos em meio de cultura sintético e consequentemente foram as selecionadas para os experimentos que foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado. Em um segundo momento, foi verificado a eficiência na destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico para futuras aplicações em processos fermentativos de produção de etanol. Para cada levedura selecionada foi realizado um planejamento fatorial completo $2^2$, com três repetições no ponto central. As variáveis, pH (4,0 ou 5,0) e agitação do sistema (100 rpm ou 300 rpm), foram avaliados e como variável resposta foi considerada a porcentagem da remoção de HMF, furfural, ácido acético e fenóis do hidrolisado hemicelulósico após 96 horas de tratamento biológico. A partir dos resultados obtidos constatou-se que para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 o experimento 4 (pH 5,0 e 300 rpm) foi o que possibilitou uma remoção mais eficiente de cerca de 42,89% dos compostos tóxicos totais, sendo 94,77% de HMF 99,19% de furfural, 29,17% de fenóis e 100% de ácido acético. Para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a o experimento 3 (pH 4,0 e 300rpm) foi o que permitiu uma remoção mais significatica de cerca de 46,04% dos compostos tóxicos totais, sendo 97,68% de HMF, 96,06% de furfural, 27,15% de fenóis e 100% de ácido acético. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial das leveduras *Issatchenkia occidentalis* M1 e *Issatchenkia occidentalis* Y1'a no tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico para a remoção de compostos tóxicos liberados pela etapa de pré-tratamento ácido.

**Palavras-chave:** Bagaço de cana-de-açúcar. Destoxificação biológica. Hidrolisado hemicelulósico.

## ABSTRACT

Soares, L. C. S. R. **Biological detoxification of the hemicellulosic hydrolyzates of sugarcane bagasse for using in fermentative processes.** 2012. 112p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

During the acid pretreatment step, required for the disruption of the lignocelluloses matrix and sugars release, several toxic compounds are produced and released in the hemicellulosic hydrolyzates. These compounds negatively affects the fermentation process, being necessary an additional step for detoxification of the hemicellulosic hydrolysates. The present work aimed to contribute for the development of a biological detoxification method of the hemicellulosic hydrolysates. For this purpose yeasts were selected, in synthetic culture medium, capable to metabolize furfural, 5- hydroxymethylfurfural (HMF), acetic acid, ferulic acid and syringaldehyde as carbon and energy sources. The yeasts *Issatchenkia occidentalis* M1 and *Issatchenkia occidentalis* Y1'a demonstrated the best results to remove these compounds present in medium and they were selected to the experiments that had been carried through in concentrated sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzates. In a second moment, the efficiency of the biological detoxification of the hemicellulosic hydrolyzates was verified for future applications in fermentative processes for ethanol production. For each selected yeast, a $2^2$ full factorial design was carried out. The variables, pH (4.0 or 5.0) and agitation rate (100 rpm or 300 rpm), had been evaluated and as response variable was considered the percentage of HMF, furfural, acetic acid and phenols removed from hemicellulosic hydrolyzates after 96 hours of biological treatment. According with the results, was evidenced that *Issatchenkia occidentalis* M1 strain, in the experiment conditions 4 (pH 5.0 and 300 rpm), was more efficient removals (about 42.89% of total toxic composites), being 94.77% of HMF, 99.19% of furfural, 29.17% of phenols and 100% of acetic acid. For the *Issatchenkia occidentalis* Y1'a strain, in the experiment conditions 3 (pH 4.0 and 300 rpm) was observed significant removal (about 46.04% of total toxic composites), being 97.68% of HMF, 96.06% of furfural, 27.15% of phenols and 100% of acetic acid. The results demonstrate the potential of the yeasts *Issatchenkia occidentalis* M1 and *Issatchenkia occidentalis* Y1'a in the biological detoxification of the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzates for removing the toxic compounds released during the acid pretreatment step.



**Key-words:** Sugarcane bagasse. Biological detoxification. Hemicellulosic hydrolyzates.

## LISTA DE SIGLAS

| | |
|---|---|
| **ADH** | Álcool desidrogenase |
| **ALDH** | Aldeído desidrogenase |
| **ATP** | Adenosina trifosfato |
| **$CO_2$** | Dióxido de carbono |
| **CoA** | Coenzima A |
| **CONAB** | Companhia Nacional de Abastecimento |
| **ED** | Via *Entner-Doudoroff* |
| **EMP** | Via *Embden-Meyerhof-Parnas* |
| **$FADH_2$** | Flavina Adenina Dinucleotídeo |
| **HMF** | 5-Hidroxi-metil-furfural |
| **$NAD^+$** | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| **NADH** | Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida |
| **$NADP^+$** | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| **NADPH** | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida |
| **$O_2$** | Oxigênio |
| **PDH** | Piruvato desidrogenase |
| **PPP** | Via das pentoses fosfato |
| **YNB** | *Yeast Nitrogen Base* |
| **YPD** | *Yeast Peptone Dextrose* |

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **15**
**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... **17**
2.1 Os materiais lignocelulósicos e o bioetanol ..... 17
2.2 Composição da biomassa vegetal ..... 18
2.2.1 Celulose ..... 19
2.2.2 Hemicelulose ..... 20
2.2.3 Lignina ..... 21
2.2.4 Extrativos e não-extrativos ..... 22
2.3 O bagaço de cana-de-açúcar ..... 23
2.4 Algumas considerações sobre a conversão de materiais lignocelulósicos a etanol ..... 24
2.4.1 Pré-tratamento ..... 24
2.4.2 Hidrólise enzimática ..... 26
2.4.3 Fermentação etanólica ..... 26
2.5 Efeitos dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos ..... 29
2.5.1 Formação e liberação dos compostos tóxicos ..... 31
2.5.2 Efeito dos derivados de furano ..... 32
2.5.3 Os ácidos alifáticos ..... 37
2.5.4 Os compostos fenólicos ..... 38
2.6 Métodos de destoxificação do hidrolisado lignocelulósico ..... 41
2.7 Destoxificação biológica ..... 44
**3. OBJETIVOS** ..... **47**
3.1 Geral ..... 47
3.2 Específicos ..... 47
**4. MATERIAL E MÉTODOS** ..... **48**
4.1 Seleção de estirpes de leveduras ..... 48
4.1.1 Teste de diluição em Agar ..... 48
4.1.1.1 Preparo de diluições para placas de Agar ..... 49
4.1.1.2 Placas de controle ..... 50
4.1.1.3 Preparo do Repique ..... 50
4.1.1.4 Diluição da suspensão de inóculo ..... 51
4.1.1.5 Inoculação em Placas de Agar ..... 51

4.2 Obtenção e concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar ..... 52
4.2.1 Pré-tratamento ácido .....52
4.2.2 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar .....52
4.3 Processo de destoxificação biológica..... 53
4.3.1 Preparo do repique e do inóculo .....53
4.4 Testes com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar ..... 54
4.5 Efeito do pH e da agitação na destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico pelas leveduras selecionadas..... 54
4.6 Métodos Analíticos ..... 55
4.6.1 Determinação de pH.....55
4.6.2 Determinação do teor de umidade .....55
4.6.3 Determinação da concentração celular .....56
4.6.4 Determinação dos teores de açúcares, HMF, furfural e ácido acético. .....56
4.6.5 Determinação da percentagem de redução na concentração de HMF, furfural, ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído e consumo de açúcares. .....56
4.6.6 Determinação das concentrações dos produtos da decomposição da lignina. .....57
4.6.7 Análise estatística.....57
**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....58**
5.2. Seleção de leveduras que consumiram diferentes fontes de carbono ..... 58
5.3 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar..... 62
5.4 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após etapa de pré-tratamento ácido e submetido ao processo de concentração a vácuo. ..... 63
5.5 Teste de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de- açúcar.66
5.5.1 Remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico utilizando planejamento fatorial completo $2^2$ com três repetições no ponto central. .....66
5.5.2 Remoção de derivados de furano presentes no hidrolisado hemicelulósico após processo de destoxificação biológica pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a. .....73
5.5.3 Remoção de ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a. .....76
5.6 Concentração celular dos experimentos realizados empregando as estirpes de Issatchenkia occidentalis M1 e Y1'a. ..... 78
5.7 Variação de pH nos experimentos realizados empregando as estirpes de Issatchenkia occidentalis M1 e Y1'a. ..... 81

5.8 Consumo de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico após o processo de destoxificação biológica pelas estirpes de Issatchenkia occidentalis M1 e Y1'a. .....83
5.9 Análise estatística dos dados a partir da matriz de planejamento fatorial $2^2$ com três repetições no ponto central. .....88
**6. CONCLUSÕES.....93**
**SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....96**
**REFERÊNCIAS.....96**
**APÊNDICES.....107**

# 1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é proveniente de resíduos agroflorestais, gramíneas e madeira e pode ser utilizada em processos biotecnológicos para obtenção de bioprodutos. Os materiais lignocelulósicos são compostos, principalmente por celulose e hemicelulose, que correspondem a polímeros de carboidratos; e por uma macromolécula aromática, a lignina. Essas três frações encontram-se intimamente associadas dando origem a uma estrutura recalcitrante. Essa biomassa vegetal é fonte abundante e renovável de açúcares que podem ser utilizados para produção de etanol por via fermentativa, o denominado etanol de segunda geração.

Para obtenção do etanol de segunda geração são necessárias, basicamente quatro etapas que correspondem ao pré-tratamento (rompimento da matriz lignocelulósica e liberação das três principais frações que a compõem); hidrólise enzimática (despolimerização da celulose em glicose por meio de enzimas celulolíticas); fermentação (conversão dos carboidratos em etanol); e a destilação, retificação e desidratação (separação e purificação do etanol).

Dentre as etapas empregadas, a etapa de pré-tratamento que utiliza ácido diluído, como o ácido sulfúrico, a altas temperaturas é uma das mais significativas uma vez que pode levar a formação e liberação de uma série de compostos tóxicos à etapa de fermentação em função das condições operacionais empregadas. Estes compostos são divididos em três principais grupos baseados em sua origem, nos quais incluem os ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), os derivados de furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e os compostos fenólicos.

Os compostos tóxicos podem estar presentes em um único hidrolisado dependendo da origem das matérias-primas e das condições de hidrólise. Além disso, estes são tóxicos para as enzimas hidrolíticas e afetam negativamente o desempenho dos micro-organismos no processo de fermentação.

Vários métodos de destoxificação têm sido empregados para remover e/ou reduzir as concentrações dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, tendo como objetivo a superação dos efeitos negativos sob a fermentação. O método de destoxificação biológica é um procedimento totalmente inovador e ecologicamente correto, baseado nos princípios de biorremediação que consiste na utilização de seres vivos ou de seus componentes para biodegradar, nesse caso os compostos tóxicos presentes no

hidrolisado hemicelulósico. Além disso, é um método economicamente viável, que não gera efluentes tóxicos e que conduz a perdas insignificativas de açúcares. Desse modo, a destoxificação biológica tem se mostrado como um procedimento promissor para futuras aplicações industriais.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um método de destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico. Com este propósito foi realizado um *screening* de algumas leveduras, em meio de cultura sintético, capazes de utilizar furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído como fontes de carbono e energia. As leveduras *Issatchenkia occidentalis* M1 e *Issatchenkia occidentalis* Y1'a foram as que apresentaram os melhores resultados em meio de cultura sintético e consequentemente foram as selecionadas para os experimentos que foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Para cada levedura selecionada foi realizado um planejamento fatorial completo $2^2$, com três repetições no ponto central. As variáveis, pH (4,0 ou 5,0) e agitação (100 rpm ou 300 rpm), foram avaliadas e como variável resposta foi considerada a porcentagem da remoção de 5-hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético e fenóis do hidrolisado hemicelulósico após 96 horas de tratamento biológico.

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que a destoxificação biológico do hidrolisado hemicelulósico representa um procedimento eficiente, inovador e de baixo custo. Os compostos tóxicos testados (HMF, furfural, ácido acético e fenóis), de forma geral, foram significativamente removidos do hidrolisado hemicelulósico por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. Por ser um trabalho de carácter exploratório, faz-se necessário mais estudos acerca deste tema, assim como a otimização do processo de destoxificação pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a com intuito de se alcançar a excelência deste procedimento.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Os materiais lignocelulósicos e o bioetanol

Atualmente, alguns países têm buscado fontes alternativas de energia (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996) que sejam ambientalmente corretas e que não contribuam para um aumento significativo das emissões de $CO_2$ (MARTINELLI; FILOSO, 2008), como os denominados biocombustíveis. Estes contribuem com o desenvolvimento sustentável devido à redução na utilização de combustíveis fósseis (CARDONA et al., 2010).

Criado no Brasil em 1970, o programa Pró-álcool teve como objetivo a produção de etanol combustível por via biotecnológica com intuito de diminuir as importações de petróleo (LIN; TANAKA, 2006). O governo federal brasileiro estabeleceu que 25% do álcool anidro produzido no Brasil deveria ser adicionado à gasolina e motivou a fabricação de veículos que pudessem ser conduzidos com até 100% de álcool hidratado (GOLDEMBERG, 2007). Atualmente, o Brasil é o único país produtor de etanol em escala industrial e competitivamente econômico, pela fermentação dos açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar (ELSHAHED, 2010).

O etanol é um metabólito primário da fermentação de açúcares (DEMAIN, 2009) por organismos que os utilizam como substrato para a produção desse bioproduto e liberação de $CO_2$ (LIN; TANAKA, 2006). O etanol é considerado um combustível oxigenado de queima limpa, pois reduz as emissões veiculares de $CO_2$ para a atmosfera (DEMIRBAS, 2005).

A produção de etanol combustível também pode ocorrer a partir da biomassa lignocelulósica, denominado de etanol de segunda geração, sendo capaz de reduzir a poluição atmosférica, devido à menor liberação de dióxido de carbono e pode consequentemente, gerar novos mercados para os resíduos agrícolas e florestais (PÉREZ et al., 2002).

A biomassa lignocelulósica pode ser proveniente de gramíneas, madeiras, resíduos agrícolas e florestais, e pode ser usada para a produção de energia elétrica, de calor e como fonte abundante e renovável de açúcares para produção de etanol (DEMIRBAS, 2005;

GOLDEMBERG, 2007; IRANMAHBOOB et al., 2002; KOOPMAN et al., 2010; PÉREZ et al., 2002; WYMAN, 1994).

O processo de utilização da biomassa lignocelulósica para produção de etanol iniciou-se por volta de 1898 a partir de experimentos realizados por cientistas alemães e teve continuidade nos Estados Unidos durante a Primeira Guerra Mundial. O processo envolvia a acidificação da madeira para liberação de glicose e posterior fermentação por micro-organismos anaeróbios (ELSHAHED, 2010).

A utilização de resíduos agro-industriais em bioprocessos além de fornecer substratos alternativos, contribui ao resolver o problema de sua eliminação (LIN; TANAKA, 2006), pois o acúmulo de elevadas quantidades destes resíduos no solo conduz a uma menor produtividade, à medida que a temperatura do mesmo diminui. Além desses fatores, há uma redução na formação de nitrato no solo e estes resíduos podem hospedar micro-organismos que causam infecções nas lavouras (ABRIL; ABRIL, 2009).

O etanol lignocelulósico se apresenta como alternativa ao uso dos combustíveis fósseis (ABRIL; ABRIL, 2009), pois o consumo acelerado de petróleo tem contribuído para as severas mudanças climáticas e reduzido a qualidade do meio ambiente, devido às elevadas emissões diárias de dióxido de carbono proveniente da queima dos combustíveis, intensificando o efeito estufa (DEMAIN, 2009).

## 2.2 Composição da biomassa vegetal

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (DEMIRBAS, 2005; GÍRIO et al., 2010), que de um modo geral compreendem mais de 75% da biomassa vegetal. Estas três frações possuem alto peso molecular (ABRIL; ABRIL, 2009). Além desses constituintes, uma série de outras substâncias, como óleos vegetais, proteínas e cinzas compõem a fração restante da biomassa lignocelulósica (GÍRIO et al., 2010; WYMAN, 1994).

Em geral, cerca de 90% do peso seco vegetal é constituído por celulose, hemicelulose, lignina e pectina (IRANMAHBOOB et al., 2002), dentre estes a celulose e a hemicelulose correspondem a 2/3 da biomassa vegetal (GÍRIO et al., 2010).

A celulose e a hemicelulose são polímeros de carboidratos que estão intimamente associadas em uma estrutura mantida por ligações covalentes e não-covalentes. A lignina,

por sua vez, é uma macromolécula aromática que está ligada à celulose e hemicelulose por ligações covalentes e pontes de hidrogênio (LEE, 1997; PÉREZ et al., 2002).

A lignina e as longas cadeias de polissacarídeos são naturalmente conhecidas como "plástico natural", pois agem como uma capa protetora contra o ataque de micro-organismos, o que confere às plantas uma grande resistência mecânica (MAMMAN et al., 2008), que consequentemente torna essa estrutura recalcitrante e de difícil hidrólise (GÍRIO et al., 2010).

### 2.2.1 Celulose

A celulose, considerada o principal constituinte da parede celular vegetal, é um homopolímero não-ramificado e linear, constituído por unidades de D-glicose ou anidroglucopiranose unidos por ligações glicosídicas β-(1→4). A celulose corresponde a aproximadamente 1/3 dos tecidos vegetais, porém a percentagem da mesma varia de acordo com a matéria-prima utilizada (FENGEL; WEGENER, 1989; LEE, 1997; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991; PANDEY et al., 2000).

A celulose é entrelaçada por uma matriz de polissacarídeos e frequentemente está impregnada de lignina. Cada glicose, presente na celulose, possui hidroxilas livres (DEMIRBAS, 2005; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991) que podem formar dois tipos de ligações de hidrogênio: as ligações intramoleculares, que ocorrem entre as unidades adjacentes de glicose de uma mesma molécula de celulose, e as ligações intermoleculares, que ocorrem entre as moléculas adjacentes de celulose. Essa organização nas ligações de hidrogênio da celulose resulta em regiões cristalinas. A estrutura cristalina da celulose a torna altamente insolúvel e resistente ao ataque enzimático e a ação dos produtos químicos. Porém, a celulose também possui uma região amorfa, menos organizada e mais propensa à hidrólise (FENGEL; WEGENER, 1989; MAMMAN et al., 2008).

### 2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose se distingue da celulose por ser um polímero de carboidratos de composição variada de açúcares, de cadeias menores e por apresentar ramificações. (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ et al., 2002).

A hemicelulose é um heteropolímero que, em geral corresponde de 15-35% da biomassa vegetal. É constituída por pentoses (β-D-xilose e α-L-arabinose), hexoses (β-D-manose, β-D-glicose e α-D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácido α-D-glucurônico, ácido α-D-4-O-metilgalacturônico e ácido α-D-galacturônico) (Figura 2.1). Outros açúcares como α-L-ramnose e α-L-fucose podem estar presentes em pequenas quantidades. Além disso, algumas hidroxilas (-OH) que estão presentes nos açúcares podem ser substituídas por radicais acetil. A hemicelulose tem um peso molecular menor que o da celulose e por apresentar uma estrutura ramificada, a hemicelulose é mais propensa à hidrólise do que a celulose (ALMEIDA et al., 2007; DEMIRBAS, 2005; ELSHAHED, 2010; GÍRIO et al., 2010; MAMMAN et al., 2008; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; PÉREZ et al., 2002).

Na hemicelulose, a distribuição dos açúcares varia conforme a matéria-prima empregada (WYMAN, 1994) e essa fração pode apresentar uma cadeia homopolímera, que consiste somente de um tipo de açúcar, como as xilanas, ou uma cadeia heteropolímera, que consiste de dois ou mais tipos de açúcares, como as glucomananas (FENGEL; WEGENER, 1989). Diferentes tipos de hemicelulose podem ser encontrados, como as glucuronoxilanas, as galactoglucumananas, as arabinoglucuronoxilanas, as xiloglucanas, arabinoxilanas entre outras (GÍRIO et al., 2010).

As xilanas são as formas mais comuns de hemicelulose e representam o segundo maior polissacarídeo presente na natureza. São constituídas por cadeias curtas (cerca de 200 unidades de açúcares) com ligações do tipo β-1,4 de β-D-xilopiranose. Pequenas quantidades de arabinose, ácido glucurônico, ácido acético, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico podem estar presentes na xilana (ELSHAHED, 2010; MAMMAN et al., 2008).

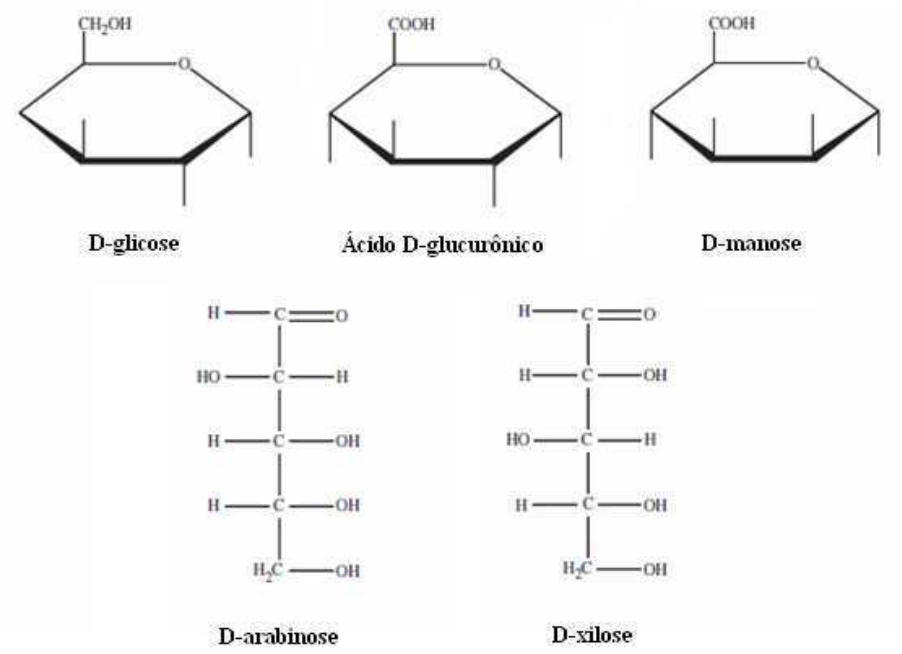



**Figura 2.1** Principais açúcares constituintes da porção hemicelulósica da parede celular. Fonte: (Adaptado) MAMMAN et al., 2008.

### 2.2.3 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula aromática mais abundante do planeta e corresponde a uma estrutura complexa, hidrofóbica e amorfa. É constituída por unidades de hidroxifenilpropano unidas por ligações cruzadas do tipo C-C e C-O-C. A lignina fornece suporte, impermeabilidade e resistência às plantas contra o ataque microbiológico e ao estresse oxidativo (ALMEIDA et al., 2007; FENGEL; WEGENER, 1989; LEE, 1997; PÉREZ et al., 2002). A lignina é extremamente resistente à degradação química e enzimática. A degradação biológica, por sua vez, pode ser realizada por fungos da podridão branca, ou seja, basidiomicetos e também por alguns actinomicetos (LEE, 1997).

A lignina é sintetizada a partir de três radicais: álcool coniferílico, álcool *p*-cumárilico e álcool sinapílico (Figura 2.2). De acordo com o grau de metoxilação a subunidade básica do álcool coniferílico é o guaiacil, do álcool *p*-cumárilico é o *p*-hidroxifenil e do álcool sinapílico é o siringil. O resultado final dessa polimerização é uma estrutura heterogênea. É importante ressaltar que a proporção desses monômeros varia

entre as espécies vegetais e esta relação tem sido utilizada para fins taxonômicos (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ et al., 2002, RAMOS, 2003).

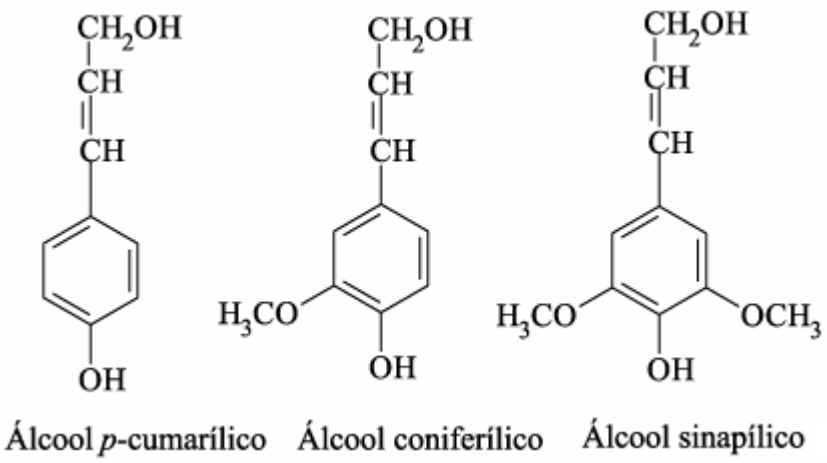



**Figura 2.2** Unidades de construção da lignina: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Fonte (adaptada): BUDZIAK et al., 2004.

### 2.2.4 Extrativos e não-extrativos

As substâncias extrativas correspondem a um grande número de diferentes compostos como ceras, ácidos graxos, álcoois, lipídeos, esteróides, hidrocarbonetos, flavonóides, entre outros (FENGEL; WEGENER, 1989; WYMAN, 1994). Porém, a composição dessa fração na parede celular varia de acordo com a matéria-prima. Essas substâncias podem ser encontradas em canais de resinas, em células do parênquima, na lamela média e na parede celular dos traqueídeos e fibras septadas. Algumas madeiras contêm substâncias extrativas que são tóxicas ou que impedem a ação das bactérias, fungos e cupins, outras conferem cor e odor à madeira (FENGEL; WEGENER, 1989).

As substâncias não-extrativas, por sua vez, compreendem componentes inorgânicos que são encontrados nas cinzas, o resíduo originado da queima da matéria orgânica. Os principais componentes das cinzas são: cálcio, potássio, magnésio, sílica, manganês, sódio, fósforo, cloro entre outros. A composição mineral das cinzas pode variar de acordo com o meio ambiente, o clima e a localização destes compostos no interior do vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989).

## 2.3 O bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto fibroso proveniente dos talos de cana-de-açúcar após o processo de extração do caldo rico em carboidratos fermentescíveis, principalmente a sacarose. A cana-de-açúcar é a matéria-prima preferencial para a produção de etanol no Brasil, uma vez que esse país possui condições climáticas favoráveis ao seu plantio, com vastas áreas de terras férteis, chuvas ao longo do ano e posição geográfica estratégica (ELSHAHED, 2010; MARTINELLI; FILOSO, 2008; PANDEY et al., 2000).

Quimicamente, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído de 50% de celulose, 30% de pentoses e 2,4% de cinzas. Devido ao baixo teor de cinzas, o bagaço apresenta maiores vantagens nos processos de bioconversão em relação às outras matérias-primas, tais como palha de arroz e palha de trigo, que possuem aproximadamente 17,5% e 11,0% de teor de cinzas, respectivamente (PANDEY et al., 2000).

A hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar é a do tipo L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana, sendo a xilose o açúcar predominante, compreendendo de 73,1 a 82,6% da hemicelulose total, enquanto a arabinose, a glicose e o ácido glucurônico estão presentes em menores quantidades (BRIENZO et al., 2009). A lignina do bagaço de cana-de-açúcar, por sua vez, é do tipo HGS, ou seja, contém os três precursores básicos desta macromolécula (RAMOS, 2003).

Segundo a CONAB (2011) estima-se que no Brasil a área de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira seja de 8.368,4 mil hectares, distribuídas em todos os estados produtores. O estado de São Paulo é o maior produtor com 52,2%, seguido por Minas Gerais com 8,87%, Goiás com 8,1%, Paraná com 7,3%, Mato Grosso do Sul com 5,7%, Alagoas com 5,45% e Pernambuco com 3,89%. Os 8,49% restantes corresponde aos demais estados.

A previsão da produção total de cana-de-açúcar na safra de 2011/2012 é de 571.471 milhões de toneladas, uma queda de 8,4% em relação à safra de 2010/2011 que foi de 623.905 milhões de toneladas, destas 47,3% será destinada à produção de açúcar e 52,7% à produção de álcool (CONAB, 2011).

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido investigado para produção comercial de xilose, glicose e outros açúcares (LAVARACK et al., 2002) e tem-se mostrado como uma matéria-prima viável para a produção de etanol de segunda geração, devido ao baixo teor

de lignina e a significativa liberação de açúcares quando métodos adequados de pré-tratamento são utilizados (CARDONA et al., 2010).

## 2.4 Algumas considerações sobre a conversão de materiais lignocelulósicos a etanol

O etanol é o biocombustível líquido mais utilizado na atualidade e corresponde a um álcool ($CH_3CH_2OH$) que pode ser obtido a partir da fermentação de três tipos distintos de matérias-primas, tais como os açúcares simples (cana-de-açúcar, melaço e frutas) que são diretamente convertidos a etanol, o amido (grãos, batatas e tubérculos) que deve ser hidrolisado em açúcares simples por enzimas específicas e posteriormente submetido ao processo de fermentação, e os materiais lignocelulósicos que também devem ser hidrolisados, convertidos a carboidratos simples e fermentados. Uma vez que os monossacarídeos são liberados, alguns micro-organismos podem fermentá-los a etanol (DEMIRBAS, 2005; LIN; TANAKA, 2006).

O processo convencional de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica abrange, basicamente, quatro etapas que correspondem ao pré-tratamento, responsável pelo rompimento da matriz lignocelulósica; a hidrólise enzimática, que promove a despolimerização da celulose em glicose por meio de enzimas celulolíticas; a fermentação, que é a conversão dos açúcares a etanol, geralmente realizada por leveduras; e a destilação, retificação e desidratação, passos necessários para a separação e purificação do produto final (MARGEOT et al., 2009).

### 2.4.1 Pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos contêm cerca de 70% dos carboidratos presentes nas frações correspondentes à celulose e à hemicelulose. Contudo, devido a forte associação da celulose e da hemicelulose com a lignina na parede celular, uma etapa de pré-tratamento é requerida para que estes carboidratos se tornem acessíveis à etapa de hidrólise enzimática e ao processo de fermentação (TIAN et al., 2009).

O pré-tratamento tem como objetivo aumentar a área de superfície interna do substrato e solubilizar a hemicelulose e/ou lignina, conduzindo ao fracionamento dos três principais componentes da parede celular, o que possibilita a abertura das fibras de celulose (PANDEY et al., 2000). Desse modo, ou há um maior acesso aos açúcares, ou é permitido que esses carboidratos sejam liberados a partir da hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

Para isso, vários métodos físicos e químicos de pré-tratamento podem ser utilizados como o pré-tratamento por explosão a vapor, o tratamento com solventes, com peróxido de hidrogênio, entre outros (PANDEY et al., 2000).

O pré-tratamento ácido é conduzido sobre altas temperaturas e pressões, e o tempo de reação pode durar alguns segundos ou até mesmo alguns minutos (DEMIRBAS, 2005). O ácido sulfúrico ($H_2SO_4$) é o catalisador mais empregado, mas o ácido clorídrico (HCl) e o ácido nítrico ($HNO_3$) também podem ser utilizados (CARDONA et al., 2010). Estes podem ser usados sob a forma concentrada ou diluída (GÍRIO et al., 2010).

Para tal tipo de pré-tratamento, a biomassa lignocelulósica deve ser primeiramente reduzida de tamanho pelo processo de moagem, que origina partículas suficientemente pequenas que facilitarão a difusão do ácido através do material lignocelulósico (WYMAN, 1994). Durante o pré-tratamento ácido, a hemicelulose é solubilizada e perfaz a fração líquida do material obtido. A fração sólida, por sua vez, corresponde à celulose e a lignina, que unidas formam a celulignina (CARDONA et al., 2010).

Dentre os vários trabalhos relatados pela literatura empregando o pré-tratamento ácido destaca-se o de Aguilar et al. (2002) que estudaram a liberação de xilose a partir do bagaço de cana-de-açúcar pelo pré-tratamento ácido utilizando ácido sulfúrico como catalisador, sob variadas temperaturas (100ºC, 122 ºC, 128ºC) e diferentes concentrações de ácido (2%, 4% e 6%). A melhor condição obtida foi a 2% de $H_2SO_4$ a 122ºC por 24 minutos, que rendeu uma solução de 21,6 g/L de xilose, 3 g/L de glicose, 0,5 g/L de furfural e 3,65 g/L de ácido acético. Nestas condições, mais de 90% da hemicelulose foi hidrolisada.

Desse modo, a etapa de pré-tratamento é essencial para os processos seguintes de hidrólise enzimática e de fermentação.

### 2.4.2 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática, etapa posterior ao pré-tratamento, enzimas capazes de hidrolisar o substrato são utilizadas. Estas devem ter acesso às fibras de celulose reduzindo, consequentemente a sua cristalinidade ou podem remover a lignina expondo os polímeros de celulose e hemicelulose (DEMIRBAS, 2005).

As enzimas que hidrolisam a celulose à glicose são denominadas celulases e são produzidas por organismos que incluem fungos, bactérias e leveduras. As celulases correspondem a um *pool* de enzimas que agem sinergicamente e possuem diferentes sítios de ligação (LEE, 1997; WYMAN, 1994).

A porção cristalina da celulose é altamente resistente à ação das celulases, sendo que a maioria das microfibrilas está inacessível às enzimas. Desse modo, a degradação da celulose exige a ação sinérgica das exoglucanases que removem rapidamente as unidades de celobiose das extremidades livres recém-formadas pelas endoglucanases, evitando que as ligações glicosídicas sejam restabelecidas. Estas duas enzimas podem agir consecutivamente ou em conjunto, sendo que ambas são inibidas pelo acúmulo de celobiose, o que representa um passo limitante na degradação da celulose (LEE, 1997; WYMAN, 1994) caso a enzima $\beta$-glicosidase, capaz de hidrolisar a celobiose em duas moléculas de glicose, não seja adicionada ao meio. Sabe-se atualmente, que poucas são as leveduras capazes de fermentar a celobiose a etanol (BANAT et al., 1998).

### 2.4.3 Fermentação etanólica

Alguns micro-organismos como leveduras, bactérias e fungos filamentosos são capazes de fermentar o hidrolisado lignocelulósico a etanol, porém *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* são os micro-organismos mais relevantes para esse bioprocesso (GÍRIO et al., 2010) (Figura 2.3).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias do gênero *Zymomonas* sp. são conhecidas por produzirem naturalmente dois moles de etanol por mol de hexose. Em ambas, o piruvato produzido pela via Embden-Meyerhof-Parnas em *Saccharomyces cerevisiae* e pela via Entner-Doudoroff em *Zymomonas mobilis* é convertido a acetaldeído

pela enzima piruvato descarboxilase e finalmente a etanol pela enzima álcool desidrogenase (ELSHAHED, 2010). Porém, um dos problemas da conversão da biomassa vegetal em etanol é que muitos micro-organismos não utilizam a xilose, proveniente da hemicelulose, como substrato para fermentação a etanol (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis* assimilam glicose, frutose, sacarose entre outros substratos. Porém, ambas não utilizam xilose e arabinose, açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico, como fontes de carbono e energia. Por outro lado, a bactéria *Escherichia coli* é capaz de utilizar glicose, xilose, arabinose, manose e galactose para conversão em bioprodutos, tais como o acetato, o lactato, o 2,3-butanodiol e o etanol (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998).

Dentre estes micro-organismos, a levedura *Pichia stipitis* destaca-se por ser capaz de produzir etanol a partir de pentoses, apresentando rendimentos significativos (DELGENES et al., 1996).

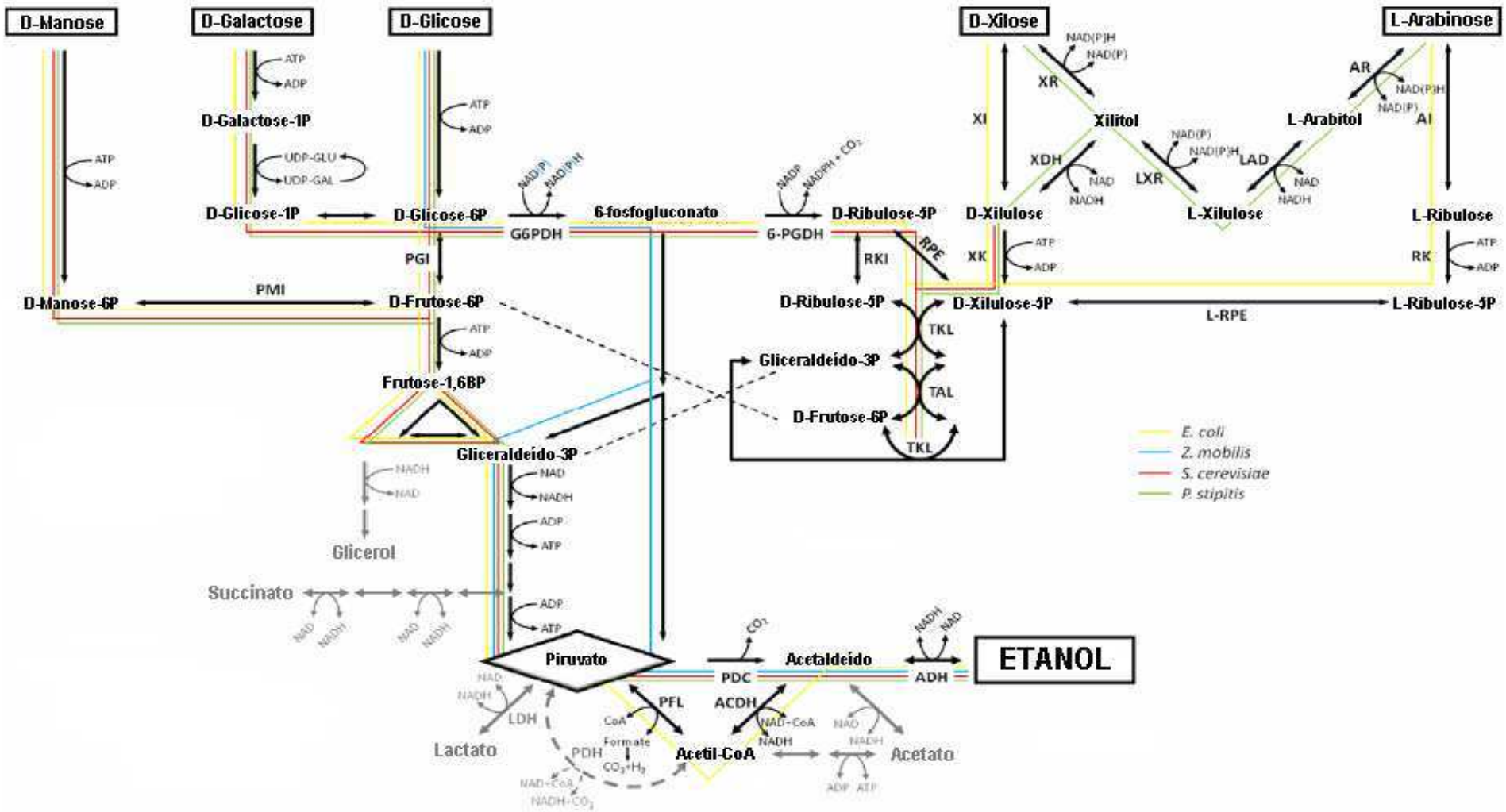



**Figura 2.3** Principais vias de assimilação de pentoses e hexoses conduzindo o fluxo à formação de etanol e geração de subprodutos. Fonte: GÍRIO et al., 2010.

## 2.5 Efeitos dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos

Um dos principais desafios encontrados na produção industrial do etanol lignocelulósico é o efeito negativo dos compostos tóxicos gerados após o pré-tratamento termoquímico (LUO et al., 2002; PARAWIRA; TEKERE, 2010). Durante a etapa de pré-tratamento, uma série de açúcares monoméricos é liberada e uma ampla quantidade de compostos tóxicos é formada (ALMEIDA et al., 2007; LARSSON et al., 1999; MUSSATTO; ROBERTO, 2004), os quais podem afetar negativamente o desempenho dos micro-organismos no processo fermentativo (PANDEY et al., 2000).

Os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos podem ser classificados em derivados de furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural), ácidos alifáticos (ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico) e compostos fenólicos conforme apresenta a figura 2.4 (ALMEIDA et al., 2007; FRAZER; McCASKEY, 1989; KOOPMAN et al., 2010; LARSSON et al., 1999; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; LUO et al., 2002; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; PANDEY et al., 2000).

Os íons metálicos (cobre, níquel e ferro), originados da corrosão dos equipamentos utilizados para hidrólise também são capazes de inibir algumas enzimas dos micro-organismos empregados no processo fermentativo (FRAZER; McCASKEY, 1989; MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Vários compostos tóxicos podem estar presentes em um único hidrolisado, o que varia de acordo com a origem das matérias-primas e das condições empregadas de pré-tratamento (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998). Essa afirmação é reforçada por Luo et al. (2002) que identificaram mais de 35 potenciais inibidores em hidrolisados lignocelulósicos.

Os efeitos inibitórios dos hidrolisados lignocelulósicos se resume às combinações de diferentes compostos tóxicos, que interagem negativamente sobre a taxa de crescimento, rendimento em biomassa celular e rendimento em etanol conforme apresenta a figura 2.5 (LIU et al., 2004; LOHMEIER-VOGEL et al., 1998; OLIVA et al., 2006; PALMQVIST et al., 1999b; ZALDIVAR et al., 2000).

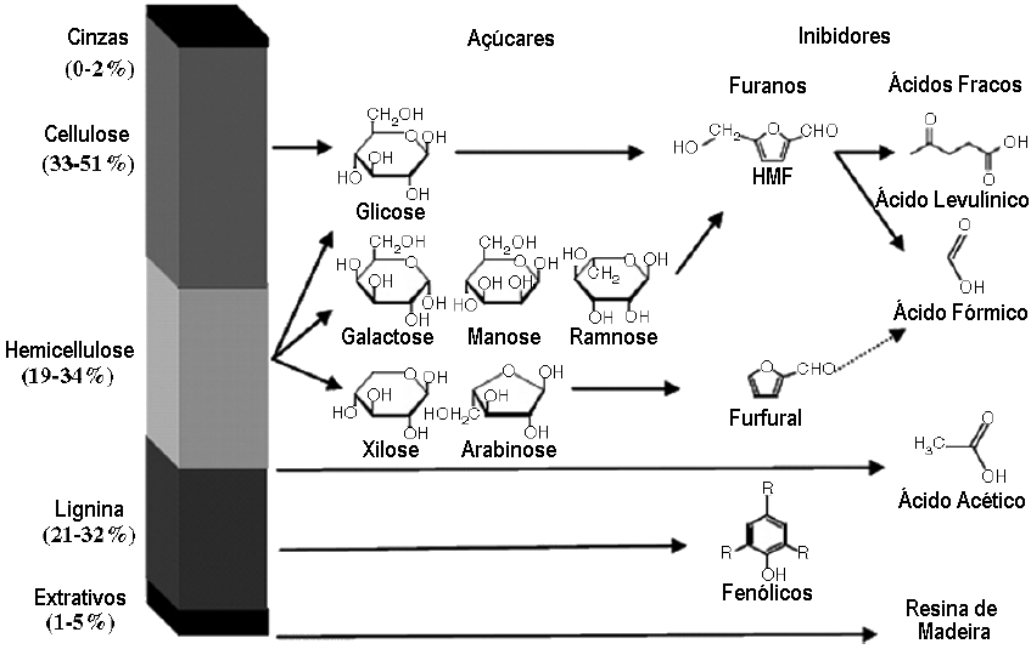



**Figura 2.4.** Composição da biomassa lignocelulósica e principais produtos derivados da hidrólise. Fonte: ALMEIDA et al., 2007.

A inibição por um composto tóxico durante o processo fermentativo também pode estar associada à concentração do inóculo, pois quanto maior a concentração do inóculo, menor a toxicidade exercida pelo composto ao micro-organismo (PALMQVIST et al., 1999b), devido à rápida taxa de bioconversão dos compostos tóxicos (BOYER et al., 1992), no caso dos derivados de furanos e aldeídos aromáticos (ZALDIVAR et al., 1999).

A temperatura e o pH também podem influenciar no grau de toxicidade dos compostos tóxicos. Estudos revelam que a toxicidade dos aldeídos aromáticos e do HMF é reduzida conforme o aumento de temperatura e de pH, com exceção do furfural que tem sua toxicidade reduzida a 35ºC em pH 7 (ZALDIVAR et al., 1999). De modo geral, a toxicidade dos ácidos orgânicos também diminui com o aumento do pH e da temperatura (ZALDIVAR; INGRAM, 1999). Em relação aos alcoóis o aumento de temperatura a 35ºC também é responsável por uma menor toxicidade desses compostos (ZALDIVAR et al., 2000).

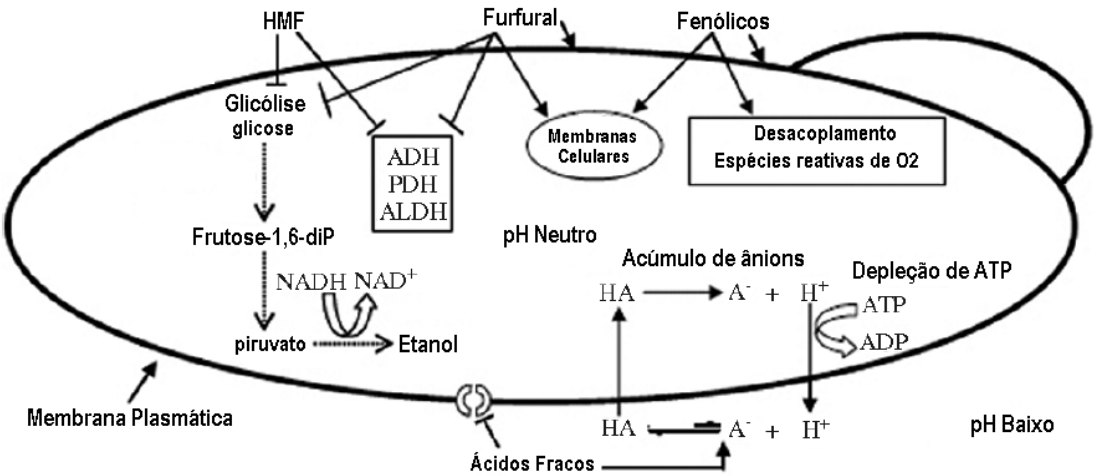



**Figura 2.5** Visão esquemática dos mecanismos de inibição de derivados de furano, ácidos orgânicos e compostos fenólicos em *Saccharomyces cerevisiae*. HMF: inibição da álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase; inibição da glicólise (enzimas e/ou coenzimas). Furfural: o mesmo que HMF, além de danos a membrana celular. Ácidos orgânicos: depleção de ATP, acúmulo de ânions tóxicos e inibição da captação de aminoácidos aromáticos. Compostos fenólicos: desacoplamento da produção de energia, geração de espécies reativas de $O_2$ e danos na membrana plasmática. Fonte (Adaptada): ALMEIDA et al., 2007.

### 2.5.1 Formação e liberação dos compostos tóxicos

O furfural e o HMF, compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, são produtos da desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente, em reação catalisada por ácidos sob altas temperaturas (ALMEIDA et al., 2009; AGUILAR et al., 2002; LAVARACK et al., 2002; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; OKUDA et al., 2008). O HMF e o furfural são formados a partir da liberação de três moléculas de água provenientes da glicose e da xilose, respectivamente (AGUILAR et al., 2002). Uma fração dos derivados de furano ainda pode ser susceptível a degradação, conduzindo a formação de ácidos orgânicos, tais como o ácido levulínico e o ácido fórmico conforme apresenta a figura 2.6 (ALMEIDA et al., 2009).

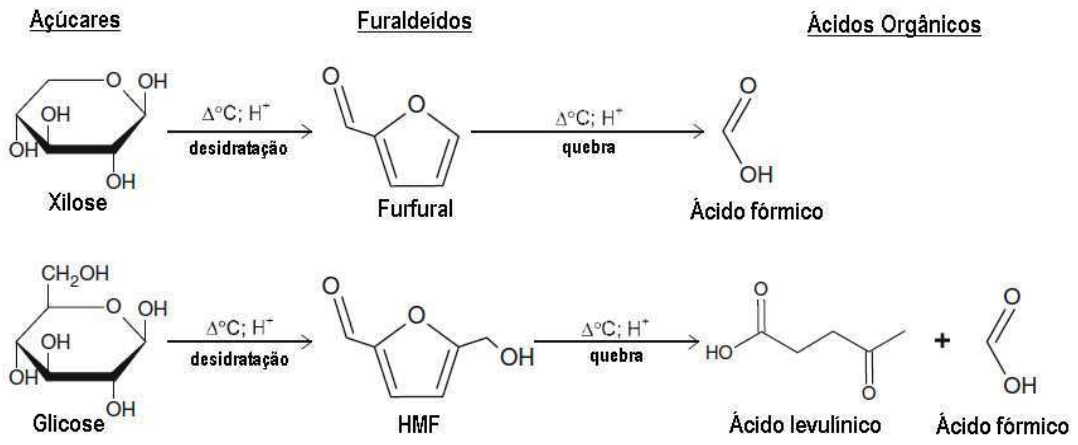



**Figura 2.6** Esquema representando a formação de furfural e HMF a partir de xilose e glicose, respectivamente. Fonte: ALMEIDA et al., 2009.

O ácido acético, por sua vez, é derivado da hidrólise de grupos acetil que estão ligados aos monômeros de carboidratos da hemicelulose. A toxicidade do ácido acético varia com as condições de cultivo utilizadas na fermentação e a razão entre espécies dissociado/não-dissociado depende da sua concentração e do pH do meio (AGUILAR et al., 2002; MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Os compostos fenólicos são provenientes, principalmente da degradação da lignina, mas outras substâncias aromáticas podem estar presentes no hidrolisado, devido à pequena fração de substâncias extrativas presentes na parede celular (LUO et al., 2002). Essas substâncias aromáticas podem também interferir negativamente no processo fermentativo (GÍRIO et al., 2010).

### 2.5.2 Efeito dos derivados de furano

As leveduras apresentam uma vantagem sobre os demais micro-organismos, ao serem expostas aos derivados de furano, por serem capazes de desacelerarem o crescimento celular até a completa conversão dos derivados de furano a compostos menos tóxicos (ALMEIDA et al., 2009), tais como o álcool furfurílico e o álcool hidroximetilfurfurílico. Caso contrário, a célula poderia sofrer sérios danos de caráter mutagênico. Portanto, a conversão biológica dos derivados de furano em compostos menos reativos tem como objetivo proteger e reparar a célula (ALMEIDA et al., 2009).

Desse modo, muitos estudos têm apontado que o furfural é convertido em álcool furfurílico a uma taxa de conversão alta, que após alguns minutos ou horas tende a diminuir, (DUARTE et al., 2005; LIU et al., 2004; OLIVA et al., 2006; PALMQVIST et al., 1999a; PALMQVIST et al., 1999b; TAHERZADEH et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000a; TAHERZADEH et al., 2000b) e uma pequena porcentagem é convertida em ácido furóico (DUARTE et al., 2005; PALMQVIST et al., 1999a; TAHERZADEH et al., 2000a) assim como, o HMF é convertido em 2,5-bis-hidroximetilfurano ou álcool hidroximetilfurfurílico (LIU et al., 2004; TAHERZADEH et al., 2000b).

A redução do furfural pela enzima álcool desidrogenase e a oxidação pela enzima aldeído desidrogenase são apresentadas nas equações 2.1 e 2.2 conforme Modig et al. (2002).

$$\text{Furfural} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Álcool furfurílico} + \text{NAD}^+ \quad \textbf{(2.1)}$$

$$\text{Furfural} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Ácido furóico} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad \textbf{(2.2)}$$

O furfural é reduzido a álcool furfurílico, que por sua vez é novamente oxidado a furfural. Este então é oxidado a ácido furóico (TAHERZADEH et al., 1999). Essa primeira reação de óxido-redução, aparentemente parece desnecessária, pois o álcool furfurílico necessita ser reoxidado a furfural, para que o próprio furfural seja oxidado a ácido furóico. Considerando a alta toxicidade dos aldeídos furânicos, a preferência inicial por reduzir o furfural ao invés de oxidá-lo pode ser interpretada como um mecanismo não específico de destoxificação para garantir que as concentrações de furfural sejam mantidas abaixo dos níveis de inibição conforme apresenta a figura 2.7 (WIERCKX et al., 2010).

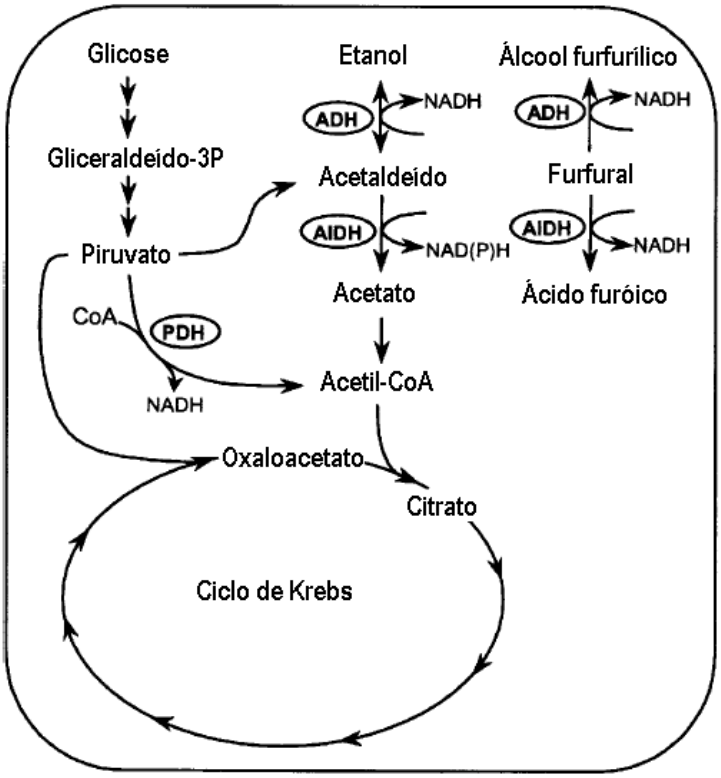



**Figura 2.7** Esquema simplificado mostrando as vias do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* e os principais sítios de interação do furfural. Fonte: MODIG et al., 2002.

Segundo Taherzadeh et al. (2000b) a taxa de conversão específica do furfural é superior ao do HMF, que pode estar relacionada à menor hidrofobicidade do HMF, devido à presença do grupo hidroximetil. Porém, por possuir uma taxa de conversão mais lenta, os efeitos tóxicos do HMF duram mais tempo, o que pode conduzir a problemas mais graves do que o furfural, embora a sua toxicidade imediata seja claramente inferior. Essa diferença na taxa específica de conversão também pode estar relacionada às diferentes taxas de transporte ou a afinidade dos compostos tóxicos pela enzimas nas etapas de redução.

O álcool furfurílico, por sua vez, também pode afetar o crescimento celular, mas a queda na taxa específica de crescimento não é tão acentuada quanto à do furfural. (TAHERZADEH et al., 2000a). Além de que pequenas concentrações de álcool furfurílico não demonstram efeitos significativos sobre a produtividade específica de etanol (PALMQVIST et al., 1999a).

No geral, a redução do furfural a álcool furfurílico representa um processo vital de superação dos efeitos tóxicos do furfural, uma vez que o crescimento celular ocorre, sob a

presença de álcool furfurílico e ácido furóico (TAHERZADEH et al., 2000a). Desse modo, nenhum/ou pouco crescimento celular é observado até a completa conversão do furfural a estes dois compostos (BOOPATHY et al., 1993; PALMQVIST et al., 1999a; TAHERZADEH et al., 1999; 2000a) e do HMF a 2,5-bis-hidroximetilfurano. Por esse motivo pode ser observada, durante o crescimento celular, uma fase *lag* prolongada (LIU et al., 2004; OLIVA et al., 2006; PALMQVIST et al., 1999a) que revela uma importante mudança na fisiologia celular, que adapta o micro-organismo ao estresse químico. Porém, a duração da fase *lag* varia de acordo com o tipo de composto tóxico e a cepa de micro-organismo empregada (LIU et al., 2004). Em estudo realizado por Liu et al., (2004), estes autores observaram que a levedura *Saccharomyes cerevisiae* ATCC 211239 cultivada em meio sintético sob a presença de derivados de furano apresentou uma fase *lag* prolongada de oito e quatro horas nas culturas tratadas com furfural e HMF, respectivamente. A levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, por outro lado, apresentou uma fase *lag* de quatro horas sobre a presença de furfural.

Alguns estudos revelaram que a taxa de conversão do HMF e do furfural pode diminuir ou cessar, após o consumo de toda a glicose (BOOPATHY et al., 1993; TAHERZADEH et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000b). Partindo dessas observações, Taherzadeh et al. (1999) introduziram furfural na fase estacionária de crescimento celular, após total consumo da glicose e observaram que a taxa de conversão de furfural foi menor, em relação àquela observada na fase de crescimento exponencial. A redução do furfural e do HMF compete com a redução do acetaldeído, ocupando parte da capacidade glicolítica da célula, o que conduz a um menor fluxo de glicose a etanol. Portanto, conclui-se que a redução do furfural seja dependente da atividade glicolítica.

A redução do furfural a seu álcool correspondente afeta o equilíbrio redox da célula, resultando em um decréscimo na produção de glicerol (PALMQVIST et al., 1999b) e em um acúmulo intracelular de acetaldeído (TAHERZADEH et al., 2000a). O acúmulo intracelular deste composto, provavelmente ocorre devido à oxidação do etanol, tendo como objetivo o aumento das concentrações de NADH, para que essa coenzima seja empregada na redução do furfural (TAHERZADEH et al., 2000a), reação que é provavelmente catalisada pela enzima álcool desidrogenase, a mesma que converte o acetaldeído a etanol. Portanto, ambos os substratos competem pela mesma enzima (PALMQVIST et al., 1999a).

Por outro lado, a redução do furfural provavelmente também compete com a redução do diidroxiacetona-fosfato, uma vez que as enzimas que catalisam essas reações

necessitam de NADH. Alguns estudos apontam que a enzima álcool desidrogenase compete com a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (responsável pela reação que catalisa a formação de glicerol) pela coenzima NADH o que conduz a redução do furfural e a ausência de glicerol no meio fermentativo. A competição entre as duas enzimas por esta coenzima na forma reduzida, diminui os níveis intracelulares de NADH (PALMQVIST et al., 1999a).

A grande quantidade de NADH requerida para redução do furfural conduz a níveis insuficientes dessa coenzima para a respiração celular, o que resulta em uma pequena concentração de ATP, insuficiente para sustentar o crescimento celular. Portanto, os efeitos da inibição do furfural sobre o crescimento celular podem ser associados em parte pela alta demanda de NADH e em parte pela inibição em nível enzimático (TAHERZADEH et al., 2000a).

Consequentemente, vários estudos mostraram que o furfural e o HMF causam uma queda na taxa específica de crescimento e na produtividade específica de etanol (PALMQVIST et al., 1999a; TAHERZADEH et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000b) sendo que o furfural se revelou mais tóxico que o HMF (DOMINGUEZ, 2003; TAHERZADEH et al., 2000b; ZALDIVAR et al., 1999).

Quando os compostos tóxicos não estão presentes no meio fermentativo é observado um favorecimento na realização dos bioprocessos, como foi relatado por Lohmeier-Vogel et al. (1998) que na ausência de furfural, HMF e acetato *Pachysolen tannophilus* consumiu completamente 20 g/L de xilose em 60 horas e produziu 0,6 g/L de etanol e 3,0 g/L de xilitol, favorecendo a produção de biomassa. Porém, a combinação de 0,3 g/L de furfural, 0,9 g/L de HMF e 10,0 g/L de acetato conduziu a uma queda na taxa de consumo de xilose em aproximadamente 50%.

De uma forma geral, pode-se dizer que os aldeídos são quimicamente reativos e podem formar produtos com muitas classes de moléculas biológicas incluindo os ácidos nucléicos, proteínas e lipídios; além de inibirem a glicólise, a fermentação e ocasionar danos à membrana plasmática aumentando sua permeabilidade. A atividade de algumas enzimas também pode ser afetada, como a da álcool desidrogenase, a da aldeído desidrogenase e a da piruvato desidrogenase (SINGH; KHAN, 1995; LUO et al., 2002; MODIG et al., 2002; ZALDIVAR et al., 1999).

### 2.5.3 Os ácidos alifáticos

Os ácidos alifáticos, tais como o ácido acético, o ácido levulínico e o ácido fórmico também são potentes inibidores da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (ALMEIDA et al., 2009).

Os efeitos tóxicos destes ácidos estão relacionados aos seus pKa e ao valor do pH do meio. Em valores de pH inferiores aos pKas, estes compostos encontram-se na forma não-dissociada dos ácidos fracos (FONSECA, 2009), tais como a do ácido acético, por exemplo, é lipossolúvel e difunde-se para o interior do citoplasma onde o pH é próximo a neutralidade (VERDUYN et al., 1990). Rapidamente, esse composto se dissocia devido ao valor do pH intracelular, o que resulta na liberação de prótons dentro do citoplasma. Com o objetivo de evitar a acidificação do citoplasma há um aumento na atividade da ATPase que passa a impulsionar prótons para fora da célula, a custo da hidrólise de moléculas de ATP e em virtude do desacoplamento da produção de energia (HOLYOAK et al., 1996; PALMQVIST et al., 1999b; RUSSELL, 1992).

Para a regulação intracelular do pH pode ser observado um aumento de duas a três vezes na atividade da ATPase (ERASO; GANCEDO, 1987). Porém, o crescimento celular pode cessar, devido ao baixo valor de pH e resultar na acidificação do citoplasma, seguida da morte celular, caso o influxo de prótons ultrapasse a capacidade de bombeamento da ATPase, ou caso se esgotem as reservas energéticas da célula (PALMQVIST et al., 1999b; RUSSELL, 1992; VERDUYN et al., 1990). Por outro lado, o efeito da acidificação intracelular do citoplasma pode ser menor sob a presença de glicose (CARMELO et al., 1997).

A necessidade de ATP para manter a homeostase em baixas concentrações de ácidos orgânicos, em alguns casos, explica a queda na produção de biomassa e o aumento na produção de etanol, pois para obter ATP a glicose é desviada da formação de biomassa para produção de etanol (CASEY et al., 2010). Palmqvist et al. (1999b) observaram que sob condições anaeróbicas em baixa concentração de ácido acético, o requerimento por ATP estimula a produção e o rendimento em etanol.

Por outro lado, Taherzaher et al. (2000a) demonstraram que a taxa de consumo de oxigênio, sob condições aeróbicas, aumentou ao se adicionar pequenas concentrações de ácido acético (1,5 g/L). O ácido acético, retido no citoplasma sobre a forma dissociada, pode ser direcionado ao Ciclo de Krebs contribuindo para a formação de intermediários

metabólicos, ATP, NADH e $FADH_2$, sendo que esses dois últimos são oxidados pela cadeia de transporte de elétrons, levando a formação de ATP (SHERIDAN et al., 1990 apud LIMA et al., 2004).

### 2.5.4 Os compostos fenólicos

Os organismos que utilizam os compostos fenólicos como fonte de carbono e de energia, os metabolizam durante o crescimento celular (VARMA; GAIKWAD, 2008). Para isso, os compostos fenólicos são convertidos enzimaticamente pelos micro-organismos em compostos menos tóxicos (ALMEIDA et al., 2007).

Os compostos fenólicos podem causar seus primeiros efeitos tóxicos sobre a membrana plasmática causando perda de sua integridade (BARBER et al., 2000; PEREIRA et al., 2012). Quando as moléculas hidrofóbicas dos compostos aromáticos se acumulam na membrana plasmática, estas provocam um aumento na fluidez da membrana, intensificando o influxo de prótons. Estas moléculas anfipáticas se dissolvem relativamente bem, pois as suas estruturas são similares as dos fosfolipídeos da membrana plasmática (ANDO et al., 1985 apud PALMQVIST et al., 1999b).

Os compostos fenólicos, principalmente sobre altas concentrações, podem inibir o crescimento celular, reduzir a produção de etanol e prolongar a duração da fase *lag*. Porém, estudos revelaram que a destoxificação do meio é capaz de aumentar a taxa de crescimento celular e a produção de etanol (BORNEMAN et al. 1986; CHO et al., 2009; DELGENES et al.,1996; LI et al., 2010; MARGESIN et al., 2004; MONTEIRO et al., 2000; PEREIRA, 2007; VARMA; GAIKWAD, 2008).

A taxa de assimilação de compostos fenólicos por organismos que os utilizam como fonte de carbono e energia é fortemente influenciada pela presença de glicose no meio. A glicose, quando presente, conduz a uma menor duração da fase *lag*. Desse modo, a biodegradação dos compostos fenólicos pode ser potencializada pelo consumo de glicose, pois a suplementação do meio com este carboidrato acelera a degradação dos fenóis (WANG et al., 2010). Assim a glicose é o substrato preferencial e é usado para uma rápida taxa de crescimento e alto rendimento em biomassa (SHEN et al., 2009). Porém, para alguns organismos determinados compostos fenólicos também podem estimular o

crescimento celular, como o ácido hidrocinâmico, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido siríngico (BORNEMAN et al., 1986).

Para degradação aeróbica dos compostos aromáticos, os mesmos são transformados em intermediários-chaves do metabolismo celular através de uma série de vias intermediárias que são canalizadas a algumas vias centrais conforme apresentado na figura 2.8 (CAO et al., 2009).

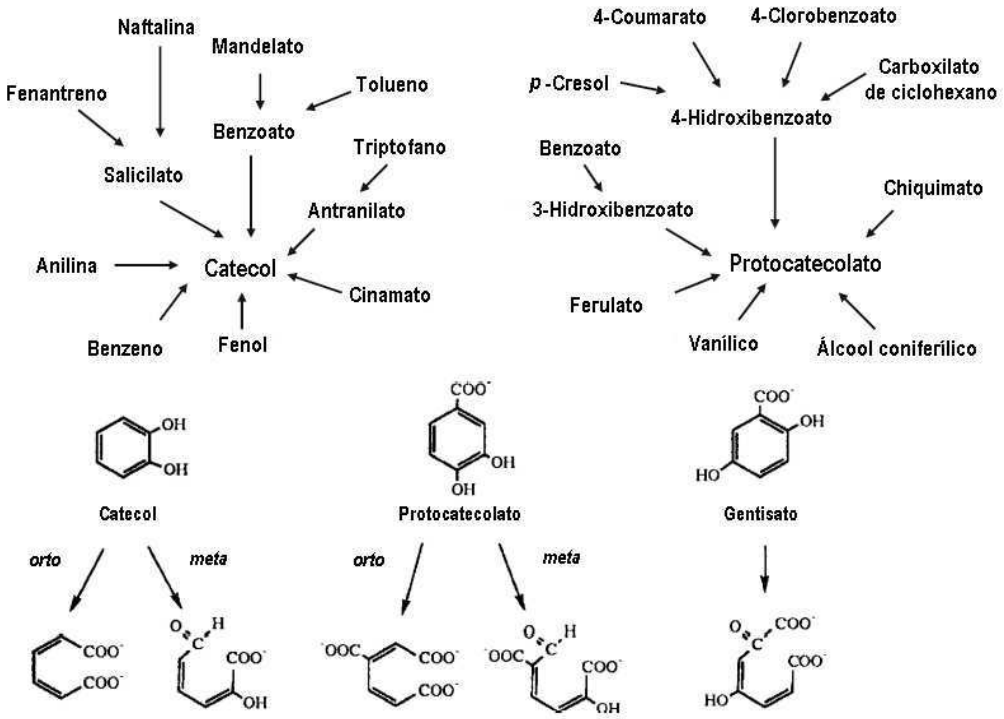



**Figura 2.8** Degradação biológica dos compostos aromáticos. Fonte: HARWOOD; PARALES, 1996 (apud CAO et al., 2009).

Na degradação aeróbica, a maioria das vias periféricas realiza reações de oxigenação catalisadas por mono ou dioxigenases que convertem os compostos aromáticos em intermediários aromáticos diidroxilados. As enzimas intradiol dioxigenase e extradiol dioxigenase utilizam esses intermediários diidroxilados como substrato. Para isso, estas enzimas clivam o anel aromático usando oxigênio entre os dois grupos hidroxilas (clivagem-orto) ou próximo de um dos dois grupos hidroxilas (clivagem-meta). Após a clivagem e a formação de um dos derivados diidroxilados (catecol, ácido protocatecóico ou ácido gentístico) o mesmo é conduzido a algumas vias centrais do metabolismo celular, que levam à formação de intermediários do Ciclo de Krebs conforme mostra a figura 2.9 (CAO et al., 2009; DOTEN et al., 1987; LIU et al., 2010).

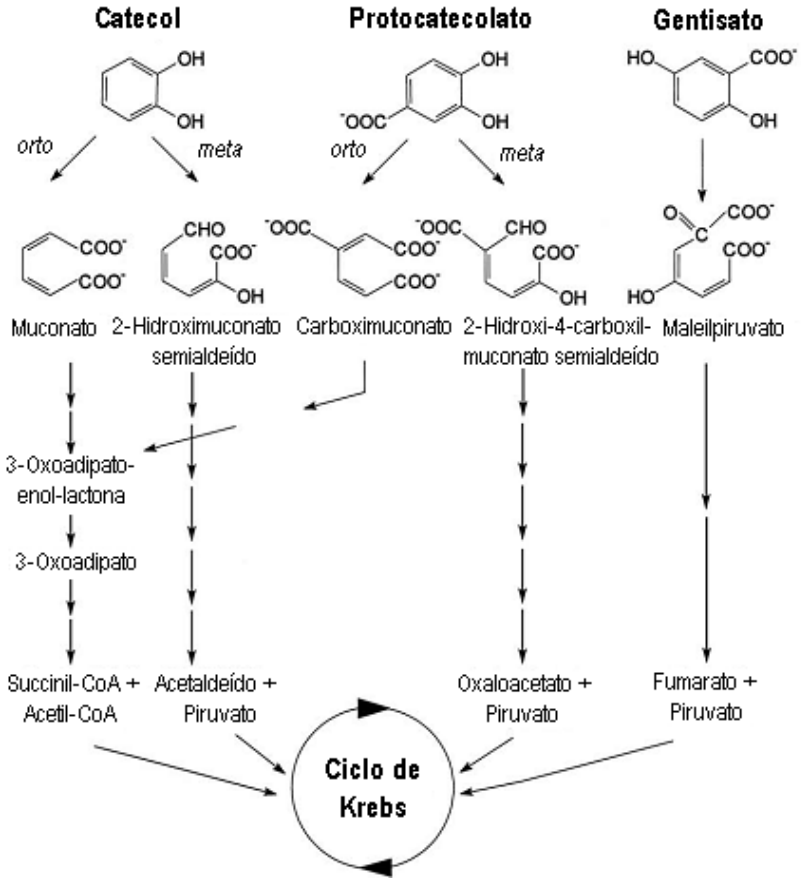



**Figura 2.9** Biodegradação do catecol, ácido protocatecóico e ácido gentísico que conduz a formação de intermediários do Ciclo de Krebs. Fonte: SMITH, 1994 (apud FONSECA, 2009).

Alguns estudos apontam que a falta de oxigênio no meio pode ser um fator limitante a biodegradação dos fenóis, pois a taxa de degradação dos mesmos se eleva em função da oferta de oxigênio (MELO et al., 2005). Porém, alguns micro-organismos podem utilizar uma variedade de substratos aromáticos como fonte de carbono e energia na ausência de oxigênio (BOLL et al., 2002; CAO et al., 2009).

Vários estudos têm relatado a capacidade de certos micro-organismos de utilizarem compostos fenólicos como fonte de carbono e energia, como reportou Monteiro et al. (2000). Neste estudo os autores constataram que a bactéria *Pseudomonas putida* DSM 548 foi capaz de utilizar compostos fenólicos como fonte de carbono e energia em concentrações que variavam de 1 a 100 mg/L.

Margesin et al. (2004), por sua vez, compararam *Arthrobacter* sp. AG31 e *Pseudomonas putida* DSM6414, em relação à capacidade de biodegradarem compostos fenólicos. Observou-se que ambas as bactérias utilizaram estes compostos para o crescimento celular e que poderiam biodegradar até 400 mg/L de fenol em 72 horas.

Varma e Gaikwad (2008) também testaram 19 cepas de leveduras, todas pertencentes ao gênero *Candida*, em relação à capacidade de biodegradarem fenol. Dentre as cepas estudadas, *Candida tropicalis* 3556, *Candida tropicalis* 3118 e *Candida lipolytica* 3472 apresentaram os melhores resultados, biodegradando 99,87%, 93,76% e 89,20% respectivamente, de fenol em 48 horas. Porém, a levedura *Candida tropicalis* 3556 foi a que se destacou, pois foi capaz de destoxificar mais de 95% deste composto na concentração de 2 g/L em 24 horas.

Li et al. (2010) também testaram a bactéria *Pseudomonas putida* LY1 em relação à capacidade de degradar fenóis. Esse micro-organismo foi capaz de utilizar de 20 a 380 mg/L de fenol como fonte de carbono e energia. Porém, em concentrações superiores a 800 mg/L o crescimento bacteriano foi totalmente inibido e nenhum mecanismo de biodegradação foi observado.

## 2.6 Métodos de destoxificação do hidrolisado lignocelulósico

A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico é um dos procedimentos necessários para superar os efeitos inibitórios dos compostos tóxicos e pode ser realizado por meio de métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento que devem ser economicamente e tecnicamente viáveis (ALMEIDA et al., 2009; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a). Os métodos de destoxificação são desenvolvidos para remoção dos compostos inibidores ao processo de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Vários métodos podem ser utilizados para a destoxificação do hidrolisado, como o uso de resina de troca iônica, carvão ativo, extração com solvente, tratamento com lacase, entre outros (ALMEIDA et al., 2009).

O processo de concentração do hidrolisado lignocelulósico pela evaporação a vácuo, pode ser considerado um método de destoxificação físico, pois reduz as concentrações de compostos voláteis tais como o ácido acético, o furfural e a vanilina. Porém, esse método aumenta moderadamente a concentração de substâncias tóxicas não voláteis como os extrativos e os derivados da lignina. O HMF também tem sua concentração aumentada, mas não é proporcional ao fator de concentração, o que sugere uma volatilização parcial ou degradação desse composto devido às condições operacionais

empregadas (CARVALHO et al., 2006; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; PARAJÓ et al., 1997). Em contrapartida, o processo de evaporação a vácuo é necessário, pois eleva a concentração de açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico (RODRIGUES et al., 2001).

O tratamento do hidrolisado lignocelulósico por *overliming* é um método de destoxificação amplamente utilizado. Este método inicia-se pelo ajuste do pH a valores que variam de 9 a 11 pela da adição de CaO ou $Ca(OH)_2$. Posteriormente, o hidrolisado tratado é filtrado para remoção do sulfato de cálcio, que é formado pela combinação do cálcio divalente com o sulfato presente no hidrolisado. Por fim, realiza-se a re-acidificação do hidrolisado para um valor de pH adequado ao processo de fermentação (LARSSON et al., 1999; MOHAGHEGHI et al., 2006; PARAJÓ et al., 1997). O tratamento por *overliming* é capaz de diminuir a concentração de furfural, HMF e compostos fenólicos em aproximadamente 20%, porém não altera a concentração dos ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) (MARTINEZ et al., 2000). Além disso, durante o tratamento perdas significativas de açúcares podem ser observadas (MOHAGHEGHI et al., 2006).

A destoxificação do hidrolisado por solventes orgânicos também pode ser utilizada e apresenta como vantagem a recuperação do solvente após seu uso, devido ao seu baixo ponto de ebulição (CRUZ et al., 1999). Frazer e McCaskey (1989) observaram que a extração do hidrolisado apenas com acetato de etila ou hexano e em combinação com hidróxido de cálcio foram os tratamentos mais eficazes para a remoção de 83% de furfural.

O método de destoxificação utilizando carvão ativo é também muito empregado para tratamento do hidrolisado lignocelulósico e corresponde à adição de carvão ao hidrolisado (MUSSATTO; ROBERTO, 2001; PARAJÓ et al., 1997). Os ácidos orgânicos são facilmente adsorvidos na forma não ionizada, consequentemente os valores de pHs baixos favorecem a adsorção. Os fenóis, por exemplo, em pH baixo encontram-se na forma neutra ou não-ionizada, o que favorece a sua adsorção pelo carvão ativo, porém sob valores de pH elevado os fenóis se tornam ânions (íons fenolato) e são dificilmente adsorvidos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

O tratamento do hidrolisado lignocelulósico com resina de troca iônica também pode ser empregado como um método de destoxificação. Diferentes resinas são capazes de remover diferentes substâncias e podem ser empregadas individualmente ou em conjunto. Carvalho et al. (2004) utilizaram quatro resinas de troca iônica como método de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Cada tipo de

resina era capaz de remover um/ou mais compostos específicos, o que permitiu a remoção total ou parcial de alguns dos compostos tóxicos testados. As quatro resinas removeram 82,1% de furfural, 66,5% de hidroximetilfurfural, 61,9% de compostos fenólicos, 100% cromo, 46,1% do zinco, 28,5% de ferro, 14,7% de sódio, 3,5% de níquel, porém a concentração de ácido acético permaneceu inalterada. Uma das desvantagens do uso de resinas de troca iônica diz respeito ao custo relativamente elevado das resinas, além de apresentar algumas dificuldades durante a sua operação.

Outros estudos tiveram como objetivo comparar os diferentes métodos de destoxificação, como foi realizado por Larsson et al. (1999) que testaram o tratamento com $Ca(OH)_2$, evaporação a vácuo, resina de troca aniônica, o emprego da enzima lacase e o tratamento com o fungo *Trichoderma reesei* como métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de "*spruce*" e os resultados obtidos foram relacionados ao crescimento celular e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. O máximo fator de rendimento em etanol foi obtido com o uso de resina de troca aniônica em pH 10 (0,49 g/g), seguido de tratamento com lacase (0,47 g/g), resina de troca aniônica em pH 5 (0,45 g/g) e tratamento com $Ca(OH)_2$ (0,44 g/g). O maior fator de rendimento de biomassa (0,080 g/g) foi obtido após o tratamento com resina de troca aniônica em pH 10. Pequenas reduções (3 a 6%) nas concentrações de açúcares fermentecíveis (glicose e manose) foram observadas em todos os tratamentos empregados.

Chandel et al. (2007) também compararam os métodos de *overliming*, lacase, carvão ativo e resina de troca iônica, no processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Em hidrolisado contendo 30,29 g/L de açúcares, 1,89 g/L de derivados de furano, 2,75 g/L de compostos fenólicos e 5,45 g/L de ácido acético, dentre os métodos utilizados o tratamento com resina de troca iônica mostrou-se o mais eficiente removendo 63,4% dos derivados de furano, 75,8% dos compostos fenólicos e 85,2% do ácido acético. O tratamento com carvão ativo removeu 38,7%, 57% e 46,8% de furanos, fenóis e ácido acético, respectivamente. O tratamento por *overliming* reduziu em 45,8% a concentração de derivados de furano e em 35,87% a dos compostos fenólicos; e o tratamento com lacase removeu 77% a dos fenóis. Foi observado que a máxima produção de etanol, utilizando *Candida shehatae* NCIM 3501, ocorreu em hidrolisado tratado por resina de troca iônica seguido de carvão ativo, lacase e *overliming*.

Diferentes métodos de destoxificação também podem ser combinados e empregados em um mesmo hidrolisado lignocelulósico para amenizar os efeitos dos compostos tóxicos no processo fermentativo, como demonstrou Canilha et al. (2004) que

obtiveram um rendimento em xilitol de 0,76 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,68 g/l.h quando o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, concentrado três vezes, foi tratado com resina de troca iônica. Por outro lado, a combinação de carvão ativo com o ajuste de pH com CaO e $H_2SO_4$ sob o mesmo hidrolisado resultou em um rendimento em xilitol de 0,40 g/g e em uma produtividade volumétrica de 0,30 g/l.h.

## 2.7 Destoxificação biológica

Uma alternativa aos métodos físicos e químicos de destoxificação do hidrolisado lignocelulósico é o método de destoxificação biológica que tem como objetivo o uso de organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e/ou enzimas capazes de destoxificar biologicamente os hidrolisados lignocelulósicos (PARAWIRA; TEKERE, 2010).

Algumas enzimas como a lacase, uma fenol oxidase e a lignina peroxidase, purificadas do fungo *Trametes versicolor*, podem ser usadas para a destoxificação biológica, como demonstraram Jönsson et al. (1998) que as utilizaram na destoxificação do hidrolisado de madeira, pré-tratado por explosão a vapor e $SO_2$. Foi observado um aumento da taxa de consumo de glicose e da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* após tratamento com estas enzimas. Porém, a destoxificação por estas enzimas envolveu somente a remoção de compostos fenólicos monoaromáticos.

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado como a destoxificação biológica é um método promissor para futuras aplicações industriais, como revelaram López et al. (2004) que isolaram do solo alguns micro-organismos capazes de usarem ácido ferúlico, furfural e HMF como fonte de carbono e energia. Foi observado, em trabalhos com meio de cultura sintético, que 58% dos micro-organismos foram capazes de crescer sobre o ácido ferúlico, 9,9% sobre o furfural, 2,6% sobre o HMF e menos de 1% sobre a combinação destes três compostos. Quando os testes foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de palha de milho, cinco bactérias, *Methylobacterium extorquens, Pseudomonas* sp*, Flavobacterium indologenes, Acinetobacter sp., Arthrobacter aurescens* e um fungo filamentoso, *Coniochaeta ligniaria* foram capazes de utilizar os compostos tóxicos como substrato, entretanto *Coniochaeta ligniaria* CB foi o que apresentou melhor

desempenho, sendo capaz de remover 78% de HMF e 97% de furfural do hidrolisado hemicelulósico.

O fungo filamentoso *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 também foi utilizado por Nichols et al. (2008) para remoção dos derivados de furano e ácidos orgânicos presentes no hidrolisado de palha de milho pré-tratado com ácido diluído. Aproximadamente 50% dos 37 compostos presentes no hidrolisado tiveram suas concentrações alteradas pelo fungo. Após a etapa de destoxificação biológica, micro-organismos recombinantes, tais como *Saccharomyces* sp. LNH-ST e *Escherichia coli* FBR5, foram avaliados quanto ao uso de pentoses. Observou-se que a levedura *Saccharomyces* sp. LNH-ST e a bactéria *Escherichia coli* FBR5 foram capazes de fermentar os açúcares de forma mais rápida no hidrolisado tratado com o fungo, em relação ao hidrolisado não-biodestoxificado.

Bactérias termófilas também podem ser empregadas na destoxificação do hidrolisado, conforme relatado por Okuda et al. (2008) que trataram o hidrolisado de resíduos de madeira com *Ureibacillus thermosphaercus* e o utilizaram para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* TJ1. Quando o hidrolisado foi tratado com 2,4 g/L de inóculo de *Ureibacillus thermosphaercus* a 50ºC, após 6 horas de incubação em condições aeróbicas, esta bactéria foi capaz de remover 20% de HMF e esta condição foi a que possibilitou a máxima produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* TJ1.

Em outro estudo conduzido por Hou-Rui et al. (2009), as leveduras *Issatchenkia occidentalis* (Lj-3, CCTCC M 2006097) e *Issatchenkia orientalis* (S-7, CCTCC M 2006098) foram testadas quanto à capacidade de destoxificarem o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Observou-se que ambas as leveduras, foram capazes de remover 100% de ácido acético e de furfural; e cerca de 99% (S-7 = 99,1% e Lj-3 = 98,6%) de guaiacol. Além disso, não causaram qualquer perda de volume do hidrolisado tratado. Ao se utilizar *Candida tropicalis* para a produção de xilitol, após o tratamento do hidrolisado com estas leveduras, foi observado um aumento na produção e na taxa de rendimento de xilitol.

Fonseca et al. (2011) também demonstraram que a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 foi capaz de destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar, casca de café e fibra de milho. No hidrolisado de casca de café, houve uma redução de 76,6% de furfural e de 1,4% de HMF; no de fibra de milho de 88,9% de furfural e de 2,4% de HMF; e no de palha de cana-de-açúcar de 54,3% de furfural e de 54,1% de HMF. A concentração de xilose, por sua vez, permaneceu inalterada após 36 horas de tratamento por *Issatchenkia occidentalis*.

Bactérias isoladas do solo e da água também podem ser empregadas na destoxificação dos hidrolisados lignocelulósicos, como relataram Wierckx et al. (2010) que selecionaram 14 espécies de micro-organismos capazes de utilizar HMF como fonte de carbono e energia. Esses micro-organismos pertenciam a 3 gêneros distintos, *Telluria, Arthrobacter* e *Cupriavidus*. Porém, um dos isolados, a bactéria *Cupriavidus basilensis* HMF 14, utilizou HMF, furfural e alguns ácidos orgânicos e compostos aromáticos como fontes de carbono e de energia. Quando *Cupriavidus basilensis* foi cultivada em hidrolisado de palha de trigo, os derivados de furano e o acetato foram completamente removidos após 10 horas de cultivo. Durante esse período as concentrações de glicose, xilose e arabinose permaneceram inalteradas. Porém, após 15 horas o teor de açúcares foi reduzido em 11%, sendo que as concentrações de xilose, glicose e arabinose decresceram simultaneamente na mesma proporção.

O fungo *Paecilomyces variotii* tem-se mostrado como um organismo promissor na remoção de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico. Segundo Pereira et al. (2012) *Paecilomyces variotii* foi capaz de remover concentrações significativas de ácido acético e de compostos fenólicos tais como gálico, pirogalol, siringaldeído e ácido vanílico do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. Porém, este organismo também utilizou quantidades significativas de açúcares presentes no hidrolisado.

Conforme apresentado nestes estudos a destoxificação biológica apresenta vantagens em relação ao baixo custo do processo de tratamento do hidrolisado hemicelulósico, por apresentar resultados significativos na remoção de compostos tóxicos e por ser um tratamento biológico que não gera subprodutos tóxicos e/ou nocivos ao meio ambiente.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 Geral

Selecionar leveduras com capacidade de remover e/ou reduzir a concentração dos principais compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar visando a sua aplicação em processos fermentativos.

## 3.2 Específicos

- ✓ Selecionar estirpes de leveduras, em meio de cultura sintético, capazes de utilizarem HMF, furfural, ácido acético, siringaldeído e ácido ferúlico como substratos.
- ✓ Verificar condições de pH e agitação do sistema que proporcionem uma maior remoção de HMF, furfural, ácido acético e fenóis totais em hidrolisado hemicelulósico.
- ✓ Identificar a levedura que apresente o melhor desempenho na remoção destes compostos tóxicos.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Seleção de estirpes de leveduras

As leveduras foram obtidas do banco de estirpes do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) campus Rio Claro - SP. As leveduras testadas foram isoladas em sua maioria de *Acromyrmex balzani, Atta laevigata, Polybia ignobilis, Syzygium jambolanum* entre outros. A técnica utilizada foi a de *replica plating,* em que as linhagens foram submetidas a métodos auxanográficos em meio sólido, onde se utilizou um replicador manual com 25 poços.

As leveduras *Issatchenkia occidentalis* Lj-3, CCTCC M 2006097 e *Issatchenkia orientalis* S-7, CCTCC M 2006098 (HOU-RUI et al., 2009) foram utilizadas como padrão por já haver estudos que confirmaram que estas estirpes são capazes de remover alguns dos compostos tóxicos testados neste trabalho.

### 4.1.1 Teste de diluição em Ágar

Os compostos tóxicos selecionados (Ácido acético glacial PA - Carlo Erba; Siringaldeído 98% - Sigma Aldrich; Ácido ferúlico 99% - Sigma Aldrich; Furfural 98% - Sigma Aldrich e HMF 99% - Sigma Aldrich) foram incorporados, por diluição, em meio YNB (Yeast Nitrogen Base) – Difco™ com ágar bacteriológico - Labimpex. Cada placa continha uma concentração diferente das fontes de carbono testadas. Os inóculos foram aplicados simultaneamente às superfícies de ágar por meio de um carimbo (aparelho de replicação de inóculo) (Figura 4.1). A base do carimbo consistiu de um sistema com 25 poços, sendo que cada poço comportava um volume de 350 µL de inóculo. A partir do carimbo e de sua base, as leveduras foram posteriormente transferidas para as placas de Petri.

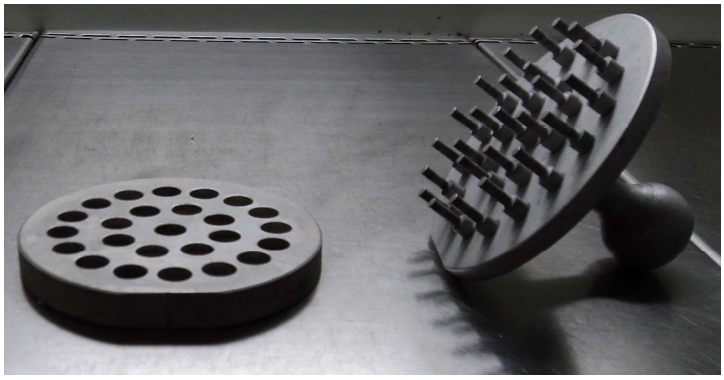


**Figura 4.1** Carimbo (à direita) utilizado para replicar o inóculo e a base do carimbo (à esquerda) constituída de 25 poços de profundidade.

#### 4.1.1.1 Preparo de diluições para placas de Agar

Para a diluição em placas de Petri, 20 mL de meio de cultura foram vertidos em cada placa, sendo que 18 mL correspondiam à combinação de 6,7 g/L de meio YNB mais 18 g/L de ágar e a uma solução de 2 mL do(s) composto(s) tóxico(s). O meio YNB e o ágar foram previamente combinados e distribuídos em tubos de ensaios que foram autoclavados a uma temperatura de 121ºC por 10 minutos a 1 atm. As soluções dos compostos tóxicos foram esterilizadas por filtração em membrana *Millex Fg* 0,22 µm de diâmetro de poro e 25 mm. A base do carimbo também foi autoclavada a uma temperatura de 121ºC por 10 minutos a 1 atm e o carimbo aplicador foi esterilizado pelo método de flambagem.

Após a autoclavagem do meio base (YNB + ágar), a solução contendo o composto tóxico foi combinada assepticamente ao meio que foi finalmente vertido em placas de Petri de plástico descartáveis.

Adicionaram-se em cada placa de Petri a combinação de YNB, ágar e diferentes soluções que continham concentrações variadas dos compostos tóxicos testados individualmente e em combinação. Cada composto tóxico foi testado em uma concentração alta e em uma concentração baixa correspondente àquelas encontradas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido após etapa de pré-tratamento ácido e depois do processo de concentração a vácuo utilizando fator de concentração cinco, conforme mostra tabela 4.1.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

**Tabela 4.1.** Concentrações dos compostos tóxicos testados individualmente e em combinações.

| Composto tóxico | Concentração baixa | Concentração alta |
|---|---|---|
| **Ácido acético** | 1g/L | 5g/L |
| **Siringaldeído** | 0,2g/L | 0,7g/L |
| **Ácido Ferúlico** | $8.10^{-2}$ g/L | 0,4g/L |
| **Furfural** | $1,8.10^{-3}$g/L | $1,6.10^{-2}$g/L |
| **HMF** | $4,0.10^{-3}$g/L | $2,0.10^{-2}$g/L |
| **Combinação** | 1g/L de ácido acético + 0,2g/L de siringaldeído + $8.10^{-2}$g/L de ácido ferúlico + $1,8.10^{-3}$g/L de furfural + $4,0.10^{-3}$g/L de HMF | 5g/L de ácido acético + 0,7g/L de siringaldeído + 0,4g/L de ácido ferúlico + $1,6.10^{-2}$ de furfural + $2,0.10^{-2}$g/L de HMF |

Fonte: Fonseca, 2009.

#### 4.1.1.2 Placas de controle

Placas que não continham compostos tóxicos foram preparadas a partir do meio base (YNB + ágar) para serem utilizadas como controles. O controle positivo consistiu de uma solução de meio base com 5 g/L de glicose, e o controle negativo foi preparado somente com meio base. Ambos foram vertidos em placas de Petri de plástico descartáveis.

O meio base e a solução de glicose foram autoclavados separadamente a uma temperatura de 121ºC por 10 minutos a 1 atm. Posteriormente, este meio foi combinado assepticamente à glicose no qual se obteve o controle positivo.

As placas controle foram feitas em duplicatas.

#### 4.1.1.3 Preparo do Repique

Todas as leveduras selecionadas para o teste foram cultivadas em meio *Sabouraud Dextrose Agar* - Acumedia® pelo método de semeadura em superfície e incubados em Câmara Incubadora B.O.D 374 CD - Fanem a 24ºC por 72 horas.

#### 4.1.1.4 Diluição da suspensão de inóculo

A partir do meio de manutenção, duas alíquotas da massa celular de cada micro-organismo foram retiradas por meio de uma alça de platina, adicionadas a 500 µL de água destilada estéril contida em tubo Eppendorf e homogeneizadas em um misturador vórtex.

#### 4.1.1.5 Inoculação em Placas de Agar

Os tubos Eppendorf contendo as suspensões celulares foram organizados e enumerados, e uma alíquota de 350 µL foi inoculada em seu poço correspondente da base do carimbo.

Por meio do carimbo cada um dos 25 inóculos foi aplicado simultaneamente à superfície das placas de Petri que continham o meio (Figura 4.2).

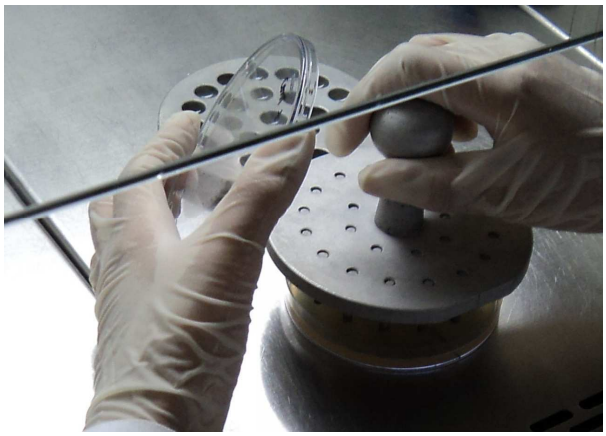


**Figura 4.2** Procedimento utilizado para "carimbar" os inóculos simultaneamente às superfícies de ágar.

Primeiramente, inoculou-se uma placa de cada controle (um controle positivo e o outro negativo) em seguida, de forma aleatória, inocularam-se as placas contendo diferentes concentrações e tipos de compostos tóxicos, assim como as replicadas dos controles.

As placas de Petri pré-inoculadas foram mantidas a temperatura ambiente até que a umidade nos pontos de inóculo fosse totalmente absorvida pelo ágar. Posteriormente, as

placas foram invertidas e incubadas a 25ºC por 21 dias. Os resultados foram obtidos com 7, 14 e 21 dias de incubação.

## 4.2 Obtenção e concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

### 4.2.1 Pré-tratamento ácido

O bagaço de cana-de-açúcar doado pela usina Santa Fé, da cidade de Nova Europa - SP foi exposto ao sol para secagem e, posteriormente foi realizada a sua caracterização química segundo Gouveia et al. (2009).

O teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi verificado para auxiliar na dosagem do ácido utilizado no processo de pré-tratamento ácido.

O pré-tratamento ácido foi realizada em reator tipo tambor rotativo vertical (capacidade útil de 50 L) aquecido por resistência (de porcelana) a uma temperatura de 121ºC por 10 minutos. Foi utilizado 100 mg de ácido sulfúrico (98%p/p – 1,8356g.cm$^{-3}$) para 1 g de bagaço de cana-de-açúcar (matéria seca) em uma proporção de 1:10 entre massa seca de bagaço e volume de solução ácida. Após o processo, o hidrolisado hemicelulósico obtido foi filtrado para separar os resíduos sólidos (celulignina) da porção líquida.

### 4.2.2 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado foi submetido ao processo de concentração a vácuo a 70ºC que teve como finalidade aumentar a concentração total de açúcares. O hidrolisado original sofreu redução para 1/5 do volume inicial.

O hidrolisado hemicelulósico foi caracterizado antes e após as etapas de concentração em relação ao pH e aos teores de D-glicose, D-xilose, D-arabinose, HMF, furfural, ácido acético e fenóis.

## 4.3 Processo de destoxificação biológica

### 4.3.1 Preparo do repique e do inóculo

As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio Agar Sabouraud 2% - Labsynth pelo método Agar Plate e incubados em estufa incubadora a 30ºC por 24 horas.

O inóculo foi cultivado em meio YPD conforme a composição descrita na Tabela 4.2. A água destilada, a solução de peptona, a solução de glicose e a de extrato de levedura foram autoclavados a 110ºC por 15 minutos. Todas as soluções e a água destilada foram combinadas assepticamente, unidas às células do micro-organismo e distribuídas em frascos Erlenmeyer de 500 mL vedados com rolhas de algodão contendo 200 mL de meio que foram incubados em agitador rotatório – New Brunswick Scientific – Edison, N.J., U.SA. a 200 rpm por 24 horas a 30ºC.

**Tabela 4.2** Composição do meio de cultura YPD.

| **Soluções** | **Concentração** |
|---|---|
| Extrato de levedura | 10 g/L |
| Peptona | 20 g/L |
| Glicose | 20 g/L |
| Água destilada | 1 L |

Fonte: LÓPEZ et al., 2004.

Após 24 horas de incubação em agitador rotatório, o inóculo foi distribuído em tubos falcon de 50 mL e centrifugado a 2600 xg por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água destilada estéril e homogeneizadas em misturador vórtex. Para lavagem, o inóculo foi centrifugado novamente a 2600 xg por 20 minutos. A água de lavagem foi então descartada e o inóculo ressuspenso em água destilada estéril e homogeneizado novamente. Uma alíquota de 1 mL do inoculo foi retirada do tubo falcon e diluída em balão volumétrico de 200 mL. A concentração celular foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro por meio de curvas de crescimento previamente estabelecidas. A partir da concentração celular obtida foi possível calcular o volume necessário para que se atingisse uma concentração inicial de 0,5 g/L de células que foram adicionadas ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

## 4.4 Testes com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Após o ajuste do pH do hidrolisado hemicelulósico com micropérolas de NaOH P.A - Labsynth de acordo com os valores do planejamento experimental (4,0; 4,5; 5,0), o hidrolisado foi filtrado e autoclavado a 110ºC por 15 minutos. Em seguida, o hidrolisado foi centrifugado a 2600 xg por 20 minutos para remoção dos sólidos suspensos.

O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado com 6,7 g/L de YNB – Sigma-Aldrich que foi autoclavado a 110ºC por 15 minutos. Em frascos Erlenmeyers de 125 mL, vedados com rolhas de algodão, foram colocados 50 mL de meio composto por hidrolisado hemicelulósico suplementado com YNB e 0,5g/L de células. Os testes de destoxificação biológica foram conduzidos em diferentes agitações a 30ºC por 96 horas em agitador rotatório - New Brunswick Scientific – Edison, N.J., U.SA. Os ensaios foram realizados em triplicatas e cada frasco Erlenmeyer correspondia a um tempo de retirada de amostra. Alíquotas de 50 mL de amostras foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas para quantificação dos teores de D-glicose, D-xilose, D-arabinose, HMF, furfural, ácido acético e fenóis, e para a determinação de pH e avaliação do crescimento celular.

## 4.5 Efeito do pH e da agitação na destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico pelas leveduras selecionadas

As variáveis selecionadas para o estudo foram: pH e agitação do sistema. Na tabela 4.3 são apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (-) representa o nível mínimo, o sinal (0) o ponto central e o sinal (+) representa o nível máximo.

**Tabela 4.3** Codificação dos níveis para os parâmetros avaliados.

| **Parâmetros** | **Níveis** | | |
|---|---|---|---|
| | **Inferior ( - )** | **Médio ( 0 )** | **Superior ( + )** |
| $X_1$ (pH inicial do hidrolisado) | 4,0 | 4,5 | 5,0 |
| $X_2$ (agitação do sistema/rpm) | 100 | 200 | 300 |

Foi realizado um planejamento fatorial completo $2^2$ com três repetições no ponto central conforme apresentado na tabela 4.4. Como variável resposta foi considerada a porcentagem da remoção total de compostos tóxicos (HMF, furfural, ácido acético e fenóis) pelas leveduras do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

**Tabela 4.4** Matriz de planejamento fatorial completo $2^2$ com três repetições no ponto central que foi empregada no estudo da remoção de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico.

| **Experimentos** | **Níveis codificados** | | **Níveis reais** | |
|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ | $X_2$ | $X_1$ (pH) | $X_2$ (rpm) |
| 1 | - | - | 4,0 | 100 |
| 2 | + | - | 5,0 | 100 |
| 3 | - | + | 4,0 | 300 |
| 4 | + | + | 5,0 | 300 |
| 5 | 0 | 0 | 4,5 | 200 |
| 6 | 0 | 0 | 4,5 | 200 |
| 7 | 0 | 0 | 4,5 | 200 |

## 4.6 Métodos Analíticos

### 4.6.1 Determinação de pH

O pH do hidrolisado e de todas as amostras foi determinado por pH-metro – W3B – Bel Engineering.

### 4.6.2 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade foi determinado pela secagem de 1g de amostra de bagaço de cana-de-açúcar em balança com infravermelho – Top Ray – Bel Engineering a 100ºC.

### 4.6.3 Determinação da concentração celular

O crescimento celular foi determinado por turbidimetria em espectrofotômetro – Bioespectro SP-220, em comprimento de onda de 600 nm e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida correspondente as leveduras testadas.

### 4.6.4 Determinação dos teores de açúcares, HMF, furfural e ácido acético.

Os teores de açúcares e ácido acético foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em detector (Waters 410; Milford, MA, USA) de índice de refração. As amostras foram previamente diluídas em uma proporção de 1:10 e filtradas em filtro *Sep Pak* C18. Posteriormente, as amostras foram injetadas no cromatógrafo, utilizando as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (7,8 x 300 mm) (Bio-Rad, Hecules, CA, USA), a temperatura de 45°C, eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo de 0,6 mL/min; em um volume de amostra de 20 µL.

A concentração de HMF e furfural também foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV (Waters 2487/USA). As amostras foram filtradas em membrana *Schleicher & Schuell* de diâmetro de poro de 0,45 µm e 47 mm e posteriormente injetadas no cromatógrafo empregando as seguintes condições: coluna Eclipse XDB-C18 5µm (4,6 x 150 mm), a temperatura de 25°C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:8 com 1% de ácido acético e adição de ácido fosfórico até se obter pH 3,0; fluxo de 0,9 mL/min; volume da amostra de 25 µL.

### 4.6.5 Determinação da percentagem de redução na concentração de HMF, furfural, ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído e consumo de açúcares.

A porcentagem de consumo de açúcares e de remoção de compostos tóxicos foi determinada segundo a equação 4.1.

% =[Concentração inicial – Concentração final/Concentração inicial].100% **(4.1)**

### 4.6.6 Determinação das concentrações dos produtos da decomposição da lignina.

A concentração de fenóis do hidrolisado hemicelulósico foi determinada segundo metodologia proposta por Gouveia et al. (2009); Rocha (2000).

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada e diluída em água destilada (a pH 12 com NaOH) de forma a se obter uma leitura inferior a uma unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada usando espectrofotômetro em comprimento de onda de 280 nm. A concentração de lignina solúvel foi calculada segunda a equação 4.2 conforme Gouveia et al. (2009).

$$Clig = 4{,}187*10^{-2}(A_T - A_{pd})-3{,}279*10^{-4} \quad \textbf{(4.2)}$$

De acordo com a equação 4.2, Clig significa concentração de lignina solúvel por g/L; $A_T$ - absorbância da solução de lignina somado aos produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = c_1.\varepsilon_1 + c_2.\varepsilon_2$, em 280 nm, os produtos da decomposição dos açúcares, tais como HMF e furfural, cujas concentrações $c_1$ e $c_2$ foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e $\varepsilon_1$ e $\varepsilon_2$ são as absortividades que valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g-1 cm-1 (GOUVEIA et al., 2009).

### 4.6.7 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o programa Statistica 8.

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.2. Seleção de leveduras que consumiram diferentes fontes de carbono

Durante a primeira fase de execução deste trabalho, 64 leveduras foram testadas quanto à capacidade de utilizarem HMF, furfural, ácido acético, siringaldeído e ácido ferúlico como fontes de carbono e energia. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.1.

Entre as leveduras testadas, as estirpes M1, Y1´a, Y1´b e Y3´ todas pertencentes à mesma espécie, *Issatchenkia occidentalis*, foram as que se destacaram por serem capazes de utilizar estes compostos em meio de cultura sintético. Estas estirpes conseguiram utilizar a combinação destes compostos tóxicos nas concentrações mais altas (5g/L de ácido acético + 0,7g/L de siringaldeído + 0,40g/L de ácido ferúlico + 1,6. $10^{-2}$g/L de furfural + 2,0. $10^{-2}$g/L de HMF) como substrato para o crescimento celular. Foi possível observar que as estirpes Y1´a, Y1´b, Y3´ apresentaram características morfológicas semelhantes, diferente da estirpe M1 conforme apresenta a figura 5.1.

Durante os testes, observou-se uma mudança na morfologia das colônias das leveduras de *Issatchenkia occidentalis*. Estas, em meio constituído de compostos tóxicos, formaram pseudohifas (YARROW et al., 2000), estrutura morfológica característica desta espécie de levedura. Provavelmente isso ocorreu devido às propriedades inóspitas do meio de crescimento.

A estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1´a exibiu uma colônia semelhante às de Y1´b e Y3´, o que sugere que talvez estas sejam clones de uma mesma estirpe. Diferentemente do que ocorreu com a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1, que apesar de ser da mesma espécie, apresentou colônia semelhante à da levedura controle S-7 (HOU-RUI et al., 2009). Deste modo, destas 4 leveduras, as estirpes M1 e Y1´a foram as selecionadas para o teste que foi realizado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

No controle negativo (ausência de fonte de carbono) não foi observado nenhum crescimento celular, em contrapartida todas as leveduras testadas cresceram no controle positivo (glicose como fonte de carbono) conforme apresenta a figura 5.2.

**Tabela 5.1** Assimilação de compostos tóxicos e suas combinações por diferentes espécies de leveduras isoladas de diferentes substratos.

| | Estirpe | Espécie | Substrato | Ácido acético | | Siringaldeído | | Ácido Ferúlico | | Furfural | | HMF | | Combinações | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1g/L | 5g/L | 0,2g/L | 0,7g/L | $8.10^{-2}$ g/L | 0,4g/L | $1,8.10^{-3}$g/L | $1,6.10^{-2}$g/L | $4,0.10^{-3}$g/L | $2,0.10^{-2}$g/L | 1* | 2** |
| 1 | PBM 63 | *Candida metapsilosis* ATCC 96144 | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 2 | PBM 52 | *Candida guilliermondii* TJY14a | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 3 | TO 100 | *Aureobasidium pullulans* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | TO 182 | *Aureobasidium sp.* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | TO 178 | *Aureobasidium pullulans* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | TO 047 | *Cryptococcus laurentii* | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | PBM 44 | *Pichia caribbica* | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 8 | PBM 64 | *Candida parapsilopsis* | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 9 | PBM 30 | *Pichia burtonii* | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 10 | BR3-3BY | *Candida silvae* | *Vriesia* sp. | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 11 | TO 050 | *Rhodosporidium toruloides* | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - |
| 12 | TO 049 | *Sporisorium elionuri* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - |
| 13 | TO 217 | *Trichosporon mycotoxinivorans* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 14 | TO 023 | *Cryptococcus laurentii* | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | TO 018 | *Rhodotorula mucilaginosa* | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 16 | SIA 24.1 | *Sporobolomyces japonicus* | Serrapilheira | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | TO 057 | *Sporisorium elionuri* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 18 | BR6-2AI | *Candida shehatae* | Água de bromélia | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | 54 | *Trichosporon chiarellii* | *Myrmicocrypta* sp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | CG8-8BY | *Candida shehatae* | Cogumelo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | PT1-1BASP | *Candida shehatae* | *Euterpe* sp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | BR6-2AY | *Candida shehatae* | Água de bromélia | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | N8a | *Meyerozyma guilliermondii* | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 24 | N12a2 | *Trichosporon asahii* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | N4ap2 | *Trichosporon asahii* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 26 | PI-II5 | *Aureobasidium pullulans* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | PI-II63 | *Aureobasidium pullulans* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 28 | 32 | *Aureobasidium pullulans* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | MP2-2CB | *Pseudozyma hubeiensis* | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - |
| 30 | PBM 39 | *Meira Arqovae* CBS 110053 | *Atta laevigata* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 31 | A1M-A12 | *Pichia caribbica* | *Atta* sp. | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 32 | PBM 3 | *Aureobasidium pullulans* | *Atta laevigata* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33 | FB1-1DASP | *Candida* sp. | Campanulácea | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Continua

**Tabela 5.1** Assimilação de compostos tóxicos e suas combinações por diferentes espécies de leveduras isoladas de diferentes substratos.

| | Estirpe | Espécie | Substrato | Ácido acético | | Siringaldeído | | Ácido Ferúlico | | Furfural | | HMF | | Combinações | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1g/L | 5g/L | 0,2g/L | 0,7g/L | $8.10^{-2}$ g/L | 0,4g/L | $1,8.10^{-3}$g/L | $1,6.10^{-2}$g/L | $4,0.10^{-3}$g/L | $2,0.10^{-2}$g/L | 1* | 2** |
| 34 | H10-10AY | NI | *Hedychium coronarium koening* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 35 | HFLS-5BASP | *Candida Tenuis* | *Hedychium coronarium koenig* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 36 | TO O11 | *Cryptococcus mangaliensis* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37 | TO 23 | *Cryptococcus laurentii* | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 | A1M-A7 | *Exophiala sp.* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 39 | FB8 | NI | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 40 | Lj-3 | *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 | Águas de resíduos industriais | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 41 | S-7 | *Issatchenkia orientalis* CCTCC M 206098 | Águas de resíduos industriais | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + |
| 42 | W7 | *Lecythophora* sp. | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43 | B22a2 | *Candida azyma* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 44 | S11 | *Saccharomycopsis crataegensis* | *Polybia ignobilis* | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - |
| 45 | Mel 28 | *Pichia caribbica* | *Polybia ignobilis* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 46 | YS4 | *Candida kofuensis* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 47 | W13a1b | *Pichia guilliermondii* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 48 | Mel 10 | *Aureobasidium pullulans* | *Polybia ignobilis* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | M1 | *Issatchenkia occidentalis* | *Syzygium jambolanum* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 50 | Y1´a | *Issatchenkia occidentalis* | *Syzygium jambolanum* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 51 | Y1´b | *Issatchenkia occidentalis* | *Syzygium jambolanum* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 52 | Y3´ | *Issatchenkia occidentalis* | *Syzygium jambolanum* | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 53 | JP26/06a | *Issatchenkia terricola* | *Syzygium jambolanum* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 54 | W14 | *Pichia guilliermondii* | *Polybia ignobilis* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 55 | BD149 | *Cryptococcus* sp. (in description) | Fiação elétrica de poste de luz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 56 | A2-1 | *Cryptococcus* sp. (in description) | Fiação elétrica de poste de luz | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 57 | A2-4 | *Cryptococcus* sp. (in description) | Fiação elétrica de poste de luz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 58 | TO 622 | NI | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 59 | TO 623 | NI | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 60 | TO 621 | NI | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - |
| 61 | TO 443 | NI | *Acromyrmex balzani* | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 62 | TO 440 | NI | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 63 | TO 753 | NI | *Acromyrmex balzani* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64 | CBS 5813 | NI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

NI – Espécie não identificada/ seqüenciada.

* Combinação 1: Ácido acético (1g/L) + siringaldeído (0,2g/L) + ácido ferúlico ($8.10^{-2}$g/L) + furfural ($1,8.10^{-3}$g/L) + HMF ($4,0.10^{-3}$g/L).

** Combinação 2: Ácido acético (5g/L) + siringaldeído (0,7g/L) + ácido ferúlico (0,40g/L) + furfural ($1,6.10^{-2}$g/L) + HMF ($2,0.10^{-2}$g/L).

\+ Micro-organismo que apresentou crescimento sob o composto selecionado. / - Micro-organismo que não apresentou crescimento sob o composto selecionado.

Estirpes 42- Lj-3 e 43- S-7 utilizadas como padrão de crescimento.

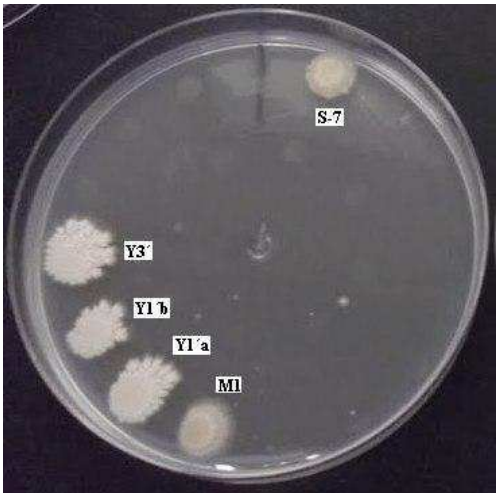



**Figura 5.1** Estirpes M1, Y1´a, Y1´b, Y3´ e levedura padrão utilizada S-7. Crescimento observado na combinação de concentrações mais altas dos compostos tóxicos testados.

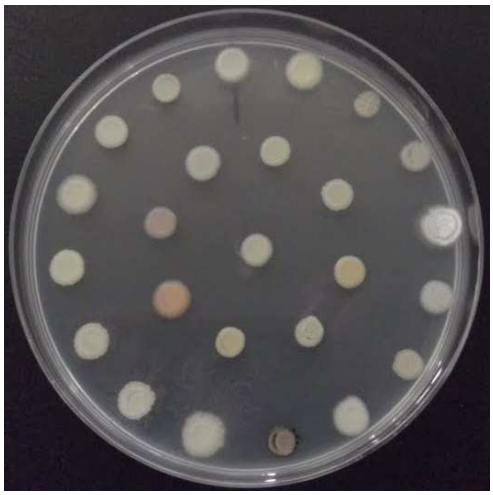


**Figura 5.2** Crescimento das colônias das leveduras testadas em controle positivo (glicose como fonte de carbono), após 21 dias de incubação.

Até o momento não foi encontrado nenhum trabalho na literatura semelhante a este, no qual diferentes espécies (a maioria já identificada) de leveduras foram testadas aleatoriamente quando a sua capacidade de remover os compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico. Foi possível constatar que de forma geral, os estudos reportados pela literatura foram conduzidos com micro-organismos capazes de crescerem em diferentes compostos tóxicos, porém estes organismos tiverem seu DNA sequenciado e foram identificados somente após a sua seleção.

## 5.3 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi analisado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos. Os resultados referentes a esta caracterização são apresentados na tabela 5.2.

**Tabela 5.2** Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

| **Componente** | **(% p/p)** |
|---|---|
| Glucana | 34,64% |
| Xilana | 16,76% |
| Arabinana | 1,01% |
| Grupos acetila | 1,13% |
| Lignina solúvel | 1,45% |
| Lignina insolúvel | 27,60% |
| Cinzas | 6,41% |
| Extrativos | 8,77% |
| **Total** | **97,77%** |

Os valores da tabela 5.2 demonstram os teores de celulose (34,64%), hemicelulose (18,90%) e lignina (29,05%) que representaram cerca de 82,59% da composição total da biomassa vegetal, proporção que está de acordo com aquela descrita pela literatura que alega que estas frações correspondem a mais de 75% da biomassa lignocelulósica total (ABRIL; ABRIL, 2009).

De acordo com a tabela 5.2, a celulose (34,64%) correspondeu a mais de 1/3 da biomassa vegetal (PANDEY et al., 2000) e a fração representada por este polímero se encontrou dentro da faixa de variação de 33 a 51% apresentada pela literatura (ALMEIDA et al., 2007), demonstrando um alto potencial para a conversão deste material por meio da sacarificação. Como se pôde observar a porcentagem correspondente a celulose deste bagaço de cana-de-açúcar foi relativamente menor se comparado ao de outros trabalhos da literatura que relataram que eram constituídos de cerca de 42,8% (GOUVEIA et al., 2009) ou até de 45,4% (RODRIGUES et al., 2010) de celulose de bagaço de cana-de-açúcar.

O valor obtido de hemicelulose (18,90%) está de acordo com a faixa de variação reportada pela literatura de 15 a 35% da composição da biomassa lignocelulósica (GÍRIO et al., 2010), sendo que a xilose correspondeu a 88,68% da composição da hemicelulose,

resultado bastante similar ao de Rodrigues et al., (2010) que foi de 81,91% de xilose na hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.

A fração de lignina (29,05%) presente no bagaço de cana-de-açúcar caracterizado também se mostrou dentro da faixa de variação proposta pela literatura de 19 a 33% (DEMAIN, 2009)

Além desses constituintes apresentados foi possível observar que uma série de outras substâncias, como óleos vegetais e proteínas, os denominados extrativos (8,77%) e as cinzas (6,41%), compreenderam a fração restante da biomassa lignocelulósica (ALMEIDA et al., 2007; GÍRIO et al., 2010; WYMAN, 1994).

A caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, de maneira geral, é de extrema importância uma vez que possibilita a avaliação precisa da composição desta biomassa lignocelulósica, nos diversos processos a que é submetida como o de pré-tratamento ácido, por exemplo (GOUVEIA et al., 2009). Além disso, a composição da biomassa lignocelulósica varia de acordo com a matéria-prima empregada, genética do vegetal, o ambiente que possibilitou o crescimento da planta, assim como os métodos de colheita e armazenamento do vegetal (CANILHA, et al., 2011).

Neste trabalho a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar "*in natura*" foi importante para que houvesse conhecimento da quantidade de açúcares presentes nesta matéria-prima tendo como base a sua liberação/conversão no hidrolisado hemicelulósico.

## 5.4 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após etapa de pré-tratamento ácido e submetido ao processo de concentração a vácuo.

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi obtido por meio de um pré-tratamento empregando ácido sulfúrico diluído conforme descrito no item 4.2.1

A tabela 5.3 apresenta as concentrações das substâncias presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido a partir de uma etapa de pré-tratamento e após ser submetido ao processo de concentração a vácuo que reduziu o hidrolisado original para 1/5 do volume inicial conforme descrito no item 4.2.2. De acordo com os dados obtidos, a etapa de pré-tratamento forneceu um hidrolisado hemicelulósico com um teor significativo de xilose (14,19 g/L), porém com baixo teor de glicose (1,52 g/L) e de arabinose (1,43 g/L). O ácido acético também apresentou uma baixa concentração, de

cerca de 0,85 g/L. Estes valores foram inferiores aos reportados por Rodrigues et al. (2010) que após uma etapa de pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar obtiveram cerca de 19,19 g/L de xilose, 1,82 g/L de arabinose, 3,49 g/L de ácido acético, com exceção da glicose, na qual, estes pesquisadores obtiveram uma concentração menor, de cerca de 0,89 g/L.

**Tabela 5.3** Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e concentrado 5X*.

| Componente (g/L) | Hidrolisado hemicelulósico sem concentrar | Hidrolisado hemicelulósico concentrado 5X |
|---|---|---|
| Xilose | 14,19 | 69,65 |
| Glicose | 1,52 | 7,32 |
| Arabinose | 1,43 | 7,08 |
| Acido Acético | 0,85 | 3,15 |
| Furfural | 0,2820 | 0,1680 |
| HMF | 0,0149 | 0,0378 |
| Fenóis | 3,13 | 8,87 |
| **pH** | 0,99 | 0,24 |

*O hidrolisado original sofreu redução para 1/5 do volume inicial.

A glicose obtida por meio da etapa de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar pode ter sido liberada tanto da hemicelulose, quanto da celulose. Porém, a celulose não é geralmente hidrolisada nas condições operacionais comumente utilizadas por este tipo de processo. Desse modo, a glicose obtida procedeu em maior parte da fração hemicelulósica (AGUILAR et al., 2002).

A xilose e a arabinose são os açúcares provenientes da hidrólise da fração correspondente à hemicelulose, assim como o ácido acético que é derivado da hidrólise dos grupos acetil ligados aos monômeros desta macromolécula e liberado no hidrolisado hemicelulósico (ALMEIDA et al., 2007; ELSHAHED, 2010; MAMMAN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). A xilose é também o açúcar com maior concentração no hidrolisado hemicelulósico devido a considerável parcela de xilana presente na hemicelulose (AGUILAR et al., 2002). Deste modo, a xilose é o açúcar predominante da hemicelulose total, enquanto a arabinose e a glicose estão presentes em menores concentrações (BRIENZO et al., 2009).

As concentrações de HMF (0,0149 g/L) e de furfural (0,2820 g/L) no hidrolisado hemicelulósico foram relativamente baixas, totalizando 0,2969 g/L de derivados de furano, diferente do valor obtido por Chandel et al. (2007) que foi de 1,89 g/L. As concentrações

destes compostos no hidrolisado hemicelulósico podem variar de acordo com as condições de pré-tratamento empregadas, sendo que condições mais severas de hidrólise acarretam concentrações mais elevadas de derivados de furano, uma vez que estes são provenientes da desidratação de pentoses e de hexoses. (ALMEIDA et al., 2009; LAVARACK et al., 2002; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; OKUDA et al., 2008).

Para esta etapa de pré-tratamento ácido, a concentração de fenóis no hidrolisado hemicelulósico foi semelhante (3,13 g/L) a de outros trabalhos como o de Fonseca (2009) que obteve 3,52 g/L. O valor obtido neste trabalho está relacionado à parcela de lignina total presente no bagaço de cana-de-açúcar que foi parcialmente solubilizado em concordância à hemicelulose durante o pré-tratamento ácido (PANDEY et al., 2000). A solubilização da lignina origina os mais variados tipos de compostos fenólicos que são liberados no hidrolisado hemicelulósico tais como o 4-hidroxibenzaldeído, a vanilina, o siringaldeído, o ácido vanílico, o ácido siríngico, o catecol, o guaiacol, o ácido ferúlico, entre outros (DOMINGUEZ, 2003; KOOPMAN et al., 2010; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

O processo de concentração a vácuo é essencial para elevar a concentração de açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico para utilização em processos fermentativos (RODRIGUES et al., 2001). De acordo com o fator de concentração a que o hidrolisado hemicelulósico foi submetido, constatou-se que a concentração dos açúcares (xilose, glicose e arabinose) aumentou em concordância ao fator de concentração empregado (cinco vezes). O ácido acético, HMF, furfural e fenóis, por sua vez, não apresentaram o mesmo comportamento. O ácido acético teve sua concentração elevada, mas não de acordo com o fator de concentração o que pode estar relacionado à volatilidade parcial deste composto. O mesmo ocorreu com o HMF e os fenóis, o que sugere uma volatilização parcial e/ou degradação destes compostos. O furfural, por outro lado, apresentou uma redução na sua concentração, devido à volatilidade deste composto. O pH do hidrolisado hemicelulósico também diminuiu, uma vez que o processo de concentração a vácuo concentra os íons $H^+$, reduzindo consequentemente o valor do pH do hidrolisado (CARVALHO et al., 2006; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; PARAJÓ et al., 1997).

A caracterização do hidrolisado hemicelulósico após a etapa de pré-tratamento e depois do processo de concentração a vácuo foi importante para um melhor conhecimento das concentrações dos açúcares presentes no hidrolisado, assim como de HMF, furfural, ácido acético e fenóis. Além disso, a caracterização após o processo de concentração possibilita estudar o comportamento dos diferentes constituintes do hidrolisado

hemicelulósico quando submetidos a este processo, assim como a concentração final que foi obtida para cada um dos compostos tóxicos e açúcares para que se então iniciasse os testes de destoxificação biológica.

## 5.5 Teste de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

### 5.5.1 Remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico utilizando planejamento fatorial completo $2^2$ com três repetições no ponto central.

As tabelas 5.4 e 5.5 apresentam as concentrações inicial e final em g/L dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico antes e após a etapa de tratamento biológico empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a de todos os experimentos realizados.

Pode-se constatar que a concentração inicial de HMF variou de 0,037 g/L a 0,032 g/L, a de furfural de 0,140 g/L a 0,015 g/L, a de ácido acético de 2,09 g/L a 1,12 g/L e de fenóis de 6,51 g/L a 5,27 g/L (tabela 5.4). Observou-se que as concentrações iniciais dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico foram próximas entre si para os experimentos realizados.

**Tabela 5.4** Concentração inicial e final dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico tratado biologicamente por *Issatchenkia occidentalis* M1 em g/L.

| Exp. | Concentração | HMF (g/L) | Furfural (g/L) | Ác. Acético (g/L) | Fenóis (g/L) | Concentração total (g/L)* | Total de remoção (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Inicial | 0,0364 | 0,1402 | 1,30 | 6,373 | 7,850 | 19,43 |
| | Final | 0,0297 | 0,1256 | 0,91 | 5,260 | 6,325 | |
| **2** | Inicial | 0,0324 | 0,0153 | 1,47 | 6,040 | 7,557 | 22,87 |
| | Final | 0,0020 | 0,0043 | 1,20 | 4,623 | 5,829 | |
| **3** | Inicial | 0,0371 | 0,1135 | 1,12 | 6,510 | 7,781 | 36,29 |
| | Final | 0,0005 | 0,0065 | 0 | 4,950 | 4,957 | |
| **4** | Inicial | 0,0320 | 0,0925 | 1,42 | 6,410 | 7,954 | 42,89 |
| | Final | 0,0017 | 0,0007 | 0 | 4,540 | 4,542 | |
| **5** | Inicial | 0,0341 | 0,1359 | 2,06 | 5,310 | 7,538 | 39,52 |
| | Final | 0,0020 | 0,0070 | 0 | 4,550 | 4,559 | |
| **6** | Inicial | 0,0341 | 0,1284 | 2,04 | 5,356 | 7,562 | 39,98 |
| | Final | 0,0020 | 0,0070 | 0 | 4,530 | 4,539 | |
| **7** | Inicial | 0,0335 | 0,1229 | 2,09 | 5,270 | 7,521 | 39,01 |
| | Final | 0,0020 | 0,0050 | 0 | 4,580 | 4,587 | |

*A concentração total (g/L) refere-se a somatória das concentrações de HMF, furfural, ácido acético e fenóis.
**O total de remoção (%) faz referência a diferença na concentração inicial e final da concentração total (g/L) em porcentagem.

Em relação aos experimentos conduzidos com a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a constatou-se que a concentração inicial de HMF variou de 0,037 g/L a 0,032 g/L, de furfural de 0,144 g/L a 0,058 g/L, de ácido acético de 2,13 g/L a 1,02 g/L e de fenóis de 6,52 g/L a 5,63 g/L (tabela 5.5). Semelhantemente ao observado nos experimentos realizados com a estirpe M1, as concentrações iniciais de todos os compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico foram parecidas.

**Tabela 5.5** Concentração inicial e final dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico tratado biologicamente por *Issatchenkia occidentalis* Y1'a em g/L.

| Exp. | Concentração | HMF (g/L) | Furfural (g/L) | Ác. Acético (g/L) | Fenóis (g/L) | Concentração total (g/L)* | Total de remoção (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Inicial | 0,0370 | 0,1443 | 1,02 | 6,495 | 7,696 | 17,69 |
| | Final | 0,0350 | 0,0293 | 0,92 | 5,350 | 6,334 | |
| 2 | Inicial | 0,0322 | 0,0575 | 1,57 | 6,020 | 7,679 | 20,50 |
| | Final | 0,0018 | 0,0035 | 1,33 | 4,770 | 6,105 | |
| 3 | Inicial | 0,0370 | 0,1283 | 2,13 | 6,520 | 8,815 | 46,04 |
| | Final | 0,0009 | 0,0051 | 0 | 4,750 | 4,755 | |
| 4 | Inicial | 0,0317 | 0,1002 | 1,43 | 5,900 | 7,462 | 38,97 |
| | Final | 0,0015 | 0,0020 | 0 | 4,550 | 4,553 | |
| 5 | Inicial | 0,0340 | 0,1394 | 2,02 | 5,690 | 7,882 | 43,08 |
| | Final | 0,0016 | 0,0050 | 0 | 4,480 | 4,486 | |
| 6 | Inicial | 0,0347 | 0,1415 | 2,04 | 5,630 | 7,842 | 42,79 |
| | Final | 0,0016 | 0,0049 | 0 | 4,480 | 4,486 | |
| 7 | Inicial | 0,0340 | 0,1374 | 1,90 | 5,700 | 7,769 | 42,41 |
| | Final | 0,0015 | 0,0031 | 0 | 4,470 | 4,474 | |

*A concentração total (g/L) refere-se a somatória das concentrações de HMF, furfural, ácido acético e fenóis.
**O total de remoção (%) faz referência a diferença na concentração inicial e final da concentração total (g/L) em porcentagem.

Os resultados dos experimentos realizados referentes à remoção dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em porcentagem (%) são apresentados nas figuras 5.3 e 5.4 para as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

Em relação à tabela 5.4 e a figura 5.3 que fazem alusão a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 foi possível constatar que o experimento 4 (pH 5,0 e 300 rpm) foi o que proporcionou a remoção total mais significativa destes compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico, cerca de 42,89%. Este experimento permitiu que a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 removesse concentrações expressivas de HMF (94,77%), de furfural (99,19%), de fenóis (29,17%) e a completa eliminação do ácido acético (100%). Por outro lado, ao se analisar a tabela 5.5 e a figura 5.4 referente à estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a foi possível verificar um melhor desempenho na remoção total destes compostos tóxicos no experimento 3 (pH 4,0 e 300rpm), cerca de 46,04%, dos quais se removeu concentrações significativas de HMF (97,68%), de furfural (96,06%), de fenóis (27,15%) e de ácido acético (100%).

No experimento 3 (pH 4,0 e 300 rpm) para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 e no experimento 4 (pH 5,0 e 300 rpm) para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a também foi possível observar uma considerável remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico. No experimento 3 (pH 4,0 e 300 rpm) para a estirpe M1, cerca de 98,57% de HMF; 94,27% de furfural; 23,96% de fenóis e 100% de ácido acético foram removidos do hidrolisado hemicelulósico, totalizando 36,29% de remoção total. No experimento 4 (pH 5,0 e 300 rpm) para a estirpe Y1'a cerca de 95,24% de HMF; 97,96% de furfural, 22,88% de fenóis e 100% de ácido acético foram removidos do hidrolisado hemicelulósico, perfazendo 38,97% de remoção total.

Os experimentos 1 (pH 4,0 e 100 rpm) e 2 (pH 5,0 e 100 rpm) foram os que apresentaram uma remoção total pouco significativa dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. No experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm), obteve-se uma remoção pouco significativa de HMF (18,47%), furfural (10,45%), ácido acético (30,0%) e fenóis (17,48), totalizando 19,43% de remoção total pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1; e para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a foram observados resultados de remoção pouco expressivos de HMF (5,56%), ácido acético (9,80%) e fenóis (17,63%), com exceção do furfural (79,66%), perfazendo 17,69% de remoção total. No experimento 2 (pH 5,0 e 100 rpm), por outro lado, apesar de pouco significativa a remoção total destes compostos tóxicos, cerca de 22,87% para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 e de 20,50% para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a, os derivados de furanos foram removidos de maneira significativa. Cerca de 93,73% de HMF e 71,83% de furfural pela estirpe M1; e de aproximadamente 94,34% de HMF e 93,92% de furfural pela estirpe Y1'a. As porcentagens de remoção de fenóis foram representativas perfazendo cerca 23,46% para a estirpe M1 e 20,76% para a estirpe Y1'a. O ácido acético foi insuficientemente removido pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis,* apenas 18,37% pela M1 e 15,59% pela Y1'a.

Os experimentos 5, 6 e 7 (referentes ao ponto central - pH 4,5 e 200 rpm) apresentaram uma remoção total considerável dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico para ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. Nestes experimentos, o ácido acético foi completamente removido; o HMF e o furfural tiveram suas concentrações reduzidas em aproximadamente 94% ou mais; e a remoção dos fenóis ultrapassou os 13% para a estirpe M1 e os 20% para a estirpe Y1'a.

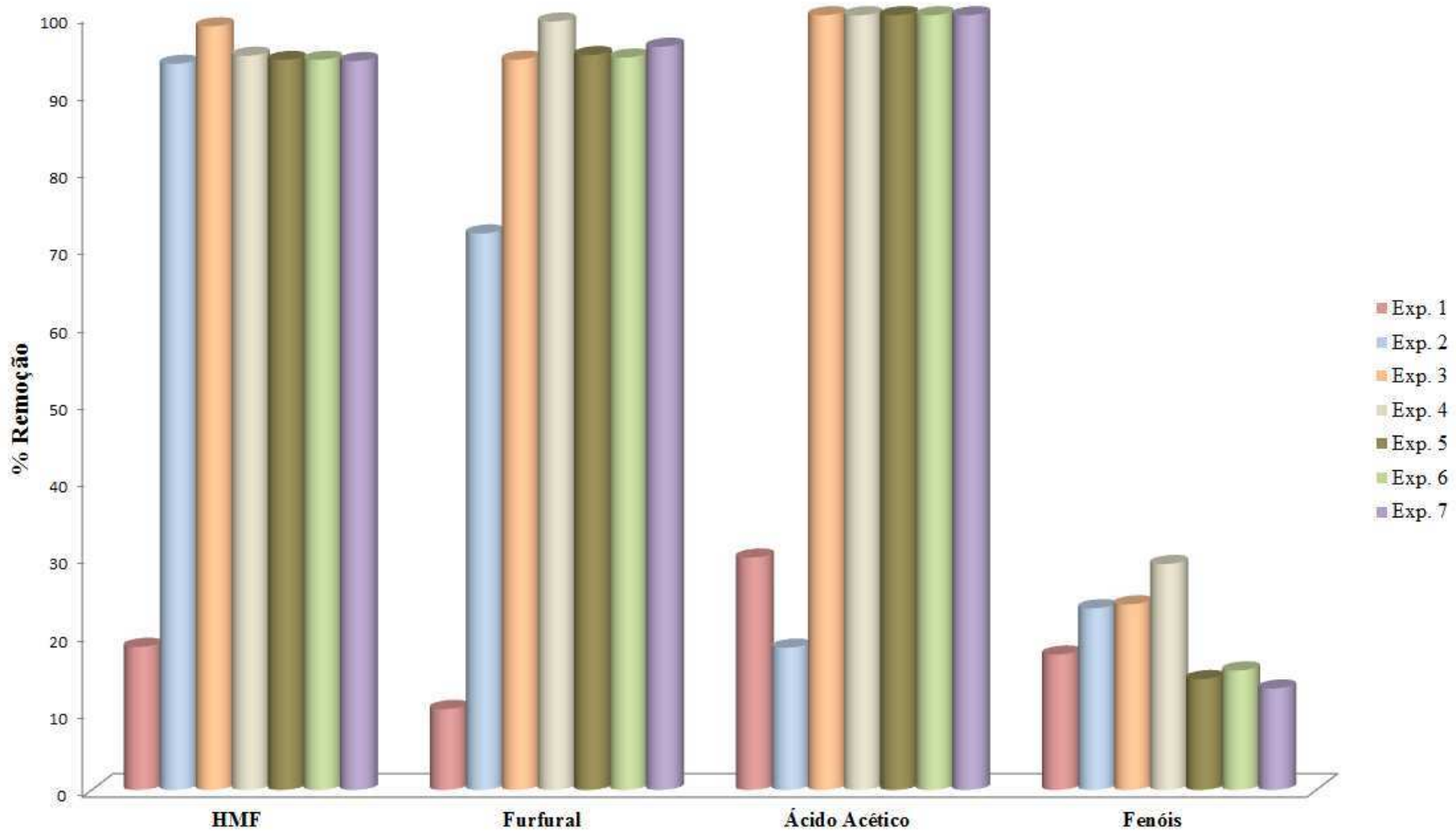



**Figura 5.3** Porcentagem (%) da remoção de compostos tóxicos após 96 horas de tratamento biológico por *Issatchenkia occidentalis* M1.

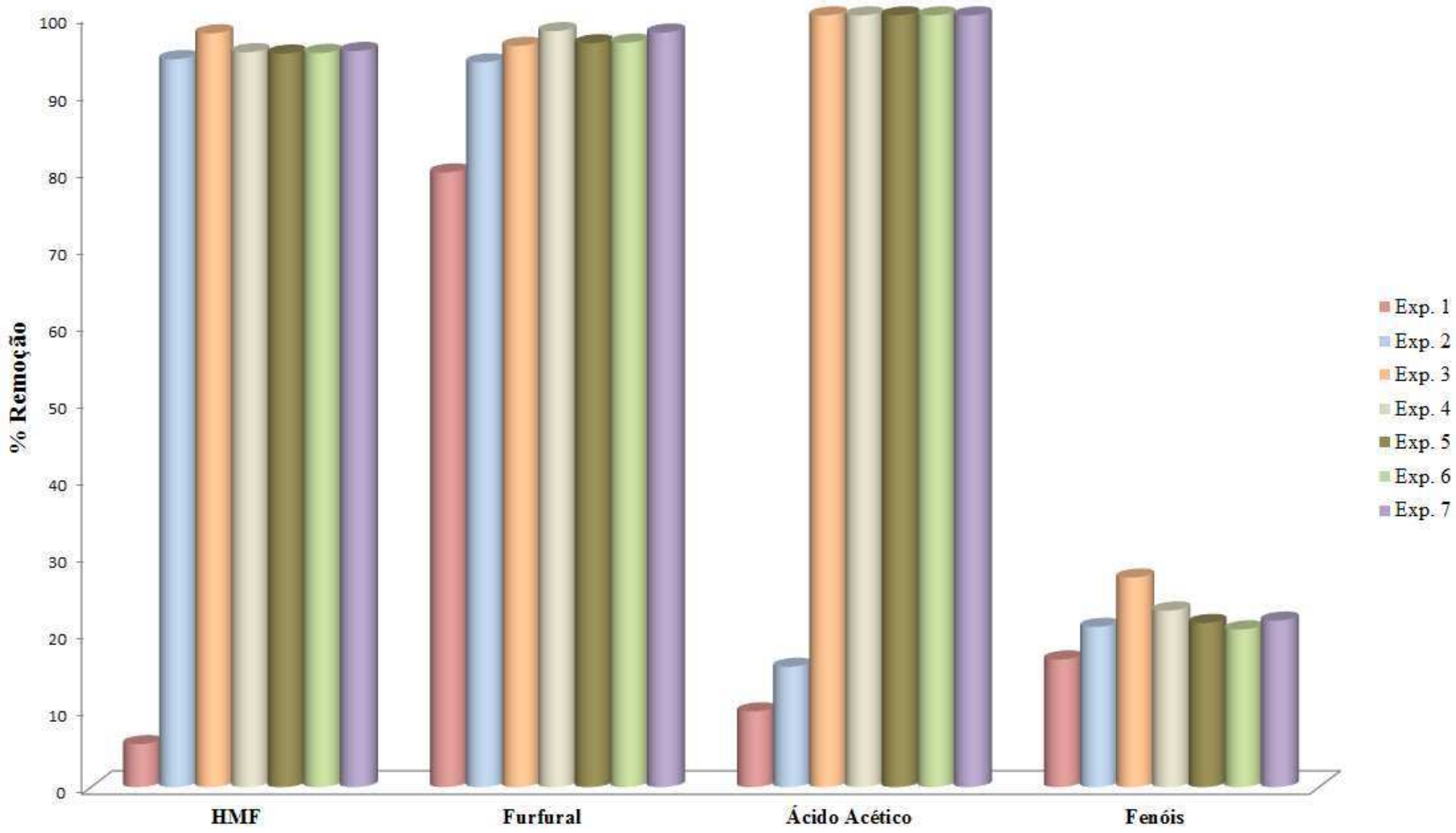



**Figura 5.4** Porcentagem (%) da remoção de compostos tóxicos após 96 horas de tratamento biológico por *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

Comparando-se este tratamento biológico empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a com o de Hou-Rui et al. (2009) que utilizaram a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 2006097 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi possível observar que esta estirpe foi capaz de remover 100% de 2,0 g/L de ácido acético e 100% de 0,02 g/L de furfural em 48 horas de processo a 200 rpm de agitação do sistema. Por outro lado, Fonseca et al. (2011) ao empregaram a mesma levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 2006097 que Hou-Rui et al. (2009) para a remoção de compostos tóxicos presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram uma remoção de 6,1% de 3,3 g/L de ácido acético, 100% de 0,02 g/L de HMF e 100% de 0,016 g/L de furfural após 72 de tratamento biológico em hidrolisado hemicelulósico com pH ajustado a 5,5 a 200 rpm de agitação do sistema. Estes resultados revelaram que a levedura *Issatchenkia occidentalis* teve grande potencial na remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e que os resultados relatados neste trabalho estão em concordância com aqueles reportados pela literatura. Porém, este trabalho se destacou por demonstrar que estas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a foram capazes de consumir quantidades reduzidas dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico.

É importante salientar que a remoção de HMF e furfural não está relacionada somente ao tipo de micro-organismo empregado no processo, mas também ao tipo de subproduto agrícola (bagaço de cana-de-açúcar, casca de café entre outros) utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico. Os diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos provenientes dos mais distintos materiais lignocelulósicos proporcionam diferentes percentuais de remoção segundo resultados reportados por FONSECA et al. (2011).

A destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a mostrou-se mais promissor que os métodos de destoxificação químicos e físicos. A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico por *overliming* utilizando $Ca(OH)_2$ pode ser capaz de reduzir a concentração dos derivados de furano (HMF e furfural) de 1,33 g/L para 0,59 g/L, porém a concentração de ácido acético se mantém (MARTINEZ et al., 2000). O emprego de carvão ativo em hidrolisado hemicelulósico também pode ser responsável pela remoção de até 38,7% de 1,89 g/L de derivados de furanos, 57,0% de 2,75 g/L de fenóis e 46,8% de 2,4 g/L de ácido acético (CHANDEL et al., 2007).

O emprego de resinas de trocas iônicas pode ser capaz de remover cerca de 63,4% de 1,89 g/L de derivados de furano, 75,8% de 2,75 g/L de compostos fenólicos e 85,2% de 5,45 g/L de ácido acético (CHANDEL et al., 2007), ou até 74% de 5,9 g/L de HMF, 69,0% de 1,0 g/L de furfural e 11% de 2,4g/L de ácido acético (LARSSON et al., 1999). Esses resultados alusivos à remoção destes compostos tóxicos empregando resinas de troca iônica foram extremamente significativos, entretanto o custo atual da resina de troca iônica é relativamente elevado, além disso, esta apresenta algumas dificuldades referentes ao seu manuseio.

A vantagem na remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico por tratamento biológico tem como foco o custo-benefício. Enquanto que em outros métodos de destoxificação são necessários investimentos consideráveis de capital que podem vir acompanhados de resultados poucos significativos, o tratamento biológico apresenta um baixo custo e proporciona resultados relevantes para futuras aplicações industriais.

### 5.5.2 Remoção de derivados de furano presentes no hidrolisado hemicelulósico após processo de destoxificação biológica pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

As figuras 5.5 e 5.6 fazem alusão à remoção dos derivados de furano, HMF e furfural durante 96 horas de tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

Para estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 o experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm) não favoreceu a remoção de HMF e de furfural do hidrolisado hemicelulósico. Porém, nos experimentos 2 (pH 5,0 e 100 rpm), 3 (pH 4,0 e 300 rpm) e 4 (pH 5,0 e 300 rpm), as concentrações de HMF e furfural reduziram-se progressivamente durante as 96 horas de tratamento biológico. Nos experimentos 5, 6 e 7 (referentes ao ponto central - pH 4,5 e 200 rpm) a remoção destes derivados de furano do hidrolisado hemicelulósico também foi extremamente significativa.

Nos experimentos 1, 4, 5, 6 e 7 foi possível observar uma oscilação na concentração dos derivados de furano (HMF e furfural) presentes no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico por *Issatchenkia occidentalis* M1.

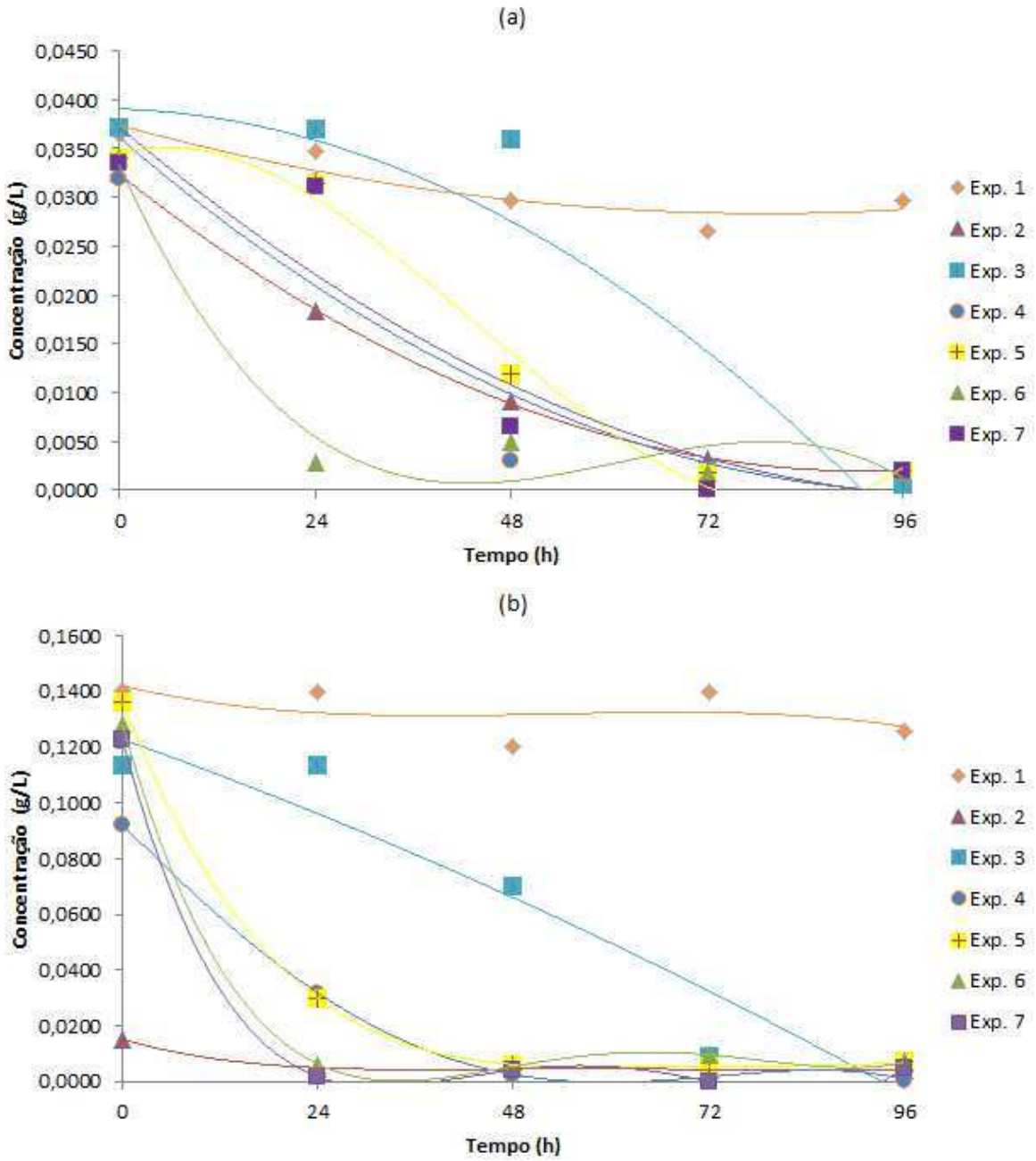



**Figura 5.5** Variação da concentração de HMF (a) e de furfural (b) em um período de 96 horas de tratamento biológico pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1.

No experimento 1, por exemplo, a concentração de furfural as 48 horas foi de 0,1204g/L, porém elevou-se a 0,1400g/L em 72 horas; e a concentração de HMF as 72 horas foi de 0,0265g/L elevando-se progressivamente a 0,0297g/L em 96 horas. Esta oscilação na concentração dos derivados de furano no hidrolisado hemicelulósico pode estar associada à necessidade da levedura de converter, em um primeiro momento, o HMF a álcool hidroximetilfurfurílico e o furfural a álcool furfurílico. Estes álcoois se caracterizam por serem menos prejudiciais ao metabolismo celular ao passo que sua

toxicidade é menor, consequentemente, as concentrações de HMF e de furfural no hidrolisado hemicelulósico são mantidas a níveis baixos, o que beneficia a célula para posteriormente, se utilizá-los como fonte de carbono e de energia, reconvertê-los a HMF e a furfural (ALMEIDA et al., 2009; LIU et al., 2004; TAHERZADEH et al., 2000b; WIERCKX et al., 2010).

Para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a o experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm) mostrou-se pouco significativo na remoção de HMF, porém relevante na remoção de furfural do hidrolisado hemicelulósico. Nos experimentos 2 (pH 5,0 e 100 rpm), 3 (pH 4,0 e 300 rpm) e 4 (pH 5,0 e 300 rpm) houve uma redução progressiva nas concentrações destes derivados de furano durante 96 horas de tratamento biológico, assim como nos experimentos 5, 6 e 7 (referentes ao ponto central - pH 4,5 e 200 rpm) a remoção de HMF e furfural do hidrolisado hemicelulósico também foi significativa.

Nos experimentos 1, 2, 4, 5, 6 e 7, da mesma forma que foi observado para a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1, foi possível constatar uma oscilação na concentração dos derivados de furano (HMF e furfural) no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico por *Issatchenkia occidentalis* Y1'a. No experimento 4, por exemplo, a concentração de HMF foi menor a 48 horas (0,0008g/L) do que a 72 horas (0,0015g/L). A estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a apresentou o mesmo comportamento que a estirpe M1, convertendo o HMF e o furfural em seus álcoois correspondentes que são menos tóxicos ao metabolismo celular, para depois reconvertê-los caso estes sejam utilizados como fonte de carbono e energia (ALMEIDA et al., 2009; LIU et al., 2004; TAHERZADEH et al., 2000b; WIERCKX et al., 2010).

Como alguns estudos têm apontado, as taxas de conversão/remoção de HMF e furfural dependem do consumo de glicose, pois a atividade glicolítica é a responsável pela produção de NADH empregado no processo de conversão (BOOPATHY et al., 1993; TAHERZADEH et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000b). Neste estudo se observou que o consumo de glicose também pode estar relacionado à remoção destes derivados de furano do hidrolisado hemicelulósico. No experimento 1 (pH 4,0 a 100 rpm) para ambas as estirpes *Issatchenkia occidentalis* a remoção de HMF e furfural foi pouco significativa assim como o consumo de glicose.

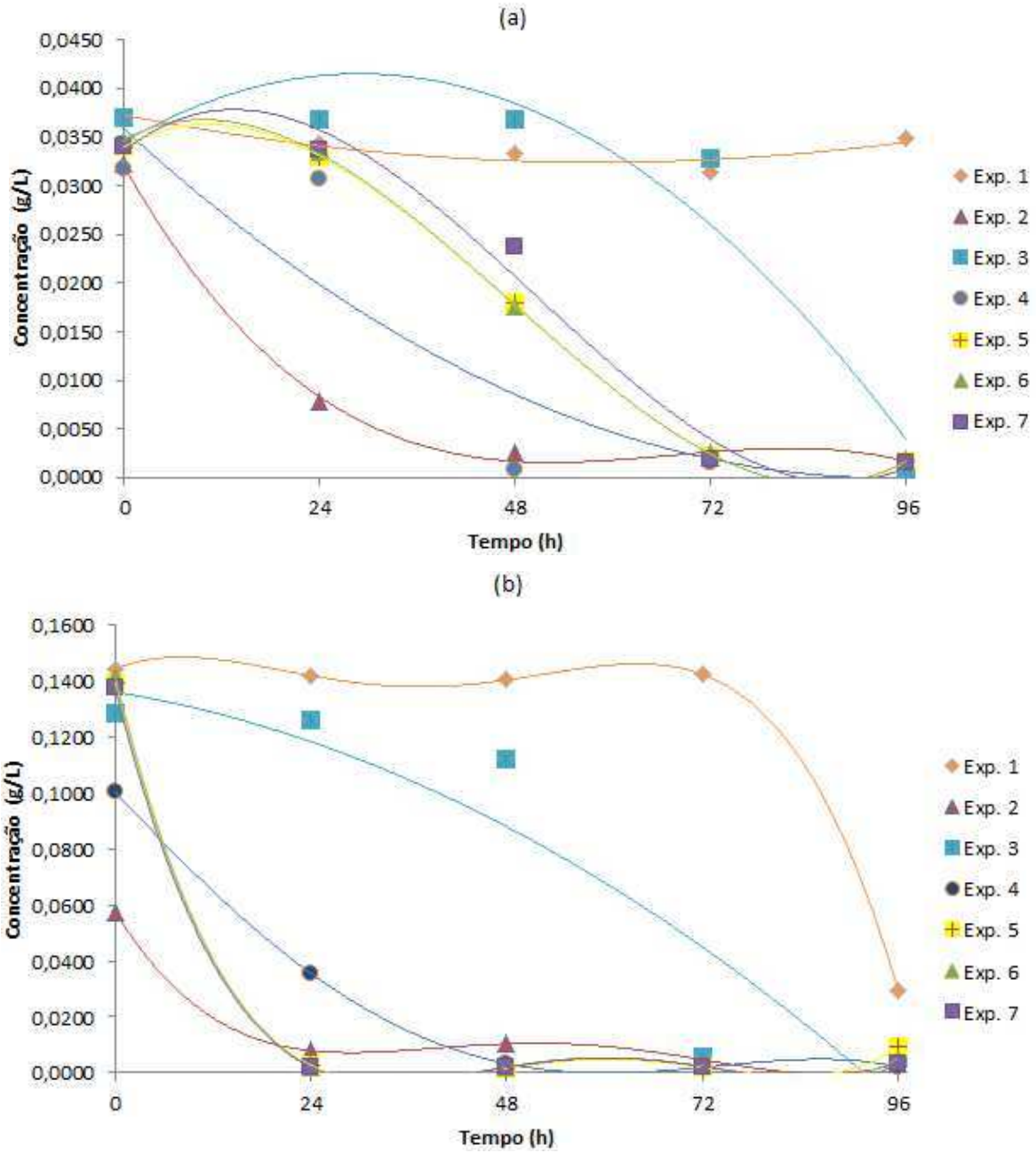



**Figura 5.6** Variação da concentração de HMF (a) e de furfural (b) em um período de 96 horas de tratamento biológico pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

### 5.5.3 Remoção de ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

A figura 5.7 se refere à remoção de ácido acético do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar durante 96 horas de tratamento biológico.

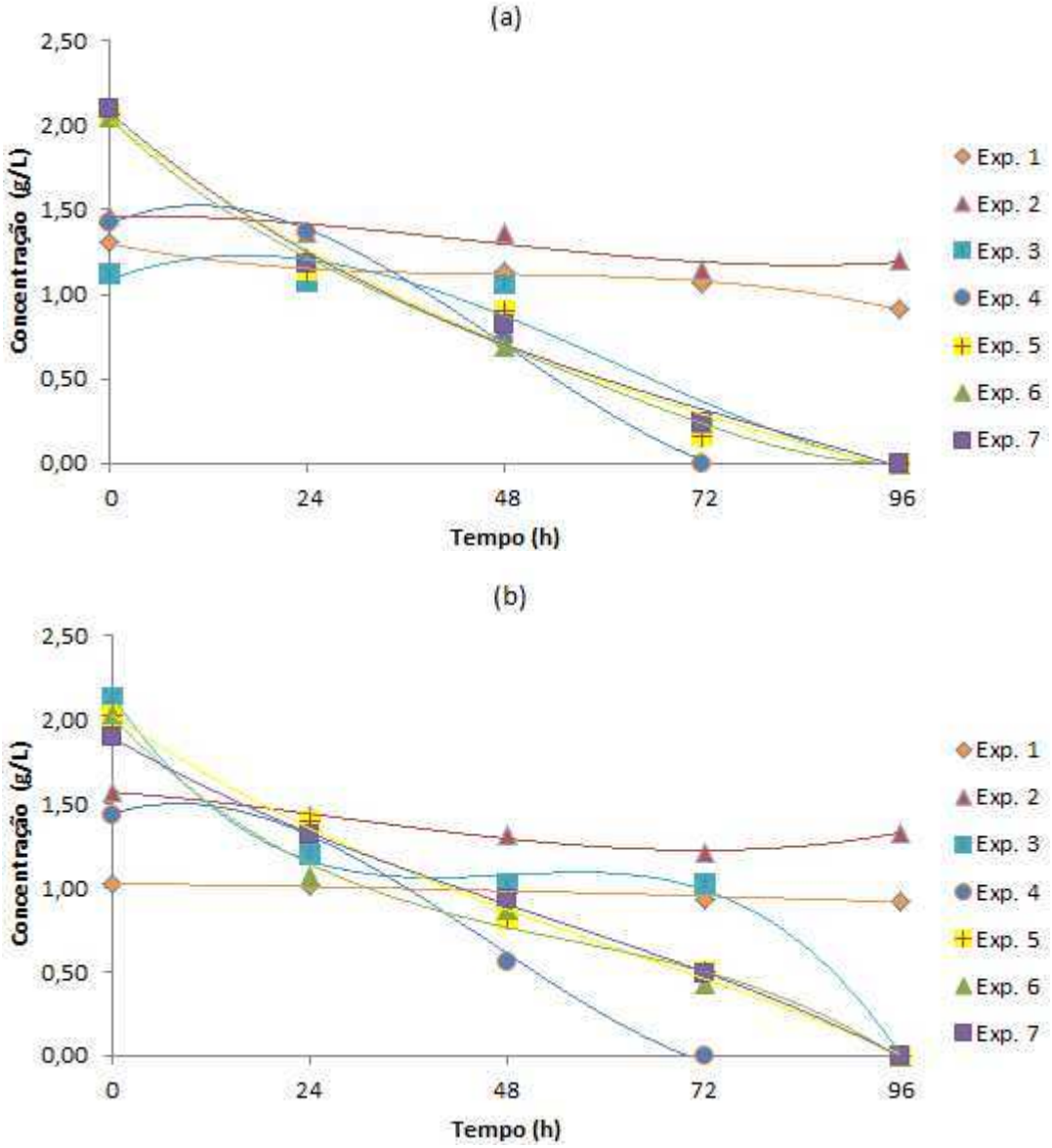



**Figura 5.7** Variação na concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 (a) e Y1'a (b).

Nos experimentos 3 (pH 4,0 e 300 rpm), 4 (pH 5,0 e 300 rpm) e 5, 6 e 7 (referentes ao ponto central - pH 4,5 e 200 rpm) o ácido acético foi completamente removido por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. Destes, no experimento 4 o ácido acético foi completamente consumido antes das 72 horas de tratamento biológico e para os experimentos 4, 5, 6 e 7 antes das 96 horas.

Nos experimentos 1 (pH 4,0 e 100 rpm) e 2 (pH 5,0 e 100 rpm) uma concentração significativa de ácido acético permaneceu no hidrolisado após o tratamento biológico, sendo que somente cerca de 30,0% e 18,37% de ácido acético foram removidos pela

estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 e cerca de 9,80% e 15,59% pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a do hidrolisado hemicelulósico, respectivamente.

O ácido acético é utilizado como fonte de carbono a partir da sua inserção no citoplasma celular e direcionamento ao Ciclo de Krebs que contribui diretamente para a formação de compostos intermediários ao metabolismo celular, energia na forma de ATP e coenzimas como NADH e $FADH_2$. Estas últimas são conduzidas e posteriormente oxidadas pela Cadeia de Transporte de Elétrons levando a formação de ATP que poderá ser utilizado para a formação de biomassa celular (SHERIDAN et al., 1990 apud LIMA et al., 2004). Para as condições de baixa agitação do sistema (100 rpm) a aeração é reduzida, consequentemente conduzindo a um menor fluxo de ácido acético ao Ciclo de Krebs. Nos experimentos 1 e 2, devido a baixa aeração, nem todo ácido acético foi removido pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a, diferente do que aconteceu nos experimentos 3, 4, 5, 6 e 7 para ambas as estirpes, dos quais, o ácido acético foi completamente removido. A agitação do sistema (200 rpm ou 300 rpm) possibilitou uma maior disponibilidade de oxigênio, consequentemente, uma maior concentração de ácido acético foi conduzida ao Ciclo de Krebs, permitindo a geração de energia, coenzimas, ou intermediários de vias metabólicas e formação de biomassa celular.

## 5.6 Concentração celular dos experimentos realizados empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

A figura 5.8 apresenta o crescimento celular das estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a durante 96 horas de tratamento biológico dos experimentos realizados.

No experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm) houve um aumento pouco significativo na concentração celular até 24 horas, seguido de uma estável concentração celular que se prolongou até término do tratamento biológico por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. O experimento 2 (pH 5,0 e 100 rpm), por outro lado, caracterizou-se por um crescimento celular pouco significativo até 24 horas de tratamento seguido de um decréscimo constante na concentração celular que se manteve até o fim do processo, comportamento observado por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*.

O experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm) e o 2 (pH 5,0 e 100 rpm) caracterizaram-se por uma baixa aeração (agitação de 100 rpm) o que é prejudicial ao processo de remoção de ácido acético, pois ao ser assimilado pela levedura, esta necessita de uma concentração considerável de oxigênio no meio para que este ácido seja conduzido ao Ciclo de Krebs e utilizado para a produção de energia e coenzimas. Consequentemente, menos $NAD^+$ é reduzido a NADH, coenzima necessária para o crescimento celular e para a redução de HMF e furfural em seus álcoois correspondentes, álcool hidroximetilfurfurílico e álcool furfurílico, respectivamente. Provavelmente as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a canalizaram estas coenzimas para a redução de HMF e furfural, desfavorecendo o crescimento celular. Além disso, muitos estudos revelaram que para a remoção/assimilação dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico é essencial uma concentração considerável de oxigênio, pois este atuará na oxidação destes compostos, tarefa realizada pelas enzimas do metabolismo celular por meio de vias metabólicas intermediárias que são canalizadas até as vias centrais do metabolismo celular, que levam à formação de intermediários do Ciclo de Krebs (CAO et al., 2009; DOTEN et al., 1987; LIU et al., 2010; KOOPMAN et al., 2010; SHERIDAN et al., 1990 apud LIMA et al., 2004; TAHERZADEH et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000a; TAHERZADEH et al., 2000b).

Nos experimentos 3 (pH 4,0 e 300 rpm) e 4 (pH 5,0 e 300 rpm) as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* apresentaram um aumento na concentração celular durante as 96 horas de tratamento biológico do hidrolisado. Devido a elevada aeração (agitação de 300 rpm) proporcionada, estas leveduras conseguiram remover com maior eficiência o ácido acético, HMF, furfural e os compostos fenólicos. Isso, porque, uma maior concentração de oxigênio no meio provavelmente permitiu uma elevação na concentração de NADH favorecendo a remoção destes compostos tóxicos assim como a produção de biomassa.

Nos experimentos 5, 6, 7 (referentes aos pontos centrais - pH 4,5 e 200 rpm) a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 também apresentou um significativo aumento na concentração celular. Assim como nos experimentos 3 (pH 4,0 e 300 rpm) e 4 (pH 5,0 e 300 rpm) a aeração (agitação de 200 rpm) também favoreceu a remoção dos compostos tóxicos e consequentemente a produção de biomassa celular.

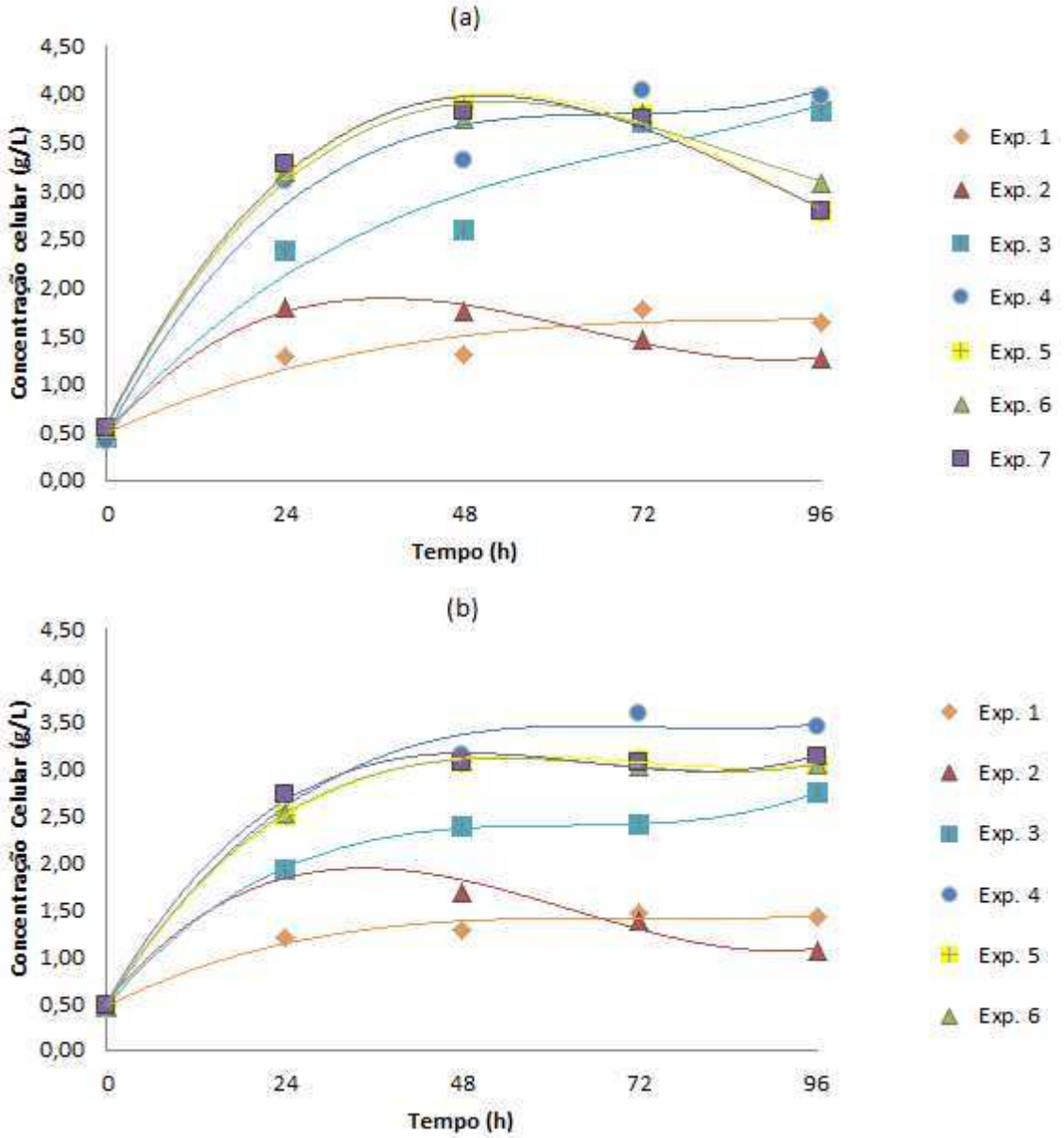



**Figura 5.8** Crescimento celular observado nos experimentos de 1 a 7 durante 96 horas de tratamento biológico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 (a) e Y1'a (b).

Os fatores que podem afetar e/ou prejudicar o crescimento celular são os baixos níveis de NADH disponíveis a célula, devido a redução de HMF e furfural (TAHERZADEH et al., 2000a), os efeitos inibitórios das diferentes combinações de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico (LIU et al., 2004; LOHMEIER-VOGEL et al., 1998; OLIVA et al., 2006; PALMQVIST et al., 1999b) e as altas concentrações de açúcares que podem afetar negativamente os mecanismos de transporte e/ou elevar a pressão osmótica do meio (FONSECA et al., 2011).

## 5.7 Variação de pH nos experimentos realizados empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

A figura 5.9 refere-se à variação de pH do hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico dos experimentos realizados empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

Nos experimentos 1 (pH 4,0 e 100 rpm), 2 (pH 5,0 e 100 rpm), e 3 (pH 4,0 e 300 rpm), para ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*, o pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar reduziu-se progressivamente durante o tratamento biológico. Nos experimentos 1 e 2 o ácido acético não foi completamente removido do hidrolisado hemicelulósico, diferentemente do que ocorreu no experimento 3. Além do próprio ácido acético remanescente, outras substâncias de caráter ácido podem ter sido formadas como intermediários de vias metabólicas periféricas, como por exemplo, o ácido furóico e terem influenciado no valor de pH (DUARTE et al., 2005; PALMQVIST et al., 1999a; TAHERZADEH et al., 2000a). O ácido furóico é o produto da oxidação do furfural e do HMF quando estes são assimilados pelos micro-organismos (KOOPMAN et al., 2010; WIERCKX et al., 2010). Além do ácido furóico, compostos como o ácido lático, ácido málico e ácido siríngico podem ter sido formados e/ ou ter tido suas concentrações majoradas durante o tratamento biológico (PEREIRA et al., 2012). Desse modo, presumiu-se que a redução do pH do hidrolisado hemicelulósico pode estar associada a conversão de substâncias presentes no hidrolisado hemicelulósico em outras substâncias de caráter ácido (OKUDA et al., 2008).

No experimento 4 (pH 5,0 e 300 rpm) houve uma oscilação no valor do pH do hidrolisado hemicelulósico tratado por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. Para este experimento o ácido acético foi totalmente consumido antes das 72 horas de tratamento biológico, o que condiz com a elevação do pH a partir das 24 horas de tratamento. A redução do pH do hidrolisado hemicelulósico após as 72 horas também pode estar relacionada a formação de ácido furóico e/ou de outras substâncias de caráter ácido (KOOPMAN et al., 2010; MODIG et al., 2002; WIERCKX et al., 2010).

Nos experimentos 5, 6 e 7 (referentes aos pontos centrais - pH 4,5 e 100 rpm) o pH do hidrolisado hemicelulósico diminuiu acentuadamente até as primeiras 48 horas e progressivamente se elevou até o término do tratamento biológico, atingindo um valor final de pH superior ao valor inicial. Esta elevação no valor do pH do hidrolisado poderia estar

associada a remoção de ácido acético, assim como de outras substâncias de caráter ácida que poderiam ter sido formadas durante o tratamento biológico.

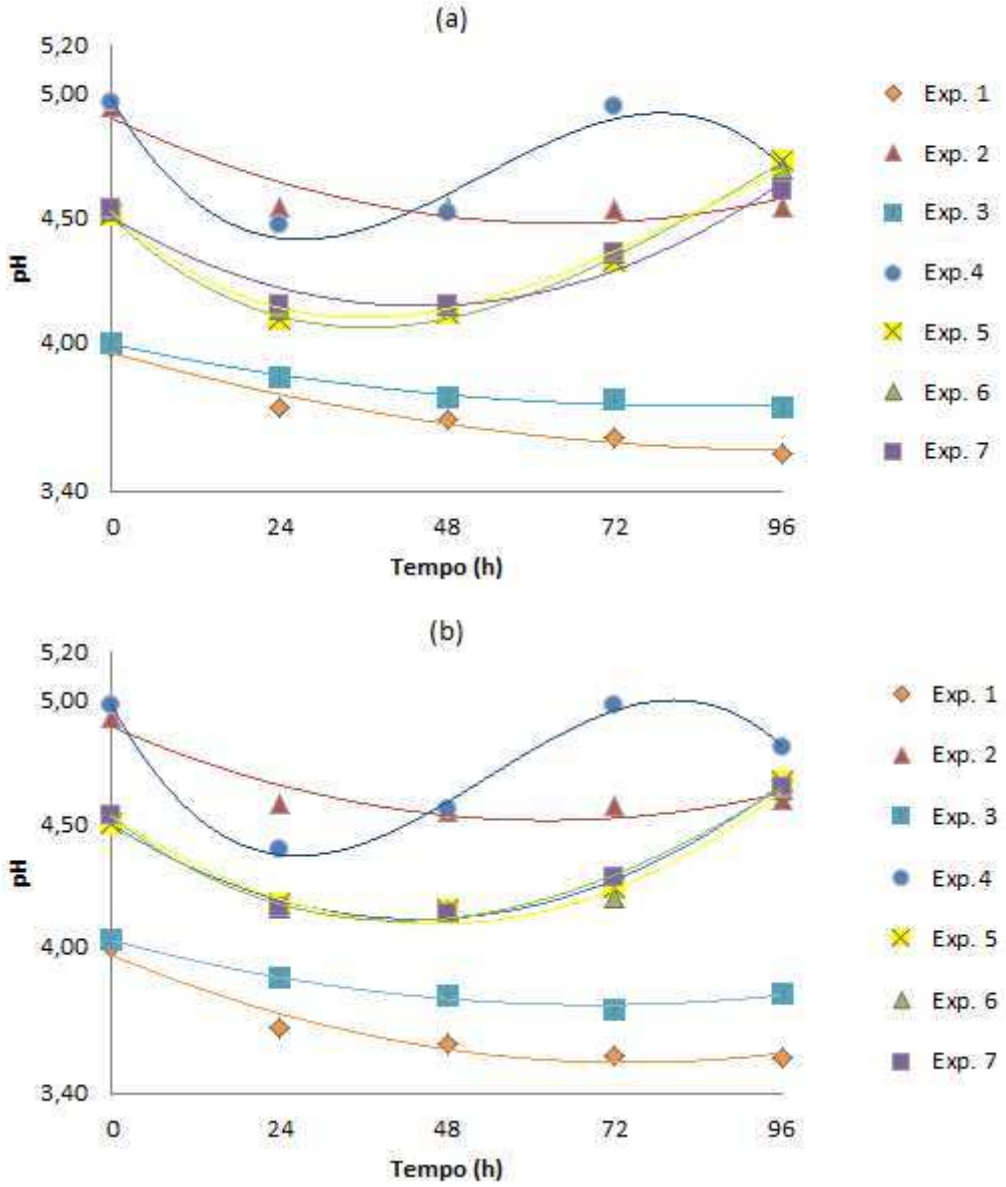



**Figura 5.9** Variação de pH dos experimentos de 1 a 7 durante 96 horas de tratamento pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 (a) e Y1'a (b).

## 5.8 Consumo de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico após o processo de destoxificação biológica pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

As tabelas 5.6 e 5.7 apresentam as concentrações iniciais e finais dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar durante 96 horas de tratamento biológico por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*.

Para os experimentos realizados com a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1, a concentração inicial de glicose variou de 4,35 g/L a 3,30 g/L, a de xilose de 69,20 g/L a 60,54 g/L e a de arabinose de 4,44 g/L a 4,08 g/L. Para os experimentos realizados com a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a a concentração de glicose variou de 5,13 g/L a 3,52 g/L, a de xilose de 68,96 g/L a 60,64 g/L e a de arabinose de 5,35 g/L a 3,77 g/L.

**Tabela 5.6** Concentração inicial e final de açúcares em g/L presentes no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico empregando a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1.

| Exp. | Concentração | Glicose (g/L) | Xilose (g/L) | Arabinose (g/L) | Concentração total (g/L)* | Total de remoção (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Inicial | 3,83 | 67,65 | 4,44 | 75,92 | 2,87 |
| | Final | 3,70 | 65,81 | 4,23 | 73,74 | |
| 2 | Inicial | 4,30 | 64,53 | 4,38 | 73,20 | 6,37 |
| | Final | 0,77 | 63,40 | 4,37 | 68,54 | |
| 3 | Inicial | 4,35 | 62,00 | 4,08 | 70,43 | 9,15 |
| | Final | 0,28 | 59,63 | 4,08 | 63,99 | |
| 4 | Inicial | 3,30 | 60,54 | 4,33 | 68,17 | 10,40 |
| | Final | 0,60 | 56,21 | 4,27 | 61,08 | |
| 5 | Inicial | 3,53 | 68,24 | 4,27 | 76,04 | 8,10 |
| | Final | 0,62 | 65,00 | 4,26 | 69,88 | |
| 6 | Inicial | 3,60 | 69,20 | 4,33 | 77,13 | 9,25 |
| | Final | 0,69 | 65,00 | 4,31 | 70,00 | |
| 7 | Inicial | 3,47 | 68,96 | 4,26 | 76,69 | 7,64 |
| | Final | 0,68 | 65,92 | 4,23 | 70,83 | |

*A concentração total (g/L) refere-se a somatória das concentrações de glicose, xilose e arabinose.

**O total de remoção (%) faz referência a diferença na concentração inicial e final da concentração total (g/L) em porcentagem.

**Tabela 5.7** Concentração inicial e final de açúcares em g/L presentes no hidrolisado hemicelulósico durante 96 horas de tratamento biológico empregando a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

| Exp. | Concentração | Glicose (g/L) | Xilose (g/L) | Arabinose (g/L) | Concentração total (g/L)* | Total de remoção (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | Inicial | 4,07 | 68,96 | 4,34 | 77,37 | 2,12 |
| | Final | 3,98 | 67,41 | 4,34 | 75,73 | |
| **2** | Inicial | 4,01 | 66,44 | 5,35 | 75,80 | 6,07 |
| | Final | 0,20 | 65,76 | 5,25 | 71,21 | |
| **3** | Inicial | 4,27 | 67,35 | 4,50 | 76,12 | 6,83 |
| | Final | 0,27 | 66,36 | 4,30 | 70,92 | |
| **4** | Inicial | 3,52 | 60,64 | 3,77 | 67,93 | 9,67 |
| | Final | 0,12 | 57,62 | 3,62 | 61,36 | |
| **5** | Inicial | 5,13 | 68,22 | 5,34 | 78,69 | 8,64 |
| | Final | 0,52 | 67,00 | 4,37 | 71,89 | |
| **6** | Inicial | 4,99 | 68,77 | 5,21 | 78,97 | 8,33 |
| | Final | 0,55 | 67,35 | 4,48 | 72,39 | |
| **7** | Inicial | 4,24 | 67,70 | 4,22 | 76,16 | 6,80 |
| | Final | 0,47 | 66,30 | 4,21 | 70,98 | |

*A concentração total (g/L) refere-se a somatória das concentrações de glicose, xilose e arabinose.
**O total de remoção (%) faz referência a diferença na concentração inicial e final da concentração total (g/L) em porcentagem.

As figuras 5.10 e 5.11 referem-se ao consumo dos açúcares em porcentagem (%) que estavam presentes no hidrolisado hemicelulósico para cada experimento realizado empregando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

O consumo de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, de modo geral, foi pouco significativo se comparado com as perdas obtidas por outros métodos de destoxificação químicos, físicos e até mesmo biológicos. A glicose foi o açúcar preferencialmente consumido, praticamente em sua totalidade. As estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a também foram capazes de assimilar baixas concentrações de xilose e arabinose.

Para experimentos realizados empregando ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* a glicose presente no hidrolisado hemicelulósico foi praticamente consumida em sua totalidade, com exceção do experimento 1 (pH 4,0 e 100 rpm). Neste experimento, devido a baixa agitação do sistema (100 rpm) ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* não foram capazes de assimilar de forma significativa o açúcar glicose presente no hidrolisado hemicelulósico, deixando de conduzi-lo para a geração de energia

(ATP), coenzimas e formação de biomassa celular. Este experimento também se mostrou desfavorável para a remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico.

O consumo de xilose por ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* foi consideravelmente baixo, o que é de extrema relevância uma vez que a concentração desse açúcar deve ser mantida praticamente inalterada para uma posterior utilização em processos fermentativos realizados por outros tipos de micro-organismos. De forma geral, a estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a consumiu uma concentração menor de xilose em relação à estirpe M1. O consumo de arabinose também foi baixo para os experimentos realizados empregando ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*.

Os métodos de destoxificação, de forma geral, além de removerem os compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico também provocam a perda de açúcares, como os tratamentos que empregam carvão ativo (FRAZER; McCASKEY, 1989) e os que utilizam resinas de troca-aniônica. Esta resina é capaz de remover até 26% dos açúcares totais presentes no hidrolisado hemicelulósico (LARSSON et al., 1999). Por outro lado, para o tratamento biológico do hidrolisado hemicelulósico Okuda et al. (2008) reportaram que *Ureibacillus thermosphaercus* foi capaz de remover menos de 5% dos açúcares totais do hidrolisado hemicelulósico de cascas de madeira, enquanto o tratamento por *overliming* removeu cerca de 10%. Wierckx et al. (2010) também relataram que após 10 horas de cultivo de *Cupriavidus basilenses* HMF 14 em hidrolisado hemicelulósico de palha de milho, os derivados de furanos e o acetato foram completamente removidos e que durante este período as concentrações de glicose, xilose e arabinose, permaneceram inalteradas. Porém, quando estes compostos tóxicos foram completamente consumidos, o teor de açúcar reduziu-se em 11% em 15 horas. Deste modo, a porcentagem de remoção de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* durante o tratamento biológico está de acordo com a faixa de variação relatada pela literatura que é de 5 a 10%.

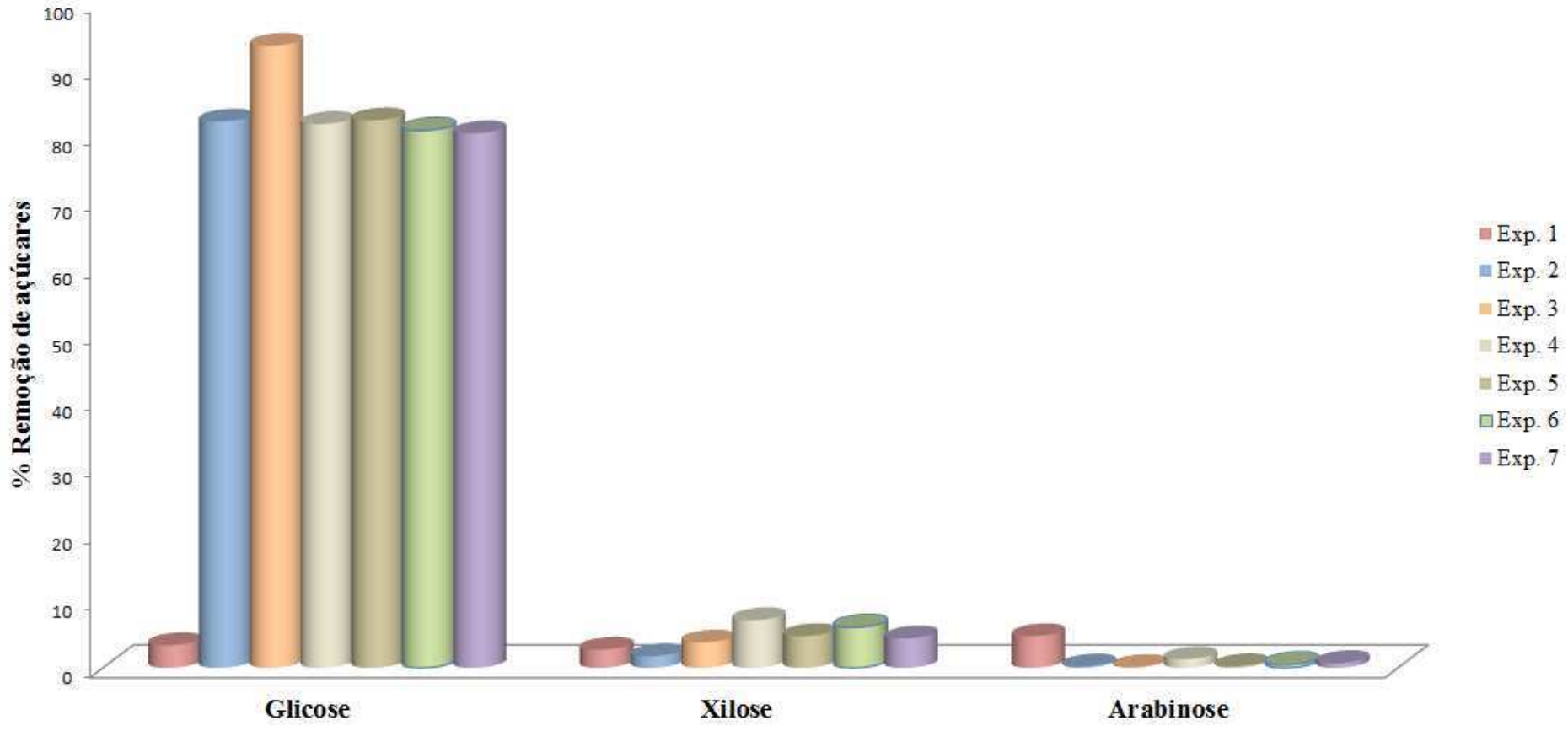



**Figura 5.10** Porcentagem (%) da remoção de açúcares no hidrolisado hemicelulósico tratado por *Issatchenkia occidentalis* M1.

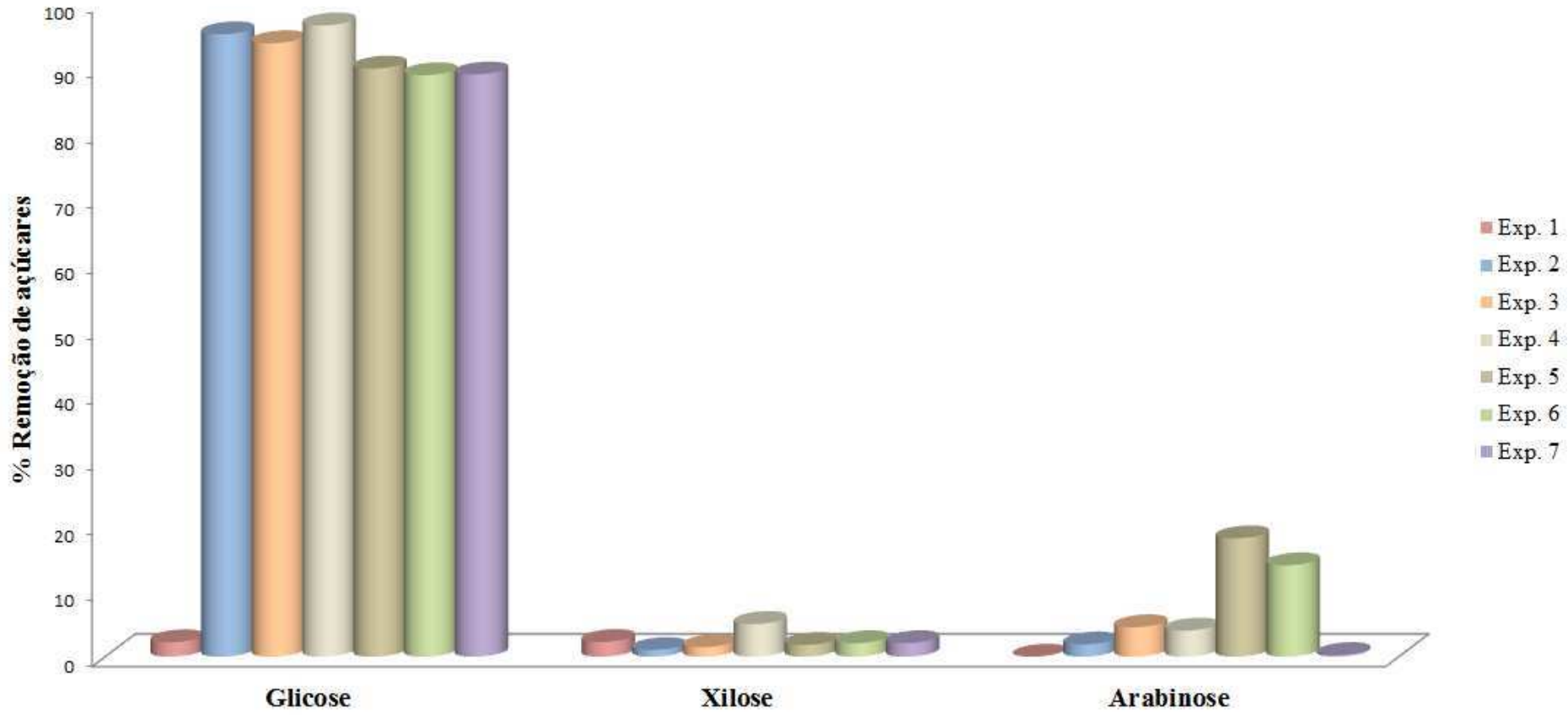



**Figura 5.11** Porcentagem (%) da remoção de açúcares no hidrolisado hemicelulósico tratado por *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

## 5.9 Análise estatística dos dados a partir da matriz de planejamento fatorial $2^2$ com três repetições no ponto central.

Para estabelecer as condições que maximizem a remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* foi necessário inicialmente identificar quais as variáveis que mais exerciam influência sobre a variável resposta. A tabela 5.8 refere-se à matriz do planejamento $2^2$ com três repetições no ponto central empregada neste trabalho. Os fatores independentes, pH ($X_1$) e agitação do sistema em rpm ($X_2$), são demonstrados na forma de níveis codificados e de níveis reais e a variável resposta representa a porcentagem (%) na remoção total dos compostos tóxicos testados (HMF, furfural, ácido acético e fenóis) presentes no hidrolisado hemicelulósico após tratamento biológico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

**Tabela 5.8** Matriz para a remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico pelas estipes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

| Experimentos | Níveis codificados | | Níveis reais | | Remoção de compostos tóxicos (%) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $X_1$ | $X_2$ | $X_1$(pH) | $X_2$ (rpm) | *Issatchenkia occidentalis* M1 | *Issatchenkia occidentalis* Y1'a |
| 1 | - | - | 4,0 | 100 | 19,43 | 17,69 |
| 2 | + | - | 5,0 | 100 | 22,87 | 20,50 |
| 3 | - | + | 4,0 | 300 | 36,29 | 46,04 |
| 4 | + | + | 5,0 | 300 | 42,89 | 38,97 |
| 5 | 0 | 0 | 4,5 | 200 | 39,52 | 43,08 |
| 6 | 0 | 0 | 4,5 | 200 | 39,98 | 42,79 |
| 7 | 0 | 0 | 4,5 | 200 | 39,01 | 42,41 |

O diagrama de Pareto apresentado na figura 5.12 para as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a apresenta o valor absoluto dos efeitos dos fatores e foi utilizado para examinar o efeito das variáveis e de suas interações na remoção dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico bagaço de cana-de-açúcar de acordo com o planejamento fatorial empregado. De acordo com o diagrama de Pareto somente o fator que se refere à agitação do sistema em rpm ($X_2$) apresentou significância a um nível de 90% e o fator pH ($X_1$) e a interação ($X_1.X_2$) não apresentaram significância

para ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. A variável agitação do sistema em rpm ($X_2$) agiu positivamente na remoção dos compostos tóxicos.

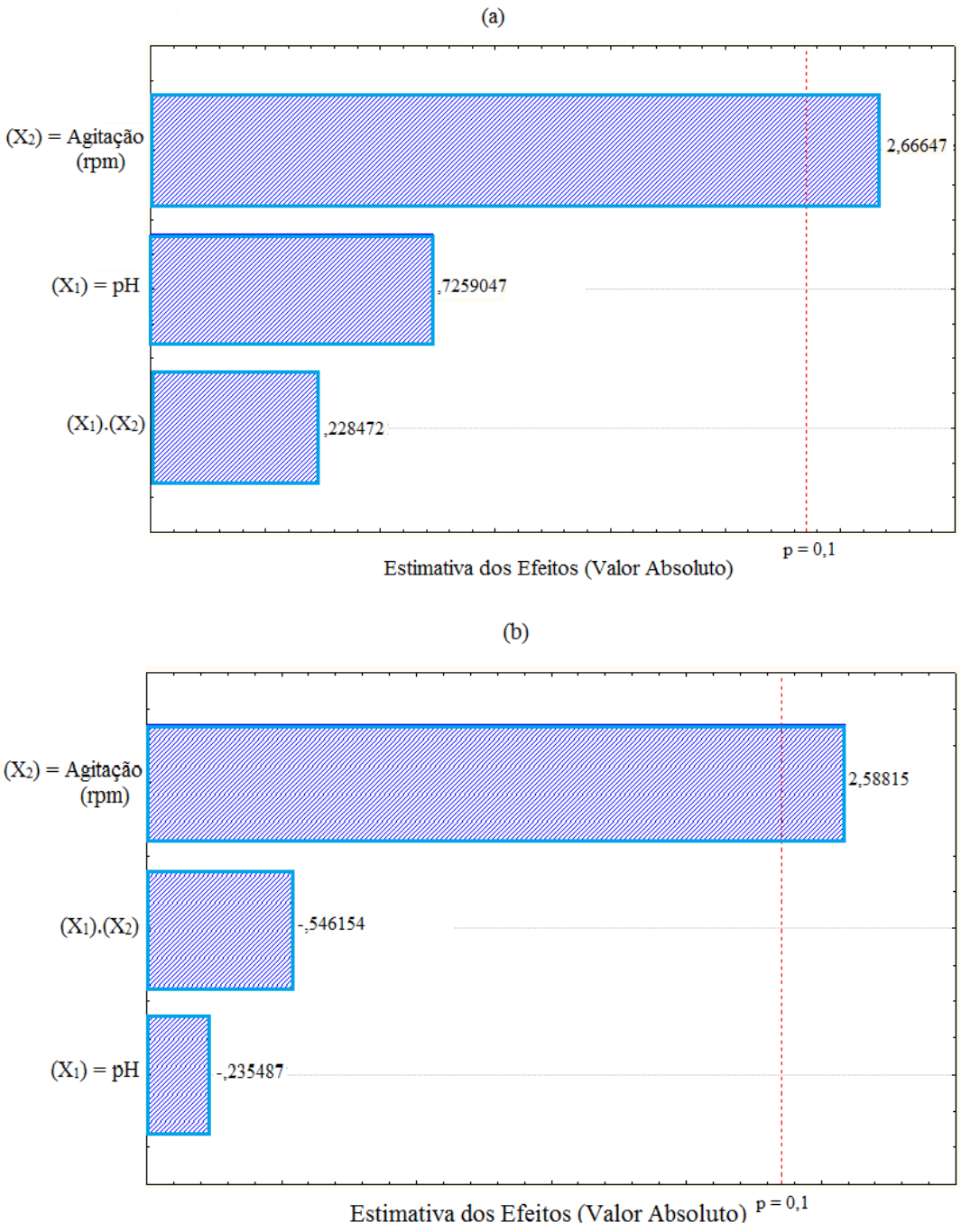



**Figura 5.12** Diagrama de Pareto representando os efeitos estimados das variáveis e suas interações para um nível de confiança de 90% (p = 0,1) para a remoção de compostos tóxicos pela pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1(a) e Y1'a (b).

Estes resultados estão em concordância com aqueles já reportados nestes trabalhos que demonstraram que os experimentos que apresentaram as maiores taxas de remoção

total dos compostos tóxicos testados foram os que apresentaram uma agitação do sistema de 200 rpm ou 300 rpm, que proporcionou uma maior aeração. Por outro lado, o pH pouco influenciou o processo de destoxificação. Isso pode estar relacionada à pequena faixa de variação de pH selecionada para este estudo.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar a significância estatística das variáveis e suas interações sobre a remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 (tabela 5.9) e Y1'a (tabela 5.10) a um nível de 90% de confiança ($p \leq 0,1$).

**Tabela 5.9** Análise de Variância (ANOVA) para a remoção dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico pela estirpe *Issatchenkia occidentalis* M1 de acordo com o planejamento fatorial $2^2$ com três repetições no ponto central.

| Fatores e Interações | Soma dos Quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor de F | Valor de P |
|---|---|---|---|---|---|
| pH ($X_1$) | 25,2004 | 1 | 25,2004 | 0,526938 | 0,520402* |
| Agitação ($X_2$) | 340,0336 | 1 | 340,0336 | 7,110065 | 0,075918 |
| ($X_1.X_2$) | 2,4964 | 1 | 2,4964 | 0,052199 | 0,833967* |
| **Erro Total** | 143,4728 | 3 | 47,8243 | | |
| **Total** | 511,2032 | 6 | | | |

*Fatores e interações não significativas.

**Tabela 5.10** Análise de Variância (ANOVA) para a remoção dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico pela estirpe *Issatchenkia occidentalis* Y1'a de acordo com o planejamento fatorial $2^2$ com três repetições no ponto central.

| Fatores e Interações | Soma dos Quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor de F | Valor de P |
|---|---|---|---|---|---|
| pH ($X_1$) | 4,5369 | 1 | 4,5369 | 0,055454 | 0,828990* |
| Agitação ($X_2$) | 548,0281 | 1 | 548,0281 | 6,698519 | 0,081204 |
| ($X_1.X_2$) | 24,4036 | 1 | 24,4036 | 0,298284 | 0,622956* |
| **Erro Total** | 245,4400 | 3 | 81,8133 | | |
| **Total** | 822,4086 | 6 | | | |

*Fatores e interações não significativas.

De acordo com a ANOVA a interação entre pH e agitação do sistema e o fator pH não foram estatisticamente significativos a um nível de 90% de confiança ($p \leq 0,1$). Entretanto a agitação do sistema demonstrou ser significativa para a remoção de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico.

A figura 5.13 apresenta a superfície de resposta referente à remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a.

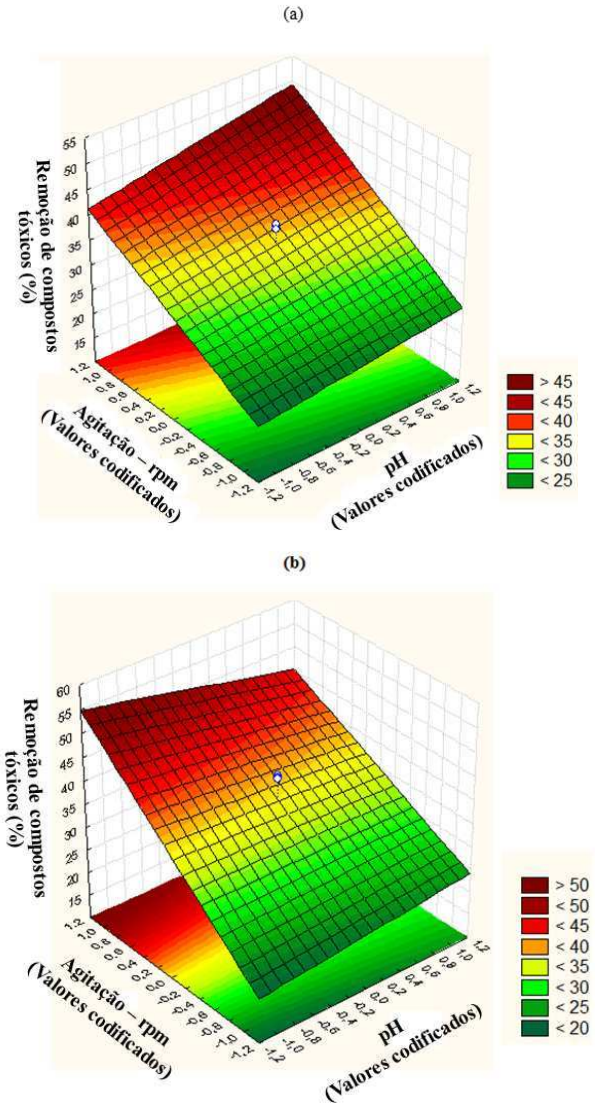



**Figura 5.13** Superfície de resposta para os modelos propostos para a remoção de compostos tóxicos (%) presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 (a) e Y1'a (b).

Pode-se constatar que o valor máximo para a remoção dos compostos tóxicos (%) pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* M1 foi obtido quando se ajustaram as variáveis, pH e agitação, para o nível positivo. Em contrapartida, o valor máximo para a remoção dos compostos tóxicos (%) pela estirpe de *Issatchenkia occidentalis* Y1'a foi atingido quando a agitação foi ajustada para o nível positivo e o pH para o nível negativo.

Esta análise estatística permitiu uma visão geral de quais fatores e interações afetaram diretamente o processo de destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico

de bagaço de cana-de-açúcar, além de demonstrar quais são as condições, para ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*, que maximizam este processo.

# 6. CONCLUSÕES

Foi possível selecionar, em meio de cultura sintético, leveduras com o potencial de assimilar alguns dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, destacando as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1, Y1´a, Y1´b, Y3´.

As estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1´a foram as selecionadas para este estudo por apresentarem colônias morfologicamente diferentes e resultados significativos em relação à assimilação de compostos tóxicos em meio de cultura sintético.

A variável independente agitação do sistema (100, 200 ou 300 rpm) foi a que mais contribuiu para a eficiência da remoção dos compostos tóxicos testados presentes no hidrolisado hemicelulósico. Quando a agitação do sistema foi de 200 ou 300 rpm, resultados significativos de remoção foram obtidos, devido a maior aeração, responsável por aumentar os níveis intracelulares de ATP e coenzimas reduzidas, necessários para o processo de conversão dos compostos tóxicos testados (HMF, furfural, ácido acético e fenóis).

A variável independente pH não influenciou de maneira significativa o processo de remoção dos compostos tóxicos testados.

De forma geral, os experimentos 5, 6, 7 (referentes ao ponto central - pH 4,5 e 200rpm) permitiram a obtenção de resultados significativos na remoção de compostos tóxicos para as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1´a.

A estirpe *Issatchenkia occidentalis* Y1´a foi a que apresentou um melhor desempenho, na qual, foi capaz de remover no experimento 3 (pH 4,0 e 300 rpm) cerca de 46,04% dos compostos tóxicos totais, sendo 97,68% de HMF, 96,06% de furfural, 27,15% de fenóis e 100% de ácido acético.

Os resultados menos expressivos na remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico foram aqueles obtidos nos experimentos 1 (pH 4,0 e 100 rpm) e

2 (pH 5,0 e 100 rpm) para ambas as estirpes de *Issatchenkia occidentalis*. Devido à baixa aeração do sistema, níveis insuficientes de ATP e coenzimas reduzidas estavam presentes na célula para a conversão dos compostos tóxicos em substâncias menos tóxicas e/ou assimilação.

Perdas insignificantes de açúcares, principalmente de xilose, foram observadas em todos os experimentos realizados.

# SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Otimizar o processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico empregandos as estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1´a, propondo um modelo estatístico para a remoção dos compostos tóxicos testados (HMF, furfural, ácido acético e fenóis).

Após otimização do processo, estudar o comportamento da levedura *Issatchenkia occidentalis* em processos conduzidos em biorreator.

Estudar a fisiologia celular da levedura *Issatchenkia occidentalis* para verificar se esta levedura é realmente capaz de utilizar alguns compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico como fonte de carbono ou energia, ou se esta levedura somente os converte em compostos menos tóxicos ao seu metabolismo celular.

Avaliar a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis* para posterior fermentação visando à obtenção de bioprodutos de alto valor agregado.

# REFERÊNCIAS

ABRIL, D.; ABRIL, A. Ethanol from lignocellulosic biomass. **Ciencia e Investigácion Agrária**, v.36, n. 2, p. 177-190, 2009.

AGUIAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309-318, 2002.

ALMEIDA, J. R. M.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.82, p.625-638, 2009.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄNH-HAGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.340-349, 2007.

ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation. **J Ferment Technol**, v. 64, p.567–570, 1986.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; McHALE, A. P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p.809-821, 1998.

BARBER, A. R.; HANSSON, H.; PAMMENT, N. B. Acetaldehyde stimulation oh the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of inhibitors found in lignocellulose-to-ethanol fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.104-108, 2000.

BOLL, M.; FUCHS, G.; HEIDER, J. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. **Chemical Biology**, v.6, p.604-611, 2002.

BOOPATHY, R.; BOKANG, H.; DANIELS, L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p.147-150, 1993.

BORNEMAN, W. S.; AKIN, D. E.; VanESELTINE, W. P. Effect of Phenolic Monomers on Ruminal Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.6, p.1331-1339, 1986.

BOYER, L. J.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E., C.; GADDY, J. L. The effects of furfural on ethanol production by Saccharomyces cerevisiae. **Biomass and Bioenergy**, v.3, n.1, p.41-48, 1992.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p.199-204, 2009.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Quim. Nova**, v.27, n.3, p.399-403, 2004.

CANILHA, L.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SOLENZAL, A. I. N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. **Process Biochemistry**, v.39, p.1909-1912, 2004.

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

CAO, B.; KARTHIGA, N.; LOH, K-C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.85, p.207-228, 2009.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4754-4766, 2010.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1325, p.63-70, 1997.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; MORALES, M. L. V.; SOLENZAL, A. I. N. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.863-868, 2004.

CARVALHO, G. B. M.; MUSSATO, S. I.; CÂNDIDO, E. J.; SILVA, J. B. A. Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.152-157, 2006

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeat research**, v.10, p.385-393, 2010.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v.98, p.1947-1950, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.18, n.4, p.295-331, 1998.

CHO, D. H.; LEE, Y. J.; UM, Y.; SANG, B-I. KIM, Y. H. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.83, p.1035-1043, 2009.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar, safra 2011/2012, Terceiro levantamento Dezembro/ 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf Acesso em: 22 Fev. 2012.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.67, p.147-153, 1999.

DELGENES, J. P.; 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 Microb. Technol.**, v.19, p.220-225, 1996.

DEMAIN, A. L. Biosolutions to the energy problem. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p.319-332, 2009.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources**, v.27, p.327-337, 2005.

DOMÍNGUEZ, J. M. L. **Efecto de los productos de degradación originadosen la explosión por vapor de biomassa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus***. Tese (Doutorado) Universidade de Complutense de Madrid. Faculdad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiologia III. Madrid, 2003.

DOTEN, R. C.; NGAI, K.; MITCHELL, D. J.; ORNSTON, L. N. Cloning and genetic organization of the pca gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.3168–3174, 1987.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Effects of Aliphatic Acids, Furfural, and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.413-426, 2005.

ELSHAHED, M. S. Microbiological aspects of biofuel production: Current status and future directions. **Journal of Advanced Research**, v.1, p.103-111, 2010.

ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS letters**, v.224, n.1, p.187-192, 1987.

FENGEL, D.: WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions.** New York: W. De Gruyter, 1989. p. 613.

FONSECA, B. G.; **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena. Depto. de biotecnologia. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial. Lorena. São Paulo, 2009.

FONSECA, B. G.; MOUTTA, R. O.; FERRAZ, F. O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.; HOU-RUI, Z. SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 2006097 yeast. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.38, n.1, p.199-207, 2011

FRAZER, F. R.; McCASKEY, T. A. Wood Hydrolyzate Treatments for Improved Fermentation of Wood Sugars to 2,3-Butanediol. **Biomass**, v.18, p.31-42, 1989.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. **Science**, v.315, p.808-810, 2007.

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. **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1500-1503, 2009.

HARWOOD, C. S.; PARALES, R. E. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self identity. **Annu Rev Microbiol**, v.50, p.553–590, 1996.

HOLYOAK, C. D.; STRATFORD, M.; McMULLIN, Z.; COLE, M. B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A. J. P.; COOTE, P. J. Activity of the Plasma Membrane H1-ATPase and Optimal Glycolytic Flux Are Required for Rapid Adaptation and Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of the Weak-Acid Preservative Sorbic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.9, p.3158-3164, 1996.

HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S. S.; SARROUH, B. F.; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J.; QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Appl. Biochem Biotechnol**, v.152, p.199-212, 2009.

IRANMAHBOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioenergy**, v.22, p.401-404, 2002.

JÖNSSON, L. J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N. O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.49, p.691-697, 1998.

KOENIG, K.; ANDREESEN, J., R. Xanthine Dehydrogenase and 2-Furoyl-Coenzyme A Dehydrogenase from Pseudomonas putida Ful: Two Molybdenum-Containing Dehydrogenases of Novel Structural Composition. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.10, p.5999-6009, 1990.

KOOPMAN, F.; WIERCKX, N.; WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. **PNAS**, v.107, n.11, p.4919-4924, 2010.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose,arabinose,glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p.367-280, 2002.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L. J. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77-79, p.91-103, 1999.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, n.56, p.1-24, 1997.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood Structure and Composition.** New York: Marcel Dekker, 1991. p. 488.

LI, Y.; LI, J.; WANG, C.; WANG, P. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. **Bioresource Technology**, v.101, p.6740-6744, 2010.

LIMA, L. H., A.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; TORRES, F. A. G. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase *in Candida guilliermondii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p.734-738, 2004.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 69, p.627-642, 2006.

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

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

LÓPEZ, M. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J.; BOTHAST, R. J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.64, p.125-131, 2004.

LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, p.125-138, 2002.

MARGESIN, R.; BERGAUER, P.; GANDER, S. Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. **Extremophiles**, v.8, p.201-207, 2004.

MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, No-J.; HWANG, Y., K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xylosederived biochemical. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v.2, p.438-454, 2008.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.372-380, 2009.

MARTINELLI, L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol productions in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, v.18, n.4, p.885-898, 2008.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Effects of $Ca(OH)_2$Treatments ("Overliming") on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, n.5, p.526-536, 2000.

MELO, J. S.; KHOLI, S.; PATWARDHAN, A. W.; SOUZA, S. F. D. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v.40, p.625-628, 2005.

MODIG, T.; LIDÉN, G; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v.363, p.769-776, 2002.

MOHAGHEGHI, A.; RUTH, M.; SCHELL, D. J. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**, v.41, p.1806-1811, 2006.

MONTEIRO, A. A. M. G.; BOAVENTURA, R. A. R.; RODRIGUES, A. E. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p.45-49, 2000.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v.93, p.1-10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1681-1684, 2001.

NICHOLS, N. N.; SHARMA, L. N.; MOWERY, R. A.; CHAMBLISS, C. K.; VAN WALSUM, G. P.; DIEN, B. S.; ITEN, L. B. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p.624-630, 2008.

OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry.** v.41, p.1223–1228, 2006.

OKUDA, N.; SONEURA, M.; NINOMIYA, K.; KATAKURA, Y.; SHIOYA, S. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.106, n.2, p.128-133, 2008.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of Furfural on Anaerobic Glycolytic Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.62, n.4, p.447-454, 1999a.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and *p*-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.63, n.1, p.46-55, 1999b.

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

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

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

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Improved xylitol production with Debaryomyces hansenii Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.18-24, 1997.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**, p.1-12, 2010.

PEREIRA, R. S. **Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose a xilitol**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena. Depto. de biotecnologia. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial. Lorena. São Paulo, 2007.

PEREIRA, S. R.; IVANUSA, S.; EVTUGUIN, D. V.; SERAFIM, L. S.; XAVIER, A. M. R. B. Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v.103, n.1, p.131-135, 2012.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbial** v.5, p.53-63, 2002.

RAMOS, L. P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quim. Nova**, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P. V. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Braz. J. Chem. Eng**., v.18, n.3, p. 299-311, 2001.

RODRIGUES, R. C. L., B.; ROCHA, G. J. M,; JUNIOR, D. R.; FILHO, H. J. I.; FELIPE, M. G. A.; JUNIOR, A. P. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, p.1247-1253, 2010.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, n.73, p.363-370, 1992.

SHEN, J.; HE, R.; YU, H.; WANG, L.; ZHANG, J.; SUN, X.; LI, J. Biodegradation of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in a biological aerated filter (BAF). **Bioresource Technology**, v.100, p.1922-1930, 2009.

SHERIDAN, R.; RATLEDGE, C.; CHALK, P. A. Pathways to acetyl-coa formation in Candida albicans. **FEMS Microbiol Lett**, v.57, p.165–169, 1990.

SINGH, N. P.; KHAN, A. Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. **Mutation Research**, v.337, p.9-17, 1995.

SMITH, M. R. The physiology of aromatic hydrocarbon degradation bacteria, In: **Biochemistry of microbial degradation**, Colin Ratledge, p.347-378, 1994.

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenerg**, v.10, n.5/6, p.367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Conversion of Furfural in Aerobic and Anaerobic Batch Fermentation f Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.2, p.169-174, 1999.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Inhibition Effects of Furfural on Aerobic Batch Cultivation of Saccharomyces cerevisiae Growing on Ethanol and/or Acetic Acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.90, n.4, p.374-380, 2000a.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.53, p.701-708, 2000b.

TIAN, S.; ZHOU, G.; YAN, F.; YU, Y.; YANG, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, v.27, p.656-660, 2009.

VARMA, R. J.; GAIKWAD, B. G. Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells. **Enzyme and Microbial Technology**, V.43, P.431-435, 2008.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; van DIJKEN, J. P. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.405-412, 1990.

WANG, L.; LI, Y.; YU, P.; XIE, Z.; LUO, Y.; LIN, Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. **Journal of Hazardous Materials**, v.183, p.366-371, 2010.

WIERCKX, N.; KOOPMAN, F.; BANDOUNAS, L.; WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H. J. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. **Microbial Biotechnology**, v.3, n.3, p.336-343, 2010.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v.50, p.3-16, 1994.

YARROW, D.; PAYNE, R. W.; BARNETT, J. A. **Yeasts characteristics and identification**. 3ed. U.K.:Cambridge University Press, 2000.

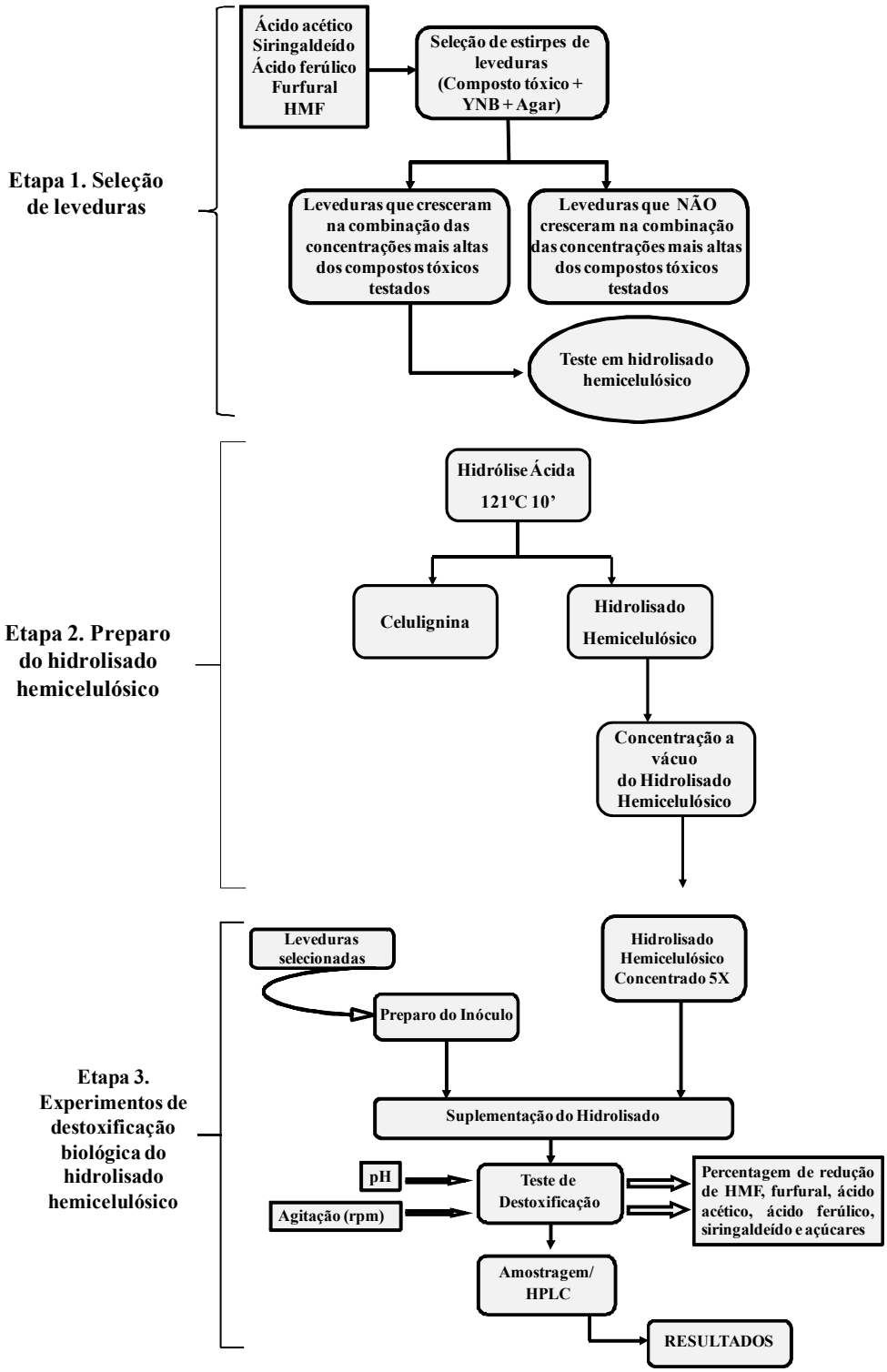
ZALDIVAR, J.; INGRAM, L. O. Effect of Organic Acids on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli* LY01. **Biotechnology and Bioengineering**, v.66, n.4, 1999.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.65, n.1, p.24-33, 1999.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of Alcohol Compounds Found in Hemicellulose Hydrolysate on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n.5, 2000.

# APÊNDICES

## Apêndice A - Fluxograma de atividades realizadas neste trabalho

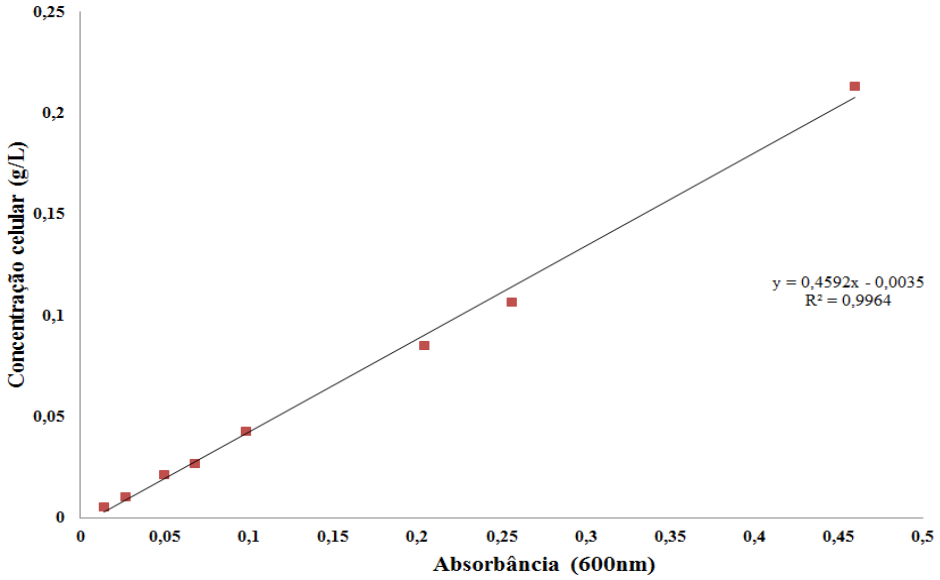


**Apêndice B – Curvas de calibração da concentração celular, HMF, furfural, ácido acético, glicose, xilose e arabinose.**

- **Concentração Celular**

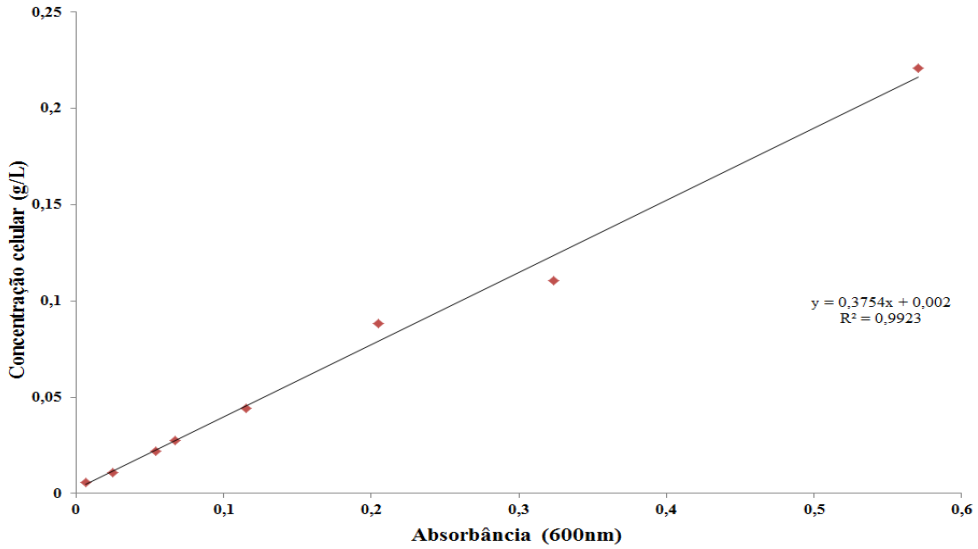
*Issatchenkia occidentalis* M1

D.O.$_{(600nm)}$ = 0,4592.células (g/L) – 0,0035




*Issatchenkia occidentalis* Y1'a

D.O.$_{(600nm)}$ = 0,3754.células (g/L) + 0,002



- **Derivados de Furano**

**HMF:** Área = $1{,}55.10^{8}$.HMF (g/L) – $2{,}96.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

**Furfural:** Área = $2{,}12.10^{8}$.Furfural(g/L) – $7{,}74.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

- **Ácido acético:** Área = $8{,}03.10^{5}$.Ácido acético (g/L) + $1{,}22.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

- **Açúcares**

**Glicose:** Área = $1{,}65.10^{6}$.Glicose (g/L) + $3{,}29.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

**Xilose:** Área = $1{,}78.10^{6}$.Xilose (g/L) + $2{,}91.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

**Arabinose:** Área = $1{,}67.10^{6}$.Arabinose (g/L) + $1{,}22.10^{4}$ ($R^2$= 0,999)

**APÊNDICE C – Composição do Meio de Cultura YNB - Sigma-Aldrich**

Sulfato de amônia: 5,0 g/L
Hidrocloreto de L-Histidina: 10 mg/L
DL-Metionina: 20 mg/L
Ácido fólico: 2 µg/L
Inositol: 2 mg/L
Sulfato de zinco: 400 µg/L
Fosfato monopotássico: 1 g/L
Sulfato de magnésio: 0,5 g/L
Niacina: 400 µg/L
Ácido p-amino benzóico: 200 µg/L
Hidrocloreto de piridoxina: 400 µg/L
Riboflavina: 200 µg/L
DL-Triptofano: 20 mg/L
Biotina: 2 µg/L
Pantotenato de cálcio: 400 µg/L
Iodeto de potássio: 100 µg/L
Cloreto férrico: 200 µg/L
Sulfato de manganês: 400 µg/L
Molibdato de sódio: 200 µg/L
Cloreto de sódio: 0,1 g/L
Cloreto de cálcio: 0,1 g/L
Hidrocloreto de tiamina: 400 µg/L
Ácido bórico: 500 µg/L
Sulfato de cobre: 40 µg/L

**pH Final** 5.4 ± 0.2 (a 25ºC)

**APENDICE D - Tabelas dos resultados de remoção em porcentagem (%) de hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético e fenóis, e de consumo de açúcares, tais como glicose, xilose e arabinose pelas estirpes de *Issatchenkia occidentalis* M1 e Y1'a do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para cada condição experimental testada.**

**Tabela D.1** Porcentagem (%) da remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico após 96 horas de tratamento empregando a estirpe *Issatchenkia occidentalis* M1.

| Experimento | HMF (%) | Furfural (%) | Ác. Acético (%) | Fenóis (%) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 18,47 | 10,45 | 30 | 17,48 |
| **2** | 93,73 | 71,83 | 18,37 | 23,46 |
| **3** | 98,57 | 94,27 | 100 | 23,96 |
| **4** | 94,77 | 99,19 | 100 | 29,17 |
| **5** | 94,24 | 94,85 | 100 | 14,31 |
| **6** | 94,25 | 94,55 | 100 | 15,43 |
| **7** | 94,09 | 95,94 | 100 | 13,09 |

**Tabela D.2** Porcentagem (%) da remoção dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico após 96 horas de tratamento empregando a estirpe *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

| Experimento | HMF (%) | Furfural (%) | Ác. Acético (%) | Fenóis (%) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | 5,56 | 79,66 | 9,80 | 17,63 |
| **2** | 94,34 | 93,92 | 15,59 | 20,76 |
| **3** | 97,68 | 96,06 | 100 | 27,15 |
| **4** | 95,24 | 97,96 | 100 | 22,88 |
| **5** | 95,06 | 96,38 | 100 | 21,27 |
| **6** | 95,13 | 96,47 | 100 | 20,43 |
| **7** | 95,39 | 97,78 | 100 | 21,58 |

**Tabela D.3** Porcentagem (%) da remoção de açúcares presentes no hidrolisado após 96 horas de tratamento biológico pela estirpe *Issatchenkia occidentalis* M1.

| Experimento | Glicose (%) | Xilose (%) | Arabinose (%) |
|---|---|---|---|
| **1** | 3,39 | 2,72 | 4,73 |
| **2** | 82,17 | 1,75 | 0,20 |
| **3** | 93,58 | 3,81 | 0,12 |
| **4** | 81,81 | 7,15 | 1,28 |
| **5** | 82,36 | 4,75 | 0,23 |
| **6** | 80,83 | 6,08 | 0,46 |
| **7** | 80,40 | 4,41 | 0,70 |

**Tabela D.4** Porcentagem (%) da remoção de açúcares presentes no hidrolisado após 96 horas de tratamento biológico pela estirpe *Issatchenkia occidentalis* Y1'a.

| Experimento | Glicose (%) | Xilose (%) | Arabinose (%) |
|---|---|---|---|
| **1** | 2,21 | 2,25 | 0 |
| **2** | 95,14 | 1,02 | 1,87 |
| **3** | 93,79 | 1,47 | 4,50 |
| **4** | 96,50 | 4,99 | 3,98 |
| **5** | 89,90 | 1,79 | 18,09 |
| **6** | 88,90 | 2,06 | 13,97 |
| **7** | 89,00 | 2,06 | 0,25 |