UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FLAVIO DE OLIVEIRA FERRAZ

Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol

Lorena
2010

FLAVIO DE OLIVEIRA FERRAZ

Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena
2010

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

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

Ferraz, Flavio de Oliveira

Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol / Flavio de Oliveira Ferraz ; orientador Sílvio Silvério da Silva. – Lorena: 2010.

89 pág. : fig.

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.

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Hidrolisado 5. Destoxificação. I. Título

664.113 - CDU

Dedico esta dissertação aos meus pais, Benício e Rosa, e a minha irmã, Fabiana, por todo carinho, amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda paz de espírito e tudo o mais que se fez essencial para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva pela oportunidade, pela orientação, amizade e profissionalismo que teve ao longo destes anos de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado, pela amizade e pelo estímulo que me deu para enveredar nessa aventura prazerosa da vida acadêmica.

À CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

À todos os professores do Departamento de Biotecnologia por dividir seus conhecimentos e contribuir para minha formação.

Aos meus pais, Benício e Rosa, e a minha irmã, Fabiana, por todo o apoio, paciência e incentivo.

Aos meus amigos Juan (irmão paraguaio!) e Boutros, pela receptividade e amizade ao longo desses anos, por todas as conversas, idéias e risadas que demos juntos. Agradeço a vocês toda a ajuda também.

Aos meus companheiros de república, Bruno Guedes (obrigado pela amizade e pela trilha sonora do meu mestrado!), Bruno Baratela, Rafael e Fernando.

À todos os amigos que encontrei no DEBIQ, Sergião, Victor, Robson, Paulinha, Carol, Juliana, Michel, Germano, Wagner, Guilherme, Dani Cortez, Dani Garcia, Priscila Vaz, João Paulo, Livia, Fernando Budaia, Gina, Claudio, Diana, Maria Fernanda e todos aqueles que foram companheiros das melhores e mais divertidas horas do meu mestrado. Vocês fizeram minha caminhada mais suave.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Ricardo Branco, Adriana Dilon, Rondinele, Taís, Erick (Teddy meia-lata), Andrei (Princesa) e Emilião. Obrigado por toda a ajuda e pela excelente companhia no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos José Carlos (Zé Cobrinha), Nicanor, Rita e Jussara por toda a ajuda no dia a dia e no trabalho. E também à Sandra, Bia e Cida por toda gentileza e eficiência.

RESUMO

FERRAZ, F. O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol.** 89p. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

A fermentação de hidrolisados hemicelulósicos tem como principal dificuldade a presença de compostos inibidores ao metabolismo microbiano, derivados da degradação parcial da lignina, degradação dos açúcares e liberação de radicais acetil durante a etapa de hidrólise dos materiais lignocelulósicos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência de diferentes tratamentos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar na produção de etanol e xilitol. Foram avaliados os seguintes tratamentos: a) alteração de pH com óxido de cálcio e ácido fosfórico seguido de adsorção com carvão ativo; b) utilização de resinas de troca iônica (A-860, A-500PS e C-150 – Amberlite); e c) extração líquido-líquido com interface imobilizada em membrana de fibra oca (Membrana, Charlotte, NC - USA), na qual a fase orgânica foi uma mistura de octanol e Alamina 336 e a fase aquosa foi o próprio hidrolisado. De acordo com os resultados, os tratamentos aplicados (a, b e c) promoveram uma redução na concentração de ácido acético de 46,74%, 64,15% e 44,71% e uma redução na absorbância relativa (A.R.) de 82,0%, 94,59% e 46,07%, respectivamente. Na fermentação dos hidrolisados tratados, pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, após 48h de fermentação, os resultados para o fator de rendimento foram de 0,57g/g, 0,42g/g e 0,33 g/g após os tratamentos a, b e c, respectivamente. Quanto à produtividade volumétrica, na mesma ordem dos tratamentos foram obtidos os seguintes resultados: 0,39 g.L⁻¹.h⁻¹, 0,20 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹. Nas fermentações dos hidrolisados tratados (a) e (b) pela levedura *Pichia stipitis* IMH 43.2, visando a produção de etanol, após 48h os resultados do fator de rendimento foram 0,38 g/g e 0,23 g/g, respectivamente, enquanto a produtividade volumétrica foi de 0,09 g.L⁻¹.h⁻¹ para o tratamento (a) e para o tratamento (b). Para o tratamento (c) não se observou a produção de etanol nas condições de fermentação utilizadas. Considerando os resultados obtidos, sugere-se que, para as condições experimentais empregadas, o hidrolisado seja tratado por alteração de pH seguido de tratamento com carvão ativado, uma vez que este tratamento resultou nos melhores resultados para o fator de rendimento tanto na produção de xilitol quanto na produção de etanol.

Palavras chaves: Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisado. Destoxificação.

ABSTRACT

FERRAZ, F. O. **Influence of different detoxification methods on the composition and fermentability of the sugarcane bagasse hydrolyzate to xylitol and ethanol.** 89p. 2010. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2010.

The fermentation of hemicellulosic hydrolysates has as main difficulty the presence of compounds derived from partial degradation of lignin, sugars and release of acetyl groups, which are inhibitors of microbial metabolism, during the hydrolysis process of lignocellulosic materials. This study aimed to evaluate the influence of different detoxification treatments on the composition and fermentability of the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate in the production of xylitol and ethanol. The following treatments were evaluated: a) change of pH with calcium oxide and phosphoric acid followed by adsorption with activated charcoal, b) use of ion exchange resins (A-860, A-500 PS and C-150 - Amberlite) and c) liquid-liquid extraction with immobilized interface in hollow-fiber membrane (Membrana, Charlotte, NC - USA), in which the organic phase was a mixture of octanol and Alamine 336, and the aqueous phase was the hydrolyzate. According to the results, the employed treatments (a, b and c) promoted a reduction of 46.74%, 64.15% and 44.71% in the acetic acid concentration, and a reduction in the relative absorbance (RA) of 82.0%, 94.59% and 46.07% respectively. In the fermentation of the treated hydrolysates by the *Candida guilliermondii* FTI 20037 yeast, aiming xylitol production, after 48h of fermentation, the results for xylitol yield were 0.57g/g, 0.42g/g and 0.33g/g, after the treatments a), b) and c), respectively. The volumetric productivity obtained was 0.39 g.L⁻¹.h⁻¹, 0.20 g.L⁻¹.h⁻¹ and 0.16 g.L⁻¹.h⁻¹, in the same order of treatments. In fermentation by *Pichia stipitis* IMH 43.2 of the hydrolysates that used treatments (a) and (b), aiming the production of ethanol, after 48h, the results for yield were 0.38g/g and 0.23g/g, respectively, while the volumetric productivity was 0.09 g.L⁻¹.h⁻¹ for both treatments. For treatment (c) there was no ethanol production using the fermentation conditions applied in this work. Considering these results, it is suggested that for the experimental conditions used at this work, the hydrolyzate should be treated by pH change followed by treatment with activated charcoal, since this treatment resulted in better results of yield in the production of xylitol and ethanol.

Keywords: Sugarcane bagasse. Hydrolyzate. Detoxification.

SUMÁRIO

1 - Introdução.....	10
2 - Revisão biográfica.....	12
2.1 - Características e composição da biomassa lignocelulósica.....	12
2.2 - Bagaço de cana-de-açúcar.....	16
2.3 - Decomposição da biomassa lignocelulósica visando a obtenção de açúcares.....	18
2.4 - Efeito dos compostos furânicos, ácido acético e compostos fenólicos em processos biotecnológicos.....	22
2.5 - Destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos.....	25
2.6 - Propriedades e produção biotecnológica de xilitol.....	32
2.7 - Produção biotecnológica de etanol de segunda geração por leveduras fermentadoras de D-xilose.....	36
3 - Objetivos.....	39
3.1 - Gerais.....	39
3.2 - Específicos.....	39
4 - Material e Métodos.....	40
4.1 - Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	40
4.2 - Concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.....	41
4.3 - Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	41
4.4 - Tratamentos aplicados ao hidrolisado para remoção de compostos tóxicos	41
4.4.1 - Tratamento por alteração de pH (liming) conjugado com carvão ativo.....	41
4.4.2 - Tratamento com resinas de troca iônica.....	42
4.4.3 - Tratamento por extração líquido - líquido com interface imobilizada em membrana.....	42
4.5 - Avaliação dos tratamentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão de D-xilose em etanol e xilitol.....	45
4.5.1 - Processo Fermentativo.....	45
4.5.1.1 - Microrganismos e preparo dos inóculos.....	45
4.5.1.2 - Meio de Fermentação.....	46
4.6 - Métodos analíticos.....	46
4.6.1 - Determinação do teor de umidade de bagaço de cana-de-açúcar.....	46

4.6.2 - Determinação do pH.....	46
4.6.3 - Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e etanol.....	46
4.6.4 - Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	47
4.6.5 - Determinação da concentração de fenóis totais.....	47
4.6.6 - Determinação da absorbância relativa.....	48
4.7 - Determinação das porcentagens de redução dos compostos tóxicos e dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	48
4.8 - Parâmetros de bioconversão.....	49
4.8.1 - Fator de rendimento em xilitol e/ou etanol.....	49
4.8.2 - Produtividade volumétrica em xilitol / etanol.....	49
5 - Resultados e discussão.....	50
5.1 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	52
5.2 - Efeito dos tratamentos sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado concentrado de bagaço de cana-de-açúcar.....	52
5.2.1 - Tratamento por alteração do pH.....	52
5.2.2 - Tratamento com resinas de troca iônica.....	55
5.2.3 - Tratamento por extração com solvente orgânico utilizando membranas como suporte de interface.....	58
5.2.3.1 - Determinação da composição da fase orgânica para destoxificação por extração líquido-líquido com interface imobilizada em membrana.....	58
5.2.3.2 - Tratamento do hidrolisado após definição da composição da fase orgânica.....	59
5.3 - Avaliação comparativa entre os diferentes tratamentos sobre a composição do hidrolisado.....	62
5.4 - Efeito dos tratamentos sobre a fermentabilidade do hidrolisado a xilitol pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037.....	64
5.5 - Efeito dos tratamentos sobre a fermentabilidade do hidrolisado a etanol pela levedura <i>Pichia stipitis</i> IMH 43.2.....	69
6 - Conclusões.....	73
Referências.....	75

1 - Introdução

Os materiais lignocelulósicos representam a maior e mais barata fonte de matéria orgânica da biosfera. Sua constituição rica em carboidratos permite que subprodutos das indústrias florestais e agroindustriais sejam fontes de açúcares fermentescíveis, matéria prima em processos biológicos que visam a produção de substâncias com alto valor comercial como, por exemplo, o xilitol e o etanol.

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria sucro-alcooleira produzido em grandes quantidades e apresenta grande potencial em aplicações biotecnológicas por sua constituição rica em celulose e hemicelulose.

A celulose, um polímero linear de D-glicose com variado grau de cristalinidade, assim como a hemicelulose, macromolécula rica em pentoses, são potenciais fontes de açúcares que podem ser utilizados para a produção de biomoléculas por via fermentativa. Para tanto, diversos pré-tratamentos vêm sendo avaliados em escala laboratorial e piloto para promover a quebra dessas macromoléculas em seus respectivos monômeros. Dentre estes pré-tratamentos, encontra-se a hidrólise catalisada por soluções ácidas e a hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática apresenta uma alta afinidade na liberação dos açúcares de interesse sem que haja degradação destes ou liberação de compostos presentes na lignina. No entanto, o alto custo das enzimas utilizadas nesse processo ainda inviabiliza a sua utilização em escala industrial. Como alternativa utiliza-se a hidrólise com soluções ácidas. Além de ser um processo mais barato e rápido comparado à hidrólise enzimática, a hidrólise ácida é um processo muito eficiente na solubilização dos açúcares fermentescíveis presentes na hemicelulose.

Apesar de apresentar vantagens econômicas em relação à hidrólise enzimática, a hidrólise ácida apresenta inconvenientes que prejudicam a utilização do hidrolisado em processos biológicos. A baixa seletividade do processo de hidrólise ácida promove a degradação de parte da lignina, liberando compostos fenólicos e ácidos orgânicos dessa fração no hidrolisado. Além disso, este processo acarreta a degradação dos açúcares liberados, resultando na produção dos compostos furânicos como o furfural, derivado da degradação das pentoses, e o 5-hidroximetilfurfural, derivado da degradação das hexoses. Caso a hemicelulose seja acetilada, como acontece no bagaço de cana-de-açúcar, o

hidrolisado ácido contém também ácido acético. Os compostos fenólicos, além do furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, são inibidores do metabolismo microbiano, exigindo, desta forma, tratamentos do hidrolisado prévios às fermentações para remoção destes compostos.

Visando o melhoramento na fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, bem como maiores rendimento e produtividade nos processos fermentativos, diferentes métodos de destoxificação foram estudados no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena. Dentre os métodos mais utilizados estão o tratamento por alteração do pH e o tratamento utilizando resinas de troca iônica. Ambos os métodos foram aplicados no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e mostraram-se adequados na remoção de compostos tóxicos e melhora na fermentabilidade por leveduras fermentadoras de D-xilose. Entretanto estes tratamentos ainda apresentam inconveniências ao seu uso em escala industrial. O tratamento por alteração do pH gera resíduos que não têm aplicações conhecidas e o tratamento com resinas de troca iônica necessita de regenerações periódicas das resinas.

Considerando as dificuldades operacionais e as deficiências existentes nos métodos já explorados para destoxificação do hidrolisado, é conveniente o estudo e aplicação de melhorias nos métodos já conhecidos e também a pesquisa de novos métodos de destoxificação que possam facilitar a utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em bioprocessos.

Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008) empregaram um sistema de extração com interface imobilizada em membranas de fibra oca, visando a remoção principalmente do ácido acético presente em hidrolisado de folhagem de milho. Para tanto adicionaram à fase orgânica dois diferentes compostos de amônio, Alamina 336 (trioctil/decil amina, de cadeia longa, insolúvel em água) e Aliquat 336 (sal quaternário de amônio produzido pela metilação de trioctil/decil amina). Estas aminas extratoras foram diluídas em octanol, solvente considerado ideal pelos autores devido a sua imiscibilidade na fase aquosa, viscosidade adequada e por estabilizar, através de ligações de hidrogênio, o complexo formado pela amina e os ácidos. Os autores conseguiram remover consideravelmente o ácido acético e parte dos compostos inibidores derivados da lignina e da degradação dos açúcares. No entanto, não foi realizado nenhum

trabalho para avaliar a eficiência deste tratamento na fermentabilidade do hidrolisado.

A utilização do sistema de extração com interface imobilizada em membranas apresenta algumas conveniências, principalmente quanto a sua ampliação de escala e aproveitamento da fase orgânica utilizada no tratamento do hidrolisado. Além disso, este tratamento não provoca a perda dos açúcares fermentescíveis, o que pode melhorar o rendimento e a produtividade de processos biotecnológicos utilizando hidrolisados hemicelulósicos. Para tanto, é de fundamental importância a avaliação e comparação deste tratamento aos demais processos já conhecidos.

Espera-se, ao estudar o efeito deste tratamento sobre a fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, contribuir para o desenvolvimento de tecnologias que permitam melhor destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para seu melhor aproveitamento em processos biotecnológicos.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Características e composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é considerada a fonte de material orgânico mais abundante na biosfera, sendo acumulada em grandes quantidades na forma de resíduos agroindustriais e florestais. A sua composição predominantemente de açúcares polimerizados vem, há algum tempo, despertando a atenção de pesquisadores interessados na utilização destes materiais na geração de energias de fontes renováveis e em processos de bioconversão. Como exemplos, pode-se citar alguns trabalhos sobre o uso dos carboidratos presentes na biomassa vegetal para a produção de ácido láctico (KWON et al., 2000; WEE; RYU, 2009), hidrogênio (ANGELIDAKI, 2009; KAPARAJU et al., 2009; KONGJAN; MIN; PATTTRA et al., 2008; REN et al., 2009), xilitol (BRANCO et al., 2007; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; CARVALHO et al., 2005; MUSSATO; ROBERTO, 2008; SILVA et al., 2007; SANTOS et al. 2005), etanol (CHEN et al., 2009; CHENG et al., 2008; GREY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; ROBERTO et al. 1991) e proteína microbiana (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002).

A utilização de materiais lignocelulósicos como matéria prima em bioprocessos é significativamente influenciada pela sua constituição química. Os resíduos lignocelulósicos são constituídos por três principais frações - celulose, hemicelulose e lignina - das quais a celulose e a hemicelulose são compostas por polissacarídeos, e a lignina que é constituída de um material polifenólico.

A celulose é o componente com maior concentração nos materiais lignocelulósicos, variando de 40% a 60% (m/m) do peso seco do material, seguido, pela hemicelulose, entre 20% e 35%, e pela lignina, variando de 10% a 25% (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). No entanto, a composição quantitativa e qualitativa varia dependendo da espécie vegetal (SAHA 2003; LYND et al., 2005) e mesmo dentro da própria espécie, devido a variações genéticas e diferentes condições de cultivo (FENGEL; WEGENER, 1989). A composição de diferentes resíduos lignocelulósicos é apresentada na tabela 2.1.1.

Tabela 2.1.1 - Composição percentual de diferentes resíduos agrícolas e florestais

Resíduos	Hexoses	Pentoses	Lignina	Cinzas
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29	4
Palha de cevada	40	20	15	11
Sabugo de milho	42	39	14	2
Talo de milho	35	15	19	5
Casca de amendoim	38	36	16	5
Palha de aveia	41	16	11	12
Pinheiro	41	10	27	8
Palha de arroz	32	24	13	12
Casca de arroz	36	15	19	20
Serragem	55	14	21	5
Palha de sorgo	33	18	15	10
Palha de trigo	30	24	18	1
Madeira de folhosas	45	30	20	5
Madeira de coníferas	42	27	28	3

Fonte: (adaptada de KUHAD; SINGH, 1993)

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e compõe a maior parte da parede celular dos vegetais. É um homopolíssacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (Fig. 2.1.1), com grau de polimerização de até 10.000 unidades. A molécula de D-glicose possui estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas. Essa forma linear possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que agregam as cadeias celulósicas em fibrilas elementares com alto grau de cristalinidade que confere à celulose alta resistência a tensão e insolubilidade a um grande número de solventes (CANILHA et al., 2010; KUHAD; SINGH, 1993).

Figura 2.1.1 - Estrutura e composição química da celulose

A celulose é utilizada na indústria de papel, na geração de energia por combustão, na constituição de biomateriais e ainda na indústria de alimentos (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003).

A hemicelulose, segundo polissacarídeo mais encontrado na natureza, é um heteropolímero ramificado (Fig. 2.1.2), composto por pentoses (D-xilose, e L-L-arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e diferentes radicais de ácidos orgânicos (acético, glucurônico e galacturônico). As hemiceluloses, diferentemente da celulose, se diferem de acordo com a espécie vegetal e com o meio ambiente onde o vegetal se encontra, variando a sua estrutura e composição. Enquanto que nas madeiras de folhosas a hemicelulose possui predominantemente 4-O-metil-glucuroxilanas e glucomananas, nas madeiras de coníferas esta fração apresenta em maior quantidade galactoglucomananas e arabinoglucuroxilanas. As gramíneas, por sua vez, apresentam as glucuronoarabinoxilanas (CANILHA et al., 2010; SAHA 2003, KUHAD; SINGH, 1993). Este heteropolímero encontra-se em todas as camadas da parede celular do vegetal, associado com a celulose e a lignina, funcionando como um tecido de reserva e sustentação (FENGEL; WENEGER, 1989).

Figura 2.1.2 - Estrutura heterogênea ramificada da hemicelulose (metil-glucuronoxilana acetilada)

A lignina é uma macromolécula aromática, amorfa, derivada de precursores fenilpropanóides. Segundo Fengel; Weneger (1989), estudos com carbono radioativo confirmaram que os precursores primários e unidades de construção da lignina são o álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico (Fig 2.1.3).

Figura 2.1.3: Unidades primárias de construção da lignina

Os substituintes do esqueleto fenilpropanóide permitem a classificação das ligninas em dois grupos: ligninas guaiacil (que possuem um grupo metóxi no carbono 3), sendo típicas de madeiras de coníferas, e as ligninas guaiacil-siringil (na qual o grupo metóxi está localizado nos carbonos 3 e 5), características de madeiras de folhosas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 b). A lignina está associada à celulose e hemicelulose, protegendo essas outras frações contra ataques externos de microrganismos degradadores, além de conferir rigidez e baixa reatividade ao conjunto de fibras dos vegetais.

A outra parte remanescente encontrada nos resíduos lignocelulósicos é composta por extrativos, ácidos, sais e minerais, além de ceras, gorduras, gomas,

amido, alcalóides, resinas, óleos essenciais e resíduos chamados de não-extrativos tais como sílica, carbonatos, oxalatos etc. (KUHAD; SINGH, 1993; HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2004).

2.2 - Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos subprodutos produzidos em maior quantidade pela agroindústria brasileira. Este resíduo fibroso é o que sobra após a extração do caldo (suco) da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool e até 80% deste material é utilizado na própria usina como combustível para as caldeiras e na geração de energia elétrica (TEIXEIRA;PIRES; NASCIMENTO, 2007).

Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2009), para a safra 2009/2010 de cana-de-açúcar é previsto o processamento de 629 milhões de toneladas. De acordo com BURGI¹ (1995 apud TEIXEIRA;PIRES; NASCIMENTO, 2007), de cada tonelada de cana moída na indústria são produzidos 700 litros de caldo e 300 Kg de bagaço. Considerando estes dados, espera-se a produção de aproximadamente 192 milhões de toneladas de bagaço, dos quais mais de 153 milhões de toneladas serão utilizados na geração de energia elétrica e combustível para caldeiras e, aproximadamente, 38 milhões e 400 mil toneladas serão excedente de bagaço, subproduto de baixo valor econômico que constitui um problema ambiental para as usinas e distritos arredores, devido principalmente ao risco de combustão espontânea (TEIXEIRA;PIRES; NASCIMENTO, 2007; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002), exigindo da sociedade científica o desenvolvimento de novas técnicas que visem ao aproveitamento deste material.

O bagaço é constituído de, aproximadamente, 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000). Esta composição rica em açúcares faz com que as frações de bagaço de cana-de-açúcar sejam amplamente estudadas como matérias primas de diversos processos de biotransformação, seja em processos de fermentação submersa (SILVA et al. 2003; CARVALHO et al. 2005), ou em fermentação em estado sólido (MAZUTTI

¹ BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. Anais do 6º simpósio sobre nutrição de bovinos da FEALQ, 1995. Piracicaba-SP, p. 153-169.

et al., 2006; KUMAR et al. 2003). A Tabela 2.1.2 mostra alguns trabalhos em que o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como matéria prima:

Tabela 2.1.2 - Produtos derivados de bioprocessos com bagaço de cana-de-açúcar

Produto	Referência
Etanol	CHENG et al (2008), MARTÍN et al. (2002), ROBERTO et al. (2001 a), DIAS et al. (2009), SARROUH et al. (2007)
Xilitol	SILVA et al. (2007), SILVA et al. (2005), CARVALHO et al. (2005), RODRIGUES et al. (2003), FELIPE et al. (1997 a,b)
Ácido láctico	LAOPAIBOON (2009)
Biohidrogênio	PATTRA et al. (2008)
α -amilase	RAJAGOPALAN e KRISHNAN (2007)

Para que o bagaço de cana-de-açúcar possa ser utilizado em bioprocessos é necessário que a celulose e hemicelulose deste material sejam convertidos em açúcares fermentescíveis. Isto é possível através de diferentes processos capazes de decompor a estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos.

2.3 - Decomposição da biomassa lignocelulósica visando a obtenção de açúcares

Atualmente, a fração celulósica é o foco da maioria das pesquisas que visa o aproveitamento de materiais lignocelulósicos em bioprocessos. Mas é sabido que a viabilidade econômica da utilização destes resíduos depende da utilização adequada de todas as frações. A alternativa mais utilizada para aproveitamento da celulose e da hemicelulose é a hidrólise dessas frações em seus monômeros de açúcares correspondentes. Estes açúcares são utilizados em processos de bioconversão para a obtenção de produtos de interesse comercial como o xilitol (BRANCO et al., 2007; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008) e o etanol (CHENG et al., 2008; LEE, 1997).

O processo de hidrólise das macromoléculas polissacarídicas dos materiais lignocelulósicos pode ser feito por métodos químicos ou biológicos, sendo que a hidrólise enzimática e a hidrólise ácida são as técnicas mais estudadas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

A hidrólise enzimática da celulose para a produção de açúcares redutores é de grande interesse para atendimento da demanda global de energia, permitindo a sacarificação da celulose em D-glicose, principal substrato na produção biológica de etanol. Este processo é realizado utilizando-se um complexo enzimático, denominado celulase, composto por diferentes enzimas que atuam de formas distintas e apresentam efeito sinérgico (ORTEGA; BUSTO; MATEOS, 2001) , sobre as fibras de celulose, conforme apresentado na Figura 2.3.1.

Entretanto, este processo torna-se muito dispendioso, dado o alto custo das enzimas, baixa velocidade das reações e falta de um sistema de reatores ideal para o processo (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2002) além da necessidade de desenvolvimento de estratégias que minimizem o efeito inibidor do produto sobre as enzimas (ORTEGA; BUSTO; MATEOS, 2001). Geralmente, a hidrólise enzimática é feita após pré-tratamentos para remoção da lignina e da hemicelulose, para maior exposição das fibras de celulose e aumento do rendimento da hidrólise enzimática (KIM; HONG 2001; SUN et al. 2009).

Figura 2.3.1 - ação das enzimas da celulase sobre a fibra de celulose (modificado de www.answers.com/topic/cellulase, acessado em 10/2009)

Outra técnica utilizada na hidrólise da celulose é a utilização de soluções concentradas de ácidos inorgânicos. O ácido rompe as ligações de hidrogênio

responsáveis pela ligação entre as fibras de celulose, desestruturando o cristal, permitindo a hidrólise das fibras e a formação dos monômeros de açúcares (OROZCO et al., 2007).

No entanto, hidrólises ácidas são processos de baixa seletividade, que geralmente empregam altas temperaturas, culminando na degradação de parte dos açúcares em compostos como furfural e hidroximetilfurfural.

A hidrólise enzimática da hemicelulose desperta maior interesse do ponto de vista industrial por ser um processo que permite modificações específicas e controladas, evita a geração de subprodutos indesejáveis e é geralmente um processo não impactante ao meio ambiente (SAHA, 2000; SHEEHAN; HIMMEL, 1999). A hidrólise da hemicelulose envolve a atividade das enzimas α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), em conjunto com as α -gucuronidasas (EC 3.2.1.139), esterases (EC 3.1.1.73) e acetilxilanoesterases (EC 3.2.1.55). A despolimerização envolve as enzimas endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.1.1.8) e β -xilosidasas (EC 3.2.1.37). As primeiras atacam as ligações do tipo β -1,4 presentes no esqueleto das xilanas de forma aleatória, gerando xilooligosacarídeos e xilobiose. As β -xilosidasas atacam as extremidades não redutoras dos xilooligosacarídeos e xilobiose para liberar D-xilose (SORENSEN; PEDERSEN; MEYER, 2006). A região específica de ação de algumas das enzimas citadas está exemplificada na Figura 2.3.2.

Apesar da maior especificidade e maior rendimento em monossacarídeos, a hidrólise enzimática apresenta maior custo quando comparada à hidrólise ácida (PALMQVIST; HANHN-HÄGERDAL, 2000a).

Figura 2.3.2 - ação das enzimas hemicelulolíticas sobre a hemicelulose (modificado de chemistry.umeche.maine.edu/Fort/Cole-Fort.html, acessado em 10/2009)

Soluções de ácidos diluídos e condições brandas de temperatura podem hidrolisar a hemicelulose com relativa facilidade devido a sua estrutura ramificada, gerando um licor rico em monômeros de açúcares que compõem esta fração (Fig. 2.3.3).

Figura 2.3.3 - Efeito da hidrólise ácida sobre material lignocelulósico (U.S. Department of Energy Office of Science, 2009)

celulósica, uma vez que a remoção da hemicelulose, bem como da lignina, aumentam a performance da hidrólise enzimática da celulose (MUSSATO et al. 2007).

A hidrólise utilizando ácidos diluídos como catalisadores do processo é um método fácil e rápido de ser realizado. A técnica de operação dessa hidrólise é realizada com temperatura entre 120 e 200°C, com adição de ácidos inorgânicos tais como H_2SO_4 e HCl em pequenas quantidades. Contudo é dificultada pela falta de seletividade, que leva à formação de subprodutos (GREY; ZHAO; EMPTAGE, 2006), tais como ácido acético, compostos fenólicos derivados da lignina, furfural, hidroximetilfurfural (Fig. 2.3.4) e metais pesados, derivados dos reatores onde ocorre o processo de hidrólise (SILVA et al. 2004; CHUNG; LEE, 1985* apud MARTON, 2005). Estes compostos podem limitar o metabolismo microbiano, afetando a produtividade e rendimento de processos biológicos (PARAJÓ; DOMÍNGUES; DOMÍNGUES, 1998).

* Chung, I.S.; Lee, Y.Y. , Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, p. 308-315, 1985.

As condições em que se realiza o processo têm grande influência sobre a composição final do hidrolisado, degradação de açúcares e lignina e, conseqüentemente, sobre os parâmetros do processo fermentativo, uma vez que compostos fenólicos derivados da lignina, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural são potenciais inibidores do metabolismo microbiano. Silva; Matos e Carvalho (2005) analisaram a influência da concentração de ácido e tempo de residência na composição final do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, observando grande influência destes parâmetros nas concentrações de D-xilose, ácido acético e hidroximetilfurfural. Os mesmos parâmetros não demonstraram a mesma significância nas concentrações de furfural e compostos fenólicos.

A geração de compostos com potencial efeito inibitório do metabolismo é um dos principais entraves na utilização biotecnológica de hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Tanto o efeito individual e sinérgico de cada inibidor bem como estratégias de purificação dos hidrolisados são assuntos de muito estudo por parte da comunidade científica.

Figura 2.3.4 Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos (*modificado de PALMIQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b*)

2.4 - Efeito dos compostos furânicos, ácido acético e compostos fenólicos em processos biotecnológicos

Durante o processo de hidrólise, a combinação de baixo pH e altas temperaturas resulta na geração de produtos de degradação das hexoses e pentoses, tais como o 5-hidroximetilfurfural e furfural respectivamente. Estes derivados furânicos, por sua vez, são degradados a ácidos alifáticos, como o ácido fórmico e ácido levulínico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 a). Além destes, compostos provenientes da degradação da lignina como, por exemplo, siringaldeído e vanilina, também são encontrados nos hidrolisados. Todos estes compostos, bem como metais liberados do equipamento de hidrólise são potentes inibidores do metabolismo microbiano.

Segundo TAHERZADEH et al. (1999), concentrações da ordem de 1g/L de furfural podem, em uma fermentação, afetar sensivelmente a viabilidade das células, a taxa de crescimento específico e a produtividade volumétrica do processo. Tal efeito inibitório pode ser justificado pela sensibilidade de determinadas enzimas glicolíticas à presença do furfural (HRISTOZOVA et al., 2006; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 b). Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000 b) propõem ainda duas suposições para o efeito tóxico do furfural: uma possibilidade é a redução de furfural para álcool furfurílico por uma desidrogenase dependente de NADH que possui maior afinidade em realizar a redução de dihidroxicetona-fosfato para glicerol; outra razão, o furfural causa inativação da replicação celular. Allen et al. (2010) demonstraram que o furfural induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em *Saccharomyces cerevisiae*, provocando danos às membranas das mitocôndrias e vacúolos, à actina do citoesqueleto e à cromatina. Modig, Lidén e Taherzadeh (2002), avaliando o efeito do furfural sobre as enzimas álcool-desidrogenase, aldeído-desidrogenase e piruvato-desidrogenase, detectaram uma maior afinidade da enzima aldeído-desidrogenase pelo furfural do que pelo seu substrato natural, o acetaldeído. Os autores concluíram que uma concentração de 0,05g/L de furfural foi capaz de reduzir a atividade da aldeído-desidrogenase em 76%. O 5-hidroximetilfurfural também promove a inibição dos processos fermentativos, possivelmente por mecanismo similar ao furfural, sendo que o hidroximetilfurfural é reduzido a álcool 5-hidroximetilfurfurílico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 b).

Além dos compostos de degradação dos açúcares, também são liberados no hidrolisado radicais acetil, provenientes das ramificações da hemicelulose, e também compostos fenólicos, oriundos da degradação parcial da lignina, como, por exemplo, hidroquinona, siringaldeído e 4-metilcatecol (OLIVA et al., 2006).

O ácido acético e outros ácidos orgânicos presentes no hidrolisado, enquanto o pH do hidrolisado se encontra abaixo dos respectivos pK_a ($pK_a = 4,75$ para o ácido acético), encontram-se na forma protonada (não dissociada). Dessa forma, atravessa a membrana celular, alcançando o citoplasma da célula. Dentro da célula encontra um pH mais alto que seu pK_a , sendo então desprotonados e promovendo a acidificação do citoplasma do microrganismo. Um dos problemas derivados da queda do pH intracelular é a interferência na replicação celular, que decresce linearmente com a redução gradual do pH citosólico (IMAI; OHONO, 1995).

Segundo Maiorella, Blanch e Wilke (1983), o ácido acético inibe o metabolismo das leveduras por interferência química no transporte de fosfato pela membrana celular, dependente de ATP. O ácido acético interfere provocando o aumento da necessidade de ATP para a manutenção desta função de transporte, além de alterar a morfologia da célula.

Silva et al. (2004) observaram que o efeito inibitório do ácido acético sobre a bioconversão de D-xilose a xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 depende não só da concentração deste ácido no hidrolisado, mas também do tempo de exposição da célula ao inibidor. Adicionando ácido acético ao hidrolisado, em diferentes tempos de fermentação, os autores observaram que o efeito tóxico do ácido acético, em uma concentração de 5,0 g/L, foi maior quando adicionado após 12 horas de fermentação, correspondendo à fase de máxima atividade metabólica da levedura. Ainda segundo os autores, o efeito inibidor do ácido acético tem efeito sinérgico quando presente junto de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos.

Larsson et al. (1999) avaliaram, dentre outros inibidores, a ação de ácido fórmico sobre a atividade fermentativa de *S. cerevisiae*. Este ácido é formado pela degradação do furfural em condições ácidas e altas temperaturas. Segundo os autores, o ácido fórmico apresentou maior potencial de inibição do que os ácidos acético e levulínico, possivelmente devido ao seu menor tamanho molecular, facilitando sua difusão através da membrana celular.

A toxicidade dos compostos fenólicos consiste na ação destes sobre as membranas biológicas. A presença destes compostos afeta a integridade da membrana plasmática e interfere na sua seletividade (DUARTE et al., 2005; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000 b). Cortez e Roberto (2009) avaliaram a toxicidade da vanilina e siringaldeído, dois aldeídos aromáticos derivados da lignina presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, sobre a bioconversão de D-xilose a xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. Os autores constataram que a presença de um dos dois compostos no hidrolisado, em concentrações superiores a 2,0g/L, foi suficiente para inibir o crescimento celular, o qual foi completamente inibido quando os dois compostos fenólicos estavam presentes em concentrações de 2,0g/L cada. Além disso, observou-se grande redução no rendimento de xilitol, influenciado pela presença de siringaldeído. Por outro lado, a vanilina não provocou o mesmo efeito neste parâmetro.

Além dos efeitos individuais dos compostos inibidores, há também o efeito sinérgico destes sobre o processo fermentativo. Oliva et al. (2005) demonstraram que o efeito sinérgico de ácido acético, furfural e catecol reduziu significativamente o rendimento de etanol em processo fermentativo com a levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Devido ao efeito individual e sinérgico dos diversos compostos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos, faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos eficazes na remoção destes elementos, permitindo a utilização efetiva do hidrolisado em processos fermentativos.

Watson et al. (1984 - apud PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGEZ, 1998 c*) estudaram os efeitos dos íons ferro, cobre, cromo e níquel sobre o crescimento celular específico, em concentrações similares às encontradas em hidrolisados. Os íons cobre e cromo, nas concentrações de até 0,004 g/L e até 0,10g/L , respectivamente, não afetaram significativamente o crescimento celular específico. Mas uma redução de 60% foi observada em meio de cultivo contendo 0,10 g/L do íon Ni.

Quando comparado com processos fermentativos envolvendo meios de cultura sintéticos ou formulados com açúcares e nutrientes comerciais, a

* WATSON, N. E.; PRIOR, B.A.; LATEGAN, P. M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p.451-456, 1984

fermentação de hidrolisados hemicelulósicos sem prévio tratamento de destoxificação se caracteriza por cinética lenta, com rendimento e produtividade limitados (MUSSATO; ROBERTO, 2004), evidenciando a atuação individual e sinérgica dos compostos inibidores presentes nos hidrolisados. Para amenizar, ou mesmo eliminar os efeitos dos inibidores, faz-se necessário o tratamento dos hidrolisados para sua utilização em processos biotecnológicos.

2.5 - Destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos

Visando a obtenção de processos com maior rendimento e produtividade, diversos tipos de tratamento vêm sendo empregados para reduzir as concentrações ou mesmo remover completamente os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, que passam a ter melhor fermentabilidade e maior aplicabilidade em processos biotecnológicos.

Para classificar os vários tipos de tratamentos de hidrolisados, são levados em conta a forma como são realizados (individual ou combinado) e a natureza dos agentes empregados (biológico, físico ou químico).

Métodos biológicos de destoxificação de hidrolisado envolvem o uso de enzimas ou microrganismos específicos que interagem com os compostos inibidores, alterando suas concentrações no hidrolisado. Neste sentido, Jurado et al. (2009) obtiveram 70% de remoção dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado ácido de palha de trigo aplicando a enzima lacase proveniente de duas linhagens de microrganismos diferentes, *Coriolopsis rigida* e *Trametes villosa*. Chandel et al. (2007) obtiveram 77,5% de redução de compostos fenólicos presentes em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando lacase (*C. stercoreus*). Os autores ressaltaram que o tratamento de hidrolisado apenas com a enzima lacase não alterou as concentrações dos compostos furânicos nem mesmo do ácido acético, demonstrando a efetiva especificidade de atuação da enzima sobre os compostos derivados da lignina.

Okuda et al. (2008) utilizaram a bactéria termofílica *Ureibacillus thermosphaericus* na destoxificação de hidrolisado de madeira para a obtenção de etanol. Menos de 5% de açúcar foi consumido, enquanto a porcentagem de HMF foi reduzida em 20% quando utilizado um inóculo com 2,4g/L de concentração celular. Os autores ainda demonstraram que a remoção de

compostos furânicos é diretamente proporcional à concentração do inóculo.

Palmqvist et al. (1997) reportaram a degradação de compostos inibidores presentes no hidrolisado de salgueiro pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, aumentando tanto a produtividade quanto o rendimento de etanol em processo fermentativo, comparado a outros tipos de tratamento do hidrolisado.

A concentração de hidrolisados por evaporação sob vácuo é considerada um método de destoxificação física para reduzir a concentração de compostos voláteis, como ácido acético, furfural e vanilina (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Converti et al. (2000) reportou que a evaporação é capaz de remover ácido acético, furfural e outros compostos voláteis presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, melhorando o processo fermentativo na produção de xilitol.

Outra alternativa para a remoção dos inibidores é a utilização de resinas de troca iônica, e adsorção em carvão ativado. Solenzal et al. (1996) utilizaram um sistema de tratamento composto por colunas empacotadas com diferentes resinas de troca iônica (duas resinas aniônicas de base forte com íons Cl^- e OH^- , uma resina cátionica de ácido forte com íons H^+ e uma resina aniônica de base fraca com íons CO_3^{2-}) para o tratamento de hidrolisado de bagaço de cana. Estes autores compararam o resultado deste tratamento com outro, à base de carvão ativo. Os resultados dos dois tratamentos são apresentados na tabela 2.5.1.

Tabela 2.5.1 - Caracterização do hidrolisado antes e após os tratamentos

Compostos do hidrolisado	Sem tratamento	Carvão ativo	Resinas de troca iônica
L-L-arabinose (g/L)	10,2	6,3	10,1
D-xilose (g/L)	125,0	96,7	117,1
D-glicose (g/L)	10,6	8,6	7,3
Furfural (g/L)	0,2	0,07	ND
Ácido acético (g/L)	11,13	10,31	2,13
Ácido sirínico (g/L)	0,032	ND	ND
Vanilina (g/L)	0,05	ND	ND
Siringaldeído (g/L)	0,076	ND	ND

Fonte - Solenzal et al. 2006. ND - não detectado.

Observa-se maior efetividade na remoção de furfural e ácido acético pelo tratamento com resinas de troca iônica, além de este sistema acarretar em menor perda dos açúcares fermentescíveis. Ambos os tratamentos removeram os compostos fenólicos presentes no hidrolisado original. Os autores não demonstraram a eficiência dos tratamentos na remoção de hidroximetilfurfural.

Carvalho et al. (2005 a) testaram um sistema combinado de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana e compararam com tratamento com uso de carvão ativo em pH 2,5, após tratamento por alteração de pH com CaO, H₃PO₄ e H₂SO₄ (Fig. 2.5.1). O sistema combinado mostrou eficiência sensivelmente superior ao tratamento apenas com carvão ativo. O sistema combinado foi capaz de remover 95% dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado, uma diferença de 16% a mais do que a remoção promovida pelo carvão ativo. Os tratamentos tiveram eficiência semelhante quanto ao ácido acético e ambos removeram completamente o furfural e o 5-hidroximetilfurfural presentes no hidrolisado. Um ponto contrário à utilização do sistema combinado foi a considerável redução da concentração de açúcares fermentescíveis (40%) pelo tratamento. Mas este revés não é exclusivo do tratamento com resinas de troca iônica, ocorrendo também em outros tratamentos, sendo estes químicos, físicos, biológicos ou combinados.

Figura 2.5.1 Sistema combinado de tratamento por resinas de troca iônica e carvão ativado (*fonte: Carvalho, R.J. et al. 2005*)

Um dos tratamentos mais utilizados na destoxificação de hidrolisados é o ajuste do pH, também conhecido como *liming*, e que promove a precipitação de alguns compostos tóxicos bem como ionização de outros. Alves et al. (1998) avaliaram diferentes condições de ajuste do pH de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, combinado com tratamento com carvão ativo, visando conseguir uma condição que favorecesse a produtividade e rendimento na produção de xilitol por via fermentativa. O tratamento que resultou nos melhores valores dos parâmetros citados foi atingida com as seguintes condições: elevação do pH a 7 com CaO, seguida da redução do pH para 5,5 e posterior tratamento com 2,4% (m/v) de carvão ativo. Com este tratamento os autores conseguiram um rendimento máximo de 0,79g/g e produtividade de 0,47 g/L.h após 63 h de fermentação.

Processos de extração com solventes orgânicos também já foram testados como forma de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos. Parajó; Domínguez e Domínguez (1997) avaliaram diferentes solventes orgânicos combinados com o tratamento por *liming*, visando o aumento nos resultados de bioconversão de D-xilose em xilitol, utilizando hidrolisado de cavacos de eucalipto. Os solventes clorofórmio, tricloroetileno, acetato de etila, éter etílico e hexano foram utilizados para extração direta ou posterior ao tratamento por *liming*. Após os dois tratamentos, ainda foi avaliada a adsorção em carvão ativo. Os melhores resultados foram alcançados com hidrolisados que, após serem tratados por *liming*, passaram por extração com éter etílico, tratados ou não com carvão ativo. Com esta combinação de tratamentos, os autores obtiveram uma produtividade volumétrica de 1,1g/L.h, e rendimento de xilitol na ordem de 0,7g/g.

O destacado efeito na remoção de compostos fenólicos é um dos principais atrativos na utilização de solventes orgânicos (CRUZ et al., 1999; PARAJO; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997). Outros pontos favoráveis são a fácil recuperação dos solventes utilizados (CRUZ et al., 1999) e o bom desempenho na bioconversão da D-xilose presente no hidrolisado tratado em produtos de interesse comercial, tal como o xilitol, quando combinado com outros tratamentos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997).

Não há na literatura consultada algo a respeito de alterações nos teores de ácido acético em hidrolisados que passaram por extração com solventes orgânicos. Provavelmente, a ineficiência deste sistema de destoxificação na

remoção deste ácido orgânico justifique a combinação de diferentes tratamentos à extração.

Uma alternativa para a remoção de ácidos orgânicos em sistemas de extração com solventes imiscíveis seria a dissolução de aminas alifáticas, com cadeias carbônicas longas, em solventes orgânicos. Esta metodologia foi utilizada por Tung; King (1994) para a recuperação de ácidos orgânicos produzidos em processos fermentativos. Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008) utilizaram um sistema de extração com interface imobilizada em membranas de fibra oca, visando a remoção principalmente do ácido acético. Para tanto adicionaram à fase orgânica dois diferentes compostos de amônio, Alamina 336 (tri-octil/decil amina, de cadeia longa, insolúvel em água) e Aliquat 336 (sal quaternário de amônio produzido pela metilação de tri-octil/decil amina). Estas aminas extratoras foram dissolvidas em octanol, solvente considerado ideal pelos autores devido a sua imiscibilidade na fase aquosa, viscosidade adequada e por estabilizar, através de ligações de hidrogênio, o complexo formado pela amina e os ácidos. Nos experimentos, os autores bombearam a fase orgânica pelo exterior das fibras ocas, enquanto o hidrolisado foi bombeado pelo interior das fibras. A interface fase orgânica/fase aquosa localizava-se na face interna da membrana, uma vez que esta era hidrofóbica. No entanto, mantendo-se a pressão da fase aquosa, no interior da membrana, levemente superior à pressão externa, mantém-se estável a interface, evitando a difusão da fase orgânica na fase aquosa, conforme sugerido por Kiani; Bhave e Sirkar (1984). Avaliando o tratamento de hidrolisado hemicelulósico de folhagem de milho, com pH inicial em torno de 1, estes autores obtiveram a remoção de mais de 60% do ácido acético utilizando uma mistura octanol/alamina 336 na razão de 50:50 (% m/m). Além do ácido acético os autores constataram considerável remoção de ácido sulfúrico, elevando o pH do hidrolisado a valores viáveis ao processo fermentativo.

Eyal e Canari (1995) descreveram os principais mecanismos de extração de ácidos por extrativos a base de aminas. Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008), com base nos mecanismos propostos por Eyal e Canari (1995) justificaram a utilização de aminas em sua pesquisa pela formação de pares iônicos entre a amina e prótons H^+ . A formação de par de íons acontece quando a amina é suficientemente básica, e o ácido suficientemente forte, para ligar um próton, formando o cátion amônio (no caso da Alamina 336). Considerando que o

ácido sulfúrico é um ácido forte, pode-se esperar que sua remoção do hidrolisado, em quantidade significativa, seja justificada por este mecanismo de acordo com as seguintes expressões*:

Com relação ao ácido acético, em valores de pH abaixo de seu pK_a , sua forma protonada será extraída do hidrolisado. Segundo Barrow e Yerger (1954) a molécula de ácido acético reage com a amina para formar um par iônico. Isso permite que a amina se ligue a uma segunda molécula de ácido por ligação de hidrogênio que ocorre, provavelmente, no grupo carbonila da primeira molécula ligada à amina.

Além da remoção de ácidos, o método estudado por Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008) foi capaz de remover também outros compostos orgânicos inibidores do metabolismo microbiano, tais como os compostos fenólicos e outros derivados da lignina solúveis em ácido. Esta remoção foi observada por espectrofotometria, através de uma varredura de absorbância em comprimentos de onda distintos, em que diferentes picos referentes aos compostos inibidores tiveram suas áreas reduzidas (Fig. 2.5.2). As interpretações dos picos de absorbância foram feitas de acordo com a metodologia proposta por Martinez et al. (2000). O pico formado na região de 280 nm refere-se aos compostos furfural e hidroximetilfurfural. A redução na área do pico referente ao hidrolisado tratado indica a extração destes compostos furânicos em octanol. As absorbâncias em regiões inferiores a 225 nm e acima de 320 nm também são reduzidas após tratamento. Estas regiões são atribuídas à lignina solúvel em ácido e compostos fenólicos, respectivamente.

* Modificado de Eyal; Carari, 1995.

Figura 2.5.2 - Espectros de absorvância de hidrolisado de folhagem de milho antes e após tratamento por extração com membranas. *Fonte: Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008)*

Além de eficiente, o sistema de extração com interface imobilizada pode superar diversos fatores complicadores dos tradicionais métodos de extração, como, por exemplo, a dispersão de uma fase em outra, necessitando tempo adicional de processo para coalescência das fases após a extração, problemas com emulsificações e dificuldades no aumento de escala. No entanto, Alamina 336 comercial pode conter aminas de baixo peso molecular que podem passar para a fase aquosa e afetar os rendimentos dos processos fermentativos em que os hidrolisados são tratados por este método (GRZENIA; SCHELL; WICKRAMASINGHE, 2008).

Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2008) removeram cerca de 60% do ácido acético presente em hidrolisado de folhagens de milho utilizando uma mistura composta por 50% de Alamina 336 e 50% de octanol. Além disso, constataram a remoção de ácido acético com consequente elevação do pH a níveis que favorecem processos fermentativos, bem como remoção de compostos derivados da lignina. Estes resultados dão perspectivas favoráveis a utilização do sistema de extração com interface imobilizada para destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, faz-se necessário a avaliação do efeito deste tratamento sobre a fermentabilidade do hidrolisado, a fim de investigar possíveis efeitos tóxicos do solvente e da Alamina 336 sobre o metabolismo das leveduras.

2.6 - Propriedades e Produção biotecnológica de xilitol

O xilitol é um álcool pentahidroxilado, com poder adoçante equivalente ao da sacarose. É uma substância encontrada em fontes naturais como frutas, cogumelos e legumes. Além disso, trata-se de um intermediário do catabolismo de carboidratos no metabolismo humano (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

A grande variedade de aplicações do xilitol garante-lhe grande importância econômica e social, implicando grandes esforços por parte dos pesquisadores no desenvolvimento de novas formas de obtenção deste produto. Propriedades alimentícias, odontológicas e farmacológicas são as principais motivadoras na busca de tecnologias que tornem o xilitol um produto mais acessível a população.

As principais propriedades odontológicas do xilitol são a sua atividade anticariogênica e a indução da remineralização do esmalte dos dentes. Os microrganismos responsáveis pela cárie dentária, dentre eles o *Streptococcus mutans*, são incapazes de metabolizar o xilitol como fonte de carbono, evitando a formação dos ácidos orgânicos que atacam o esmalte dos dentes (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI 2001, ALANEN; HOLSTI PIENIHAKKINEN, 2000, AUTIO, 2002). Além disso, o xilitol promove a reversão de lesões recém formadas no esmalte dentário devido ao aumento significativo de íons cálcio e fosfato na saliva provocado pela presença do poliol (MARTON, 2005; MÄKINEN, 2000; AUTIO, 2002). Uhari, Tapiainen e Kontiokari (2001) observaram que o xilitol é eficiente na prevenção a otite média aguda em crianças. Este efeito deve-se à inibição da aderência dos microrganismos patógenos às células da nasofaringe. A eficiência do xilitol contra estes microrganismos foi observada quando as células, microrganismos ou ambos foram expostos a soluções com 5% de xilitol.

O xilitol é também um edulcorante de grande valor para a indústria de alimentos. A utilização do xilitol é uma alternativa na dieta de diabéticos, pois este adoçante não requer insulina para ser metabolizada (SILVA et al., 1994). Além disso, pode ser utilizado em processos que empregam elevadas temperaturas, uma vez que o xilitol não participa de reações de escurecimento do tipo *Maillard* (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

Mattila et al. (2002) avaliaram o potencial de utilização do xilitol na prevenção do enfraquecimento das propriedades biomecânicas dos ossos. Os

autores usaram ratos para os testes *in vivo* e observaram que a inclusão de quantidades moderadas de xilitol na dieta leva a uma melhora nas propriedades biomecânicas de ossos. Esses resultados foram observados principalmente em ratos machos com idade avançada.

Ferreira et al. (2008) investigaram a influência do xilitol na interação entre macrófagos e o parasita *Leishmania amazonensis*. O xilitol estimulou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Este composto está intimamente relacionado à inibição da respiração mitocondrial da *Leishmania*, exercendo importante contribuição no controle da doença causada por este parasita.

O xilitol não apresenta uma toxicidade que represente risco à saúde humana, sendo uma substância GRAS, que apresenta como únicos efeitos colaterais conhecidos a diarreia osmótica e o desconforto abdominal, ocasionados pela ingestão de grande quantidade deste produto. A dose máxima diária recomendada é de 20g (ELIAS; PINZAN; BASTOS, 2006; MATTILA et al., 2002).

A produção industrial do xilitol atualmente é feita pela redução catalítica da D-xilose pura obtida de fontes renováveis, os materiais lignocelulósicos. Este processo depende do emprego de altas pressões e temperaturas, além de outros processos dispendiosos de purificação nas fases de "*upstream*" e "*downstream*", aumentando o custo do produto final (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b). A purificação da D-xilose, mesmo após separação por resinas de troca iônica e fracionamento cromatográfico, é dificultada pela presença de apreciáveis quantidades de D-galactose, D-manose e L-L-arabinose (MARTINEZ et al., 2007). Já na etapa de hidrogenação da D-xilose, a presença de subprodutos como por exemplo a xilulose formada por isomerização de D-xilose, pode prejudicar o processo (SARROUH, 2009).

A produção biotecnológica do xilitol é uma alternativa à via química. A D-xilose presente em hidrolisados hemicelulósicos pode ser convertida a xilitol por determinados microrganismos (BARBOSA et al., 1988), sem a inconveniente necessidade de purificação da D-xilose e emprego de altas pressões e temperaturas (CUNHA, 2006; SANTOS, 2005). As condições operacionais utilizadas na produção biotecnológica do xilitol, além de menos complicadas, tornam o processo mais barato, refletindo no valor do produto final.

Muitas pesquisas têm sido feitas no Brasil para viabilizar a produção biotecnológica de xilitol, principalmente utilizando bagaço de cana-de-açúcar

como matéria prima. Estes trabalhos envolvem a busca de microrganismos capazes de produzir xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos (BARBOSA et al., 1988) bem como a busca por condições operacionais que favoreçam o maior rendimento e produtividade do processo (CARVALHO et al. 2005; SILVA et al. 2003; MARTINEZ et al., 2003; FELIPE et al., 1997ab). A figura 2.6.1 resume as principais etapas bioquímicas da assimilação da D-xilose.

Figura 1.6.1 - Representação esquemática do metabolismo de D-xilose em leveduras: *PPP*, via Pentose Fosfato; *EMP*, via Embden-Meyerhof-Parnas; Rib5P, ribose-5-fosfato; S7P, sedoheptulose-7-fosfato; Gliceral3P, gliceraldeído-3-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; Eri4P, eritrose-4-fosfato; XR, xilose redutase; XDH, xilitol desidrogenase (fonte: CUNHA, 2006).

O metabolismo de D-xilose inicia-se pelo transporte do açúcar pela membrana celular. Este transporte pode acontecer por mecanismos de baixa afinidade, pelo compartilhamento dentre D-xilose e D-glicose, ou por transporte de alta afinidade, onde acontece a inibição do transporte de D-xilose pela presença da D-glicose. No interior da célula, a D-xilose é reduzida a xilitol por reação

catalisada pela enzima xilose redutase (E. C. 1.1.1.21) dependente dos cofatores NAD(P)H ou NADH. O xilitol é posteriormente oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E. C. 1.1.1.9) que utiliza como co-fatores o NAD^+ ou NAD(P) $^+$. A xilulose, na sequência, é fosforilada a xilulose-5-fosfato, que, na via das fosfopentoses, é convertida em frutose-fosfato, que pode ser convertida em piruvato, integrando à via Embden-Meyerhof-Parnas, que está conectada a outras vias, como o ciclo de Krebs e às reações de fermentação alcoólica (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

Há uma íntima relação entre a especificidade da enzima xilose redutase aos cofatores NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do microrganismo, com sua posterior excreção para o meio de cultivo. Quando a atividade da xilose redutase de determinado microrganismo é dependente de NADH ou NADPH, o cofator NAD^+ gerado na redução da D-xilose a xilitol pode ser recuperado na etapa seguinte, seja em condições anaeróbias ou em ambiente com oxigênio limitado. Neste caso e sob tais condições, o principal produto do metabolismo de D-xilose é o etanol, sem o acúmulo de xilitol. Entretanto, quando a atividade da D-xilose redutase de um dado microrganismo depende apenas de NADPH, sob condições de oxigenação limitada, observa-se acúmulo de xilitol, uma vez que, nestas condições, a capacidade da cadeia respiratória na recuperação do cofator NAD^+ é baixa, diminuindo a atividade da xilitol desidrogenase e diminuindo a taxa de transformação de xilitol em xilulose (NÁHLIK et al., 2003). Ainda neste caso, o NADPH necessário à redução da D-xilose catalisada pela xilose-redutase é suprido graças à integração da via das pentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas, uma vez que 1 mol de glicose-6-fosfato (composto que pode ser produzido a partir de parte da D-xilose metabolizada) pode ser oxidado completamente a CO_2 e H_2O , gerando 12 moles de NADPH a partir de 12 moles de NADP^+ (CARVALHO et al., 2002b).

Barbosa et al. (1988) propõe um rendimento teórico de 0,9 moles de xilitol para cada mol de D-xilose metabolizado. No entanto, o metabolismo de D-xilose em leveduras gera outros produtos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a), dentre eles o etanol.

2.7 - Produção biotecnológica de etanol de segunda geração por leveduras fermentadoras de D-xilose

O etanol é provavelmente o mais antigo produto obtido pela biotecnologia tradicional. Atualmente a produção de bebidas, produtos químicos e combustível são as principais aplicações do etanol, sendo que esta última ganhou grande importância na década de 70 quando, após uma grande "crise do petróleo" programas como o PROÁLCOOL no Brasil e GASOHOL, nos Estados Unidos destacaram a importância de fontes alternativas de energia (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

De um modo geral, o etanol pode ser obtido pela fermentação de açúcares ou pela via química de síntese, a partir da hidratação do etileno. O processo fermentativo é responsável por cerca de 90% da produção mundial de etanol, sendo os 10% restantes produzidos sinteticamente (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

A produção do etanol por processo biotecnológico geralmente é realizada em três etapas: a obtenção da solução de açúcares fermentescíveis, a fermentação destes açúcares a etanol e a separação e purificação de etanol por destilação (DEMIRBAS, 2005).

A principal matéria prima utilizada na produção de etanol provém de produtos agrícolas, sendo que a cana-de-açúcar e açúcar de beterraba correspondem a 60% dessa matéria prima e o restante corresponde a grãos, principalmente o milho (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Da cana-de-açúcar obtém-se um caldo rico em sacarose que é prontamente assimilável por microrganismos, neste caso em especial a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em processos que utilizam amido de cereais tal qual o milho é necessário que se faça a hidrólise enzimática para sacarificação do amido antes do processo fermentativo. A produção de etanol utilizando as matérias primas citadas utiliza processos já bem estabelecidos (SANCHEZ et al., 2004).

Mudanças mais radicais na tecnologia de produção do etanol estão diretamente ligadas aos processos que possibilitarão a utilização de novas matérias-primas, como a biomassa lignocelulósica. Diferente do etanol convencional, o etanol de segunda geração, também chamado de bioetanol (GREY; ZHAO; EMPTAGE, 2006) é produzido com base em materiais da

biomassa lignocelulósica. Os processos de produção de etanol a partir desta biomassa são referidos como uma segunda geração de biocombustíveis, cujo processamento vem sendo considerado uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento (CEC, 2006). Essas novas tecnologias de processamento do etanol são fundamentais, sobretudo nos países desenvolvidos, em que as matérias-primas hoje utilizadas competem com a produção de alimentos e os custos de produção são altos quando comparados com o petróleo ou o etanol da cana. A produção de etanol lignocelulósico emerge assim, como um novo paradigma mundial (TECHNOLOGY ..., 2006).

A produção do etanol de segunda geração envolve etapas bem mais complexas para a obtenção de açúcares fermentescíveis quando comparado aos processos já estabelecidos de obtenção desse álcool (Fig. 2.7.1), como o emprego de condições mais severas no processo de hidrólise ácida, além de, na maioria dos casos, haver a necessidade de etapas de pré-tratamento antes da hidrólise enzimática e destoxificação da solução de açúcares obtida (MOSIER et al., 2005).

Figura 2.7.1 - Fluxograma simplificado da produção de etanol de matéria prima lignocelulósica (modificado de U.S. Department of Energy - 2010)

Assim como na produção biotecnológica de outros produtos, a assimilação da D-xilose para obtenção de etanol está condicionada a capacidade de alguns microrganismos produzirem as enzimas xilose-redutase e xilitol desidrogenase. Estas enzimas são responsáveis por duas reações de oxi-redução da D-xilose, que primeiramente é convertida a xilitol pela enzima xilose-redutase, dependente de NADPH ou NADH. Posteriormente o xilitol é reduzido a xilulose pela enzima

xilitol desidrogenase. A xilulose então é fosforilada pela enzima xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que será metabolizado na via das fosfopentoses. Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, que são a frutose-6-P e gliceraldeído-3-P, integram a via Embden Meyerhof-Parnas, resultando na formação de piruvato, o qual pode ser oxidado pelo Ciclo de Krebs, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, onde há a reoxidação da NADH resultante da oxidação do gliceraldeído-3-P (SILVA, 2007).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na produção industrial de etanol. No entanto, cepas nativas de *S. cerevisiae* não conseguem utilizar as pentoses provenientes da hemicelulose como fonte de carbono e energia. Porém, algumas espécies de leveduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são capazes de fermentar D-glicose e D-xilose a etanol (SANCHEZ *et al.*, 2002). Entre as leveduras fermentadoras de D-xilose, destacam-se linhagens de *P. stipitis* para aplicação industrial por apresentarem características desejáveis em microrganismos para fim industrial, tais como altos rendimentos de etanol e considerável resistência a esse produto (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999).

Sendo assim, diversos são os desafios para tornar viável a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Dentre estes podemos destacar a otimização do processo de pré-tratamento para diferentes tipos de biomassa; obtenção de enzimas mais eficientes na hidrólise de celulose e hemicelulose; desenvolvimento de microrganismos mais eficientes para fermentação e redução nos custos de produção de enzimas capazes de produzir monômeros de açúcares pela ação sobre a lignocelulose e celulose.

3 - Objetivos

3.1 - Geral

Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia que permita melhor destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, para o seu aproveitamento biotecnológico.

3.2 - Específicos

- Destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (concentrado) por diferentes tratamentos: alteração de pH acoplado a adsorção em carvão ativo; tratamento utilizando as resinas de troca iônica A-860S, A-500PS e C-150 (Amberlite™); e extração líquido/líquido com interface imobilizada em membranas de fibra oca;
- Avaliar a remoção de compostos inibidores e a perda de açúcares fermentescíveis após cada um dos tratamentos;
- Avaliar e comparar entre si a fermentabilidade dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar tratados pelos métodos em estudo, na produção de etanol e xilitol.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar, doado pela Usina "Companhia Açúcareira Vale do Rosário" - Ortolândia/SP, foi exposto ao sol para secagem e, posteriormente, foi armazenado em sacos com, aproximadamente, 15 Kg, em local seco e arejado.

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em reator de aço inox, com 100 litros de volume operacional, aquecido por injeção direta de vapor. A reação de hidrólise ocorreu em regime descontínuo nas seguintes condições: temperatura de 150°C e tempo de residência de 30 min. Foi utilizado ácido sulfúrico (98% p/p de pureza) como catalisador da reação, numa proporção de 100mg de ácido para 1g de bagaço (matéria seca) e relação sólido/líquido de 1:10 (uma parte de bagaço seco para cada dez partes de solução ácida). Após a hidrólise, o licor foi filtrado para remoção de frações sólidas presente no hidrolisado.

O hidrolisado foi fracionado em bombonas e armazenado em câmara fria a uma temperatura aproximada de 4°C.

O hidrolisado foi caracterizado antes e após as etapas de concentração quanto aos valores de pH, concentração de açúcares, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenóis totais.

Figura 4.3 - Reator utilizado para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

4.2 - Concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Uma parte do hidrolisado obtido foi submetido ao processo de concentração sob condição de vácuo, a uma temperatura de $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ com o objetivo de aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis, principalmente a D-xilose.

Para o processo de concentração foi utilizado um concentrador à vácuo com 28 litros de capacidade nominal operado de forma descontínua. O hidrolisado original teve seu volume inicial reduzido cinco vezes ($\text{FC} = 5$). O hidrolisado concentrado foi armazenado em galões, em câmara fria a 4°C , para posterior utilização.

4.3 - Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Antes de qualquer tipo de tratamento e após cada uma das etapas dos diferentes tratamentos, foram determinados as concentrações de açúcares (D-xilose, D-glicose e L-L-arabinose), ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, lignina solúvel e absorbância relativa do hidrolisado.

4.4 - Tratamentos aplicados ao hidrolisado para remoção de compostos tóxicos

4.4.1 - Tratamento por alteração de pH conjugado com carvão ativo

O tratamento por alteração do pH do hidrolisado foi feito de acordo com as condições determinadas por ALVES et al. (1998). Ao hidrolisado de bagaço de cana foi adicionado óxido de cálcio (CaO) suficiente para elevação do pH a 7.0 (Fig. 4.4.1). Na sequência, foi utilizado H_3PO_4 para redução do pH do hidrolisado para pH 5.5. Posteriormente, foi adicionado carvão ativo ao hidrolisado na concentração de 2,4% (m/v), e agitado a uma velocidade de 200 rpm, a uma temperatura de 30°C por 60 min. A cada etapa deste processo o hidrolisado resultante foi filtrado para remoção de sólidos em suspensão e uma alíquota do hidrolisado foi analisada para caracterização.

Figura 4.4.1 - Sistema utilizado no tratamento por elevação de pH

4.4.2 - Tratamento com resinas de troca iônica

Foram utilizados três tipos distintos de resinas de troca iônica, as aniônicas A-860S (resina acrílica de troca aniônica fortemente básica), A-500PS (resina macroporosa de troca aniônica fortemente básica), na forma OH^- e a catiônica C-150 (resina de troca catiônica fortemente ácida), na forma H^+ , nesta ordem, todas da marca Amberlite. As resinas aniônicas foram ativadas com solução de NaOH 10% (m/v) e a catiônica com solução de HCl 0,2% (v/v). Tanto para a ativação e regeneração das resinas, quanto para o tratamento do hidrolisado, foi utilizada a proporção de uma parte de resina para duas partes de líquido (medida em volume), sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C, por 30 min.

4.4.3 - Tratamento por extração líquido - líquido com interface imobilizada em membrana

O tratamento foi realizado em bateladas descontínuas para o tratamento de 1000 mL de hidrolisado.

A

B

Figura 4.4.3.1 - (A) módulo de membrana utilizado no tratamento por extração, (B) sistema completo para o tratamento por extração com membranas

Para imobilização da interface, foi utilizado o módulo de membrana de fibras ocas LiquiCel MiniModule® Membrane Contactors 1 x 5.5 (Membrana, Charlotte, NC - USA. Fig. 4.4.3.1 A). A fase aquosa foi constituída pelo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, filtrado em membranas com poros de $0,22\ \mu\text{m}$ e foi bombeada pelo interior das membranas, enquanto a fase orgânica, composta por uma mistura de Alamina 336™ e octanol foi bombeada pelo exterior das fibras de membrana. A relação volumétrica entre a fase orgânica e a fase aquosa durante os tratamentos foi de 1:1.

Para promover o fluxo tanto da fase aquosa quanto da fase orgânica, foram utilizadas bombas peristálticas. As bombas foram ajustadas de forma a permitir um fluxo de $600\text{mL}/\text{min}$, para ambas as fases. Uma presilha foi colocada na mangueira de saída da fase aquosa de forma a promover uma pressão levemente

superior no interior das membranas na intensão de prevenir a mistura e perda da fase orgânica na fase aquosa.

A duração do tratamento foi de 3,5 h. O pH foi monitorado continuamente, mantendo-se o eletrodo do pHmetro imerso na fase aquosa durante todo o tratamento.

A figura 4.4.3.2 mostra a configuração do sistema para a realização do tratamento.

Figura 4.4.3.2 - Configuração do sistema de tratamento por extração líquido-líquido com suporte de interface (*adaptado de GRZENIA et al. 2008*).

4.4.3.1 - Determinação da proporção entre octanol/alamina para composição da fase orgânica

Para definir a relação octanol : Alamina 336 a ser utilizada no tratamento do hidrolisado concentrado de bagaço de cana-de-açúcar, foram realizados alguns experimentos de extração em bateladas. Em cada experimento, 5 mL de hidrolisado foi tratado com o mesmo volume de fase orgânica, em tubos de 15 mL para centrifuga. A variação na composição da fase orgânica seguiu o plano mostrado na tabela 4.4.3.1.1. Os tubos contendo a fase orgânica e a fase aquosa foram agitados com auxílio de aparelho vortex por 30 s e posteriormente deixados em repouso por 10 min. Após este período, os tubos foram centrifugados à 500 rpm por 10 min. A fase aquosa (hidrolisado) foi removida com auxílio de pipeta e

foi determinada a concentração de ácido acético em cada amostra. Foi utilizada para os ensaios de destoxificação a proporção octanol : Alamina 336 que promoveu maior remoção de ácido acético do hidrolisado.

Tabela 4.4.3.1.1 - Composição da fase orgânica nos experimentos de extração em batelada para determinação da relação octanol : Alamina 336 a ser utilizada nos experimentos de destoxificação

Experimento	Volume de alamina na fase orgânica (% v/v)
1	0
2	30
3	50
4	70

4.5 - Avaliação dos tratamentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão de D-xilose em etanol e xilitol

4.5.1 - Processo Fermentativo

4.5.1.1 - Microrganismos e preparo dos inóculos

Os experimentos foram realizados com as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037 e *Pichia stipitis* IMH 43.2, obtidas a partir de culturas estoque, mantidas em ágar extrato de malte à 4°C.

O inóculo de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi obtido a partir destas culturas estoque, recém repicadas em ágar extrato de malte (incubadas por 48 horas). Uma alçada de cultura recém repicada foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo constituído de (g/L): D-xilose (30,0), sulfato de amônio (2,0), cloreto de cálcio di-hidratado (0,1) e extrato de farelo de arroz (20,0) preparado previamente. O cultivo foi realizado em incubadora de movimento rotatório com agitação de 200 rpm, a 30°C por 24 h. As células foram recuperadas por centrifugação, lavadas em água destilada esterilizada e centrifugadas novamente com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, foi adicionado água estéril para preparar uma suspensão de células que foi utilizada como inóculo.

Quando trabalhou-se com a levedura *P. stipitis* IMH 43.2, utilizou-se as mesmas condições para o preparo de inóculo, alterando-se apenas a formulação do meio de cultivo, que passou a ter a seguinte constituição (g/L): D-xilose (30), uréia (3,0), sulfato de magnésio (1,0) e extrato de levedura (3,0).

4.5.1.2 - Meio de Fermentação e condições de cultivo

Os meios foram formulados a partir do hidrolisado hemicelulósicos concentrado, após cada um dos tratamentos, suplementados com os mesmos nutrientes empregados no preparo dos inóculos e distribuídos em foscos Erlenmeyer de 125 ml com 50 mL de meio cada.

Cada frasco foi inoculado com 0,05 g de células suspensas em água destilada estéril.

As fermentações foram realizadas durante 72 h, a 30°C e 200 rpm em agitador orbital, sem controle do pH. As amostras foram retiradas em intervalos de 12 h.

4.6 - Métodos analíticos

4.6.1 - Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar

O teor de umidade do bagaço de cana foi determinado por meio da secagem de amostra de bagaço em balança de infravermelho a 105°C (determinador de umidade MARTE ID50) até peso constante.

4.6.2 - Determinação do pH

Para a determinação do pH das amostras, bem como o controle do pH durante os tratamentos, foi utilizado pH-metro BEL ENGINEERING W3B.

4.6.3 - Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e etanol

As amostras foram diluídas e filtradas em filtros Sep Pack C18 (MILLIPORE) para determinação da concentração de açúcares (D-xilose, D-

glicose e L-arabinose), xilitol, etanol e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em cromatógrafo WATERS (Milford, MA, EUA), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8mm) e detector de índice de refração. As amostras foram analisadas nas seguintes condições: temperatura de 45°C, eluente ácido sulfúrico 0,01N, fluxo 0,6 mL/min e volume de amostra 20µL, com tempo de retenção de 30 minutos.

4.6.4 - Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

As amostras após diluição apropriada, foram filtradas em membrana HÁ em éster de celulose de 0,45µm de poro e 13mm de diâmetro (MILLIPORE, EUA). A concentração de furfural e hidroximetilfurfural foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento WATERS 2487/USA, equipado com detector UV e coluna Resolve™ C18 WATERS 3,9 x 300 nm, nas seguintes condições: temperatura de 25°C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:8 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,9 mL/min; volume de amostra de 20 µL.

4.6.5 - Determinação da concentração de fenóis totais

A concentração dos compostos fenólicos totais existentes no hidrolisado hemicelulósico devido à solubilização parcial da lignina, causada pela ação do ácido sulfúrico sobre a lignina, foi determinada pelo método descrito por ROCHA (2000). Uma alíquota de 5mL do hidrolisado teve o pH elevado até 12, com NaOH 6,0 M e foi diluída em um balão volumétrico de 50mL. A solução foi analisada por espectroscopia de UV. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 280 nm, usando-se água destilada como referência. Para a determinação da concentração de lignina, o valor da absorbância lida foi incluída na seguinte equação:

$$C_{lig} = 4,187 \times 10^{-2} (A_{lig280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4} [g/L]$$

sendo:

C_{lig} – concentração de lignina, em g/L;

A_{lig280} – absorbância em 280 nm;

$A_{pd280} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2$, sendo C_1 e C_2 as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural determinados por HPLC anteriormente e ε_1 e ε_2 os coeficientes

de extinção para o furfural e hidroximetilfurfural ($146,85 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $114,00\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente) determinados por espectroscopia de UV em 280 nm.

4.6.6 - Determinação da absorbância relativa (A.R.)

A comparação da remoção dos compostos fenólicos e furânicos dos diferentes tratamentos foi feita através da absorbância relativa dos hidrolisados após os tratamentos.

Para tanto, uma aliquota de 5 mL de hidrolisado teve o pH elevado a 12 pela adição de NaOH 6,0 M. O hidrolisado foi transferido volumetricamente para um balão volumétrico de 100 mL. Após diluição, a absorbância do hidrolisado foi determinada por espectroscopia, com $\lambda=280 \text{ nm}$. O valor foi multiplicado pela diluição ($FD=100$) para obtenção da absorbância relativa.

4.7 - Determinação das porcentagens de remoção dos compostos tóxicos e dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

As porcentagens de remoção dos compostos inibidores (%RCI) foram calculadas pela relação entre as massas destes compostos no início ($CI_{inicial} \times Vol_{inicial}$) e no término ($CI_{final} \times Vol_{final}$) do processo de destoxificação em análise, de acordo com a seguinte equação:

$$\%RCI = [(CI_{inicial} \times Vol_{inicial} - CI_{final} \times Vol_{final}) / CI_{inicial} \times Vol_{inicial}] \times 100$$

A absorbância relativa foi tratada da mesma maneira que as concentrações de compostos inibidores, sendo comparada de acordo com o volume final de hidrolisado após o tratamento.

Da mesma forma, as porcentagens de remoção (perda) de açúcares (%RA) foram calculadas pela relação entre as massas desses açúcares no início ($CA_{inicial} \times Vol_{inicial}$) e no término ($CA_{final} \times Vol_{final}$) do processo de destoxificação, de acordo com a equação seguinte:

$$\%RA = [(CA_{inicial} \times Vol_{inicial} - CA_{final} \times Vol_{final}) / CA_{inicial} \times Vol_{inicial}] \times 100$$

4.8 - Parâmetros de bioconversão

4.8.1 - Fator de rendimento em xilitol e/ou etanol ($Y_{P/S}$ em g/g)

Os fatores de rendimento em xilitol e etanol foram determinados pela relação entre a quantidade de xilitol e etanol produzidos e as correspondentes variações de D-xilose, conforme equação abaixo:

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S = (P_f - P_i) / (S_f - S_i)$$

sendo:

$Y_{P/S}$ = fator de rendimento em xilitol / etanol (g/g)

P_f = concentração final de xilitol / etanol (g/L)

P_i = concentração inicial de xilitol / etanol (g/L)

S_f = concentração final de D-xilose (g/L)

S_i = concentração inicial de D-xilose (g/L)

4.8.2 - Produtividade volumétrica em xilitol / etanol (Q_P , em g/L.h)

Foi determinada pela razão entre a quantidade de xilitol / etanol produzida e o intervalo do tempo correspondente, conforme a equação que segue:

$$Q_P = \Delta P / \Delta t = (P_f - P_i) / (t_f - t_i)$$

Sendo:

Q_P = produtividade volumétrica em xilitol / etanol (g/L.h)

Δt = intervalo de tempo do processo fermentativo

P_f = concentração final de xilitol / etanol (g/L)

P_i = concentração inicial de xilitol / etanol (g/L)

t_f = tempo final do processo fermentativo (h)

t_i = tempo inicial do processo fermentativo (h)

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado original, bem como o hidrolisado concentrado, foram caracterizados quanto às concentrações dos açúcares, compostos inibidores e pH. Os resultados são apresentados na tabela 5.1.1.

Tabela 5.1.1 - Caracterização do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida, anterior e posterior à concentração.

Características		Hidrolisado	
		Sem concentrar	Concentrado (FC = 5*)
pH		1,10	0,74
Açúcares (g/L)	D-xilose	12,67	59,91
	L-L-arabinose	1,34	6,17
	D-glicose	1,51	5,67
Compostos inibidores (g/L)	Fenóis	4,01	11,23
	Ácido acético	1,76	3,55
	Furfural	0,31	0,03
	hidroximetilfurfural	0,03	0,09

*FC - Fator de Concentração

Observa-se nos resultados uma queda considerável do pH (de 1,10 para 0,74). Este fato justifica-se tanto pelo aumento da concentração dos íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar quanto pela concentração dos ácidos orgânicos presentes no hidrolisado, tal qual o ácido acético. Este fato foi observado em outros trabalhos (ALVES, 1998; MARTON, 2005).

Com relação aos açúcares, os resultados demonstram que, tanto no hidrolisado original quanto no hidrolisado concentrado, o açúcar predominante é a D-xilose (12,67g/L e 59,91g/L, respectivamente). A L-L-arabinose e a D-glicose

apresentaram concentrações inferiores à concentração de D-xilose, sendo que no hidrolisado original as concentrações foram de 1,34g/L e 1,51g/L respectivamente e, no hidrolisado concentrado 5 vezes a concentração de L-arabinose chegou a 6,17g/L e a de D-glicose foi de 5,67g/L. Baixas concentrações de D-glicose e L-arabinose também foram observadas anteriormente por outros autores (ALVES et al, 1998; MARTON, 2005).

Na composição do hidrolisado concentrado cinco vezes (FC=5), observa-se um aumento proporcional dos açúcares, principalmente nas concentrações de D-xilose e L-L-arabinose. A concentração de D-xilose foi de 4,7 vezes, enquanto que a concentração da L-L-arabinose foi de 4,6 vezes. Já a concentração da D-glicose foi de 3,8 vezes, sensivelmente inferior à concentração das pentoses analisadas, resultando em um ligeiro aumento na relação xilose/glicose, que passou de 8,39 para 10,67. Dessa forma, o aumento da concentração de D-xilose em relação à D-glicose pode ser visto como um fator positivo para a utilização em bioprocessos, uma vez que a presença dessa hexose em determinadas concentrações inibe o metabolismo de D-xilose por leveduras por afetar o sistema de transporte de açúcares ou a cinética enzimática em casos em que ambos os açúcares competem pelo mesmo sistema de transporte ou são simultaneamente metabolizados (LEE et al., 1997; GIRIO et al. 2000; SILVA et al., 2004b; WALTHER; HENSIRISAK; AGBLEVOR, 2001).

Além da concentração de açúcares, o processo de concentração promove alterações nos conteúdos dos compostos inibidores do metabolismo microbiano. Neste trabalho, os compostos com potencial inibidor analisados foram os compostos fenólicos (fenóis), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, sendo que após os tratamentos para destoxificação do hidrolisado os compostos fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural foram incluídos em um único parâmetro, a absorbância relativa (A.R.). Dentre estes compostos os fenóis foram os inibidores encontrados em maior concentração no hidrolisado, tanto original quanto no concentrado.

O efeito de proporcionalidade no aumento da concentração dos açúcares observado não foi verificado nos compostos inibidores. A concentração dos compostos fenólicos aumentou de 4,01g/L para 11,23g/L, um aumento de concentração de 2,8 vezes. O ácido acético teve sua concentração aumentada em 2,01 vezes, de 1,76g/L para 3,55g/L. A concentração de hidroximetilfurfural

aumentou de 0,03g/L para 0,09g/L (aumento em 2,71 vezes) e a concentração do furfural diminuiu de 0,31g/L para 0,03g/L (redução de 10,33 vezes). Rodrigues et al. (2001) observaram comportamento semelhante nas concentrações dos compostos inibidores. Segundo estes autores, o aumento não proporcional do ácido acético pode-se justificar por um aumento na sua volatilização parcial devido ao baixo pH que mantém o ácido na sua forma não dissociada. Ainda os mesmos autores observaram a remoção quase que total do furfural presente no hidrolisado durante a sua concentração. Esta grande eficiência na remoção do furfural pode ser justificada pelas condições em que se é realizado o processo de concentração uma vez que, segundo Perry e Green (1997), o ponto de ebulição do furfural, sob vácuo, é entre 54 e 55°C. Dessa forma, como a concentração do hidrolisado foi feita a 70°C, sob vácuo, era esperado que o furfural fosse removido em grande quantidade durante este processo, fato este observado no presente trabalho e é visto como fator favorável para bioprocessos, dado o caráter tóxico que o furfural exerce sobre o metabolismo microbiano.

5.2 - Efeito dos tratamentos sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado concentrado de bagaço de cana-de-açúcar

5.2.1 - Tratamento por alteração do pH

A tabela 5.2.1.1 apresenta o efeito do tratamento por alteração de pH acoplado à adsorção em carvão ativado sobre as concentrações de açúcares e compostos inibidores nas diferentes etapas, desconsiderando as perdas em volume inerentes ao processo.

De acordo com a tabela 5.2.1.1, observa-se que o tratamento por alteração do pH não apresentou efeito acentuado na concentração de açúcares e nem na concentração de ácido acético. No entanto a adição de CaO até pH 7, seguida da redução até pH 5 pela adição de H_3PO_4 influenciou na Absorbância Relativa (A.R.), que foi reduzida em 70%, evidenciando a ação de íons Ca^{+} na precipitação de compostos inibidores derivados da lignina e da degradação dos açúcares, resultados que corroboram com a eficiência mostrada por Alves (1997) na remoção de furfural (85%) e hidroximetilfurfural (88%), após o tratamento com carvão ativado.

Tabela 5.2.1.1 - Efeito da destoxificação por alteração de pH sobre as concentrações de açúcares e inibidores

Amostra	D- glicose (g/L)	D- xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	A.R.*
Hidrolisado original	6,12	65,12	6,57	4,73	240
Hidrolisado após alteração do pH	6,18	64,62	6,49	4,59	127
Hidrolisado após tratamento com carvão ativado	6,02	62,06	6,34	4,20	72

*A.R. = Absorbância Relativa

Com relação ao papel do carvão ativado, a literatura consultada justifica a remoção de compostos derivados da lignina e da degradação dos açúcares. No entanto, as mesmas referências divergem no que tange o ácido acético. Carvalho et al. (2005 a) obteve remoção superior a 50% de ácido acético, enquanto que Solenzal et al. (2006) não obteve remoção do ácido acético pelo tratameto apenas com carvão ativado.

A tabela 5.2.1.2 apresenta o resultado do tratamento por alteração de pH e adsorção em carvão ativo na redução das massas de açúcares e compostos inibidores presentes no hidrolisado em estudo, considerando a perda volumétrica de hidrolisado que, neste trabalho, foi de 40%.

Tabela 5.2.1.2 - Efeito do tratamento por alteração de pH sobre a redução da massa de açúcares e compostos inibidores

Amostra	D- glicose (g)	D- xilose (g)	L- arabinose (g)	ác. acético (g)	A.R.**
Inicial	6,12	65,12	6,57	4,73	240
Final	3,61	37,24	3,80	2,52	43
%RA e %RCI*	39,26%	42,82%	42,08%	46,74%	82,00%

*%RA = percentual de remoção de açúcares; %RCI = percentual de remoção de compostos inibidores; **Absorbância relativa

O processo de alteração do pH pela adição de óxido de cálcio seguido de filtração acarretou a perda de parte considerável do volume de hidrolisado (aproximadamente 40% do volume inicial). Considerando esta perda, observou-se que neste processo houve a remoção de 42,82% de D-xilose, principal substrato nos processos fermentativos que foram estudados neste trabalho. Além deste açúcar, 39,26% de D-glicose e 42,08% de L-arabinose também foram removidos. Dentre os compostos inibidores, o processo removeu 46,74% do ácido acético e reduziu em 82% a soma final de compostos derivados da lignina e da degradação dos açúcares.

De acordo com os resultados apresentados, o processo de destoxificação do hidrolisado por alteração do pH pela adição de CaO e H_3PO_4 é eficiente na redução de concentrações de compostos inibidores, principalmente nas concentrações de derivados da lignina e degradação dos açúcares. No entanto, a redução na massa dos açúcares presentes no hidrolisado é um fato indesejado, resultando em processos com rendimentos reduzidos, considerando que o substrato perdido no processo de destoxificação não será convertido em produto final.

Neste trabalho, o tratamento por alteração do pH foi acoplado ao tratamento com carvão ativado. A perda de D-xilose foi de 42,82%, valor este que deve-se levar em conta possíveis perdas associadas ao acoplamento do tratamento por carvão ativado, assim como para os demais açúcares. O tratamento apenas com carvão ativado foi testado anteriormente por outros pesquisadores, que avaliaram o carvão ativo como sendo bastante eficaz principalmente na remoção de compostos furânicos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGEZ, 1997; ALVES et al., 1998). Villarreal et al (2005) avaliaram a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto utilizando diferentes concentrações de carvão ativado e diferentes pH e tempo de contato. Os autores obtiveram a remoção de 32,3% do ácido acético, 100% de remoção de furfural e hidroximetilfurfural e 87,5% de remoção dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado utilizando tratamento com 5% (p/v) de carvão ativado e pH 1,8 por 60 minutos. Os mesmos autores obtiveram perda de 4,5% de D-xilose.

Agbelover et al (2004) utilizaram ^{13}C (carbono 13) em análise por ressonância magnética nuclear para identificar inibidores microbianos presentes

no hidrolisado de folhagens de milho e observaram que o tratamento por alteração de pH foi muito eficiente na remoção de ácidos alifáticos e aromáticos, bem como outros compostos alifáticos e aromáticos. No entanto, Mohagheghi, Ruth e Schell (2006) observaram que quanto maior o pH final no tratamento por alteração de pH, maior é a perda dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico. Ao elevar o pH do hidrolisado a 11, os autores obtiveram perda superior a 34% da D-xilose. Os resultados obtidos por estes autores mostram que a redução da concentração de compostos inibidores, bem como açúcares, é resultado de interações químicas entre estes compostos e o cálcio utilizado na elevação do pH. A redução do volume final de hidrolisado devido a perdas no processo também são levados em conta na remoção final das massas de inibidores e açúcares.

5.2.2 - Tratamento com resinas de troca iônica

A tabela 5.2.2.1 apresenta o efeito do tratamento com resinas de troca iônica na caracterização do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.2.2.1 - Efeito da destoxificação por resinas de troca iônica sobre as concentrações de açúcares e inibidores

Amostra	D- glicose (g/L)	D- xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	A.R.
Hidrolisado original	6,17	65,49	7,14	4,22	222
Após tratamento com A 860 S	4,02	39,85	4,51	2,13	66
Após tratamento com A 500 PS	4,99	50,80	5,69	3,29	108
Após tratamento com C150	5,47	56,54	6,11	3,36	138
Tratamento completo*	2,87	25,87	2,90	1,51	12

*Experimento realizado tratando-se o hidrolisado pelas três resinas, na seguinte sequência: A 860 S, A 500 PS e C 150.

Os resultados estão expressos de forma a mostrar o efeito do tratamento individual de cada resina e também do tratamento completo que, de acordo com o item 4.4.2, consistiu no tratamento do hidrolisado pelas três resinas utilizadas neste trabalho na seguinte sequência: A 860 S; A 500 PS e C 150. Nota-se que cada uma das resinas utilizadas apresentou um efeito diferente sobre as características do hidrolisado tratado. A resina A 860 S foi a que removeu a maior quantidade de compostos inibidores, reduzindo em 49,52% a concentração de ácido acético e em 70,27% a A.R. No entanto também foi aquela que promoveu maior perda de açúcares fermentescíveis, sendo que a D-xilose teve sua concentração reduzida em 39,15%. Marton (2005) obteve total remoção dos compostos furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) ao utilizar coluna empacotada com a resina A 860 no tratamento de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, destacando o efeito desta resina na remoção destes compostos inibidores.

Efeitos semelhantes na alteração da composição do hidrolisado, porém com menores intensidades, foram observados nos hidrolisados tratados pelas resinas A 500 PS e C 150. Estas duas resinas também promoveram a remoção de compostos inibidores bem como a perda de açúcares presentes no hidrolisado. A resina aniônica A 500 PS reduziu em 22,04% a concentração de ácido acético e em 51,35% a absorbância relativa, além de provocar a remoção de 22,43% da D-xilose. Já a resina catiônica C 150 removeu 20,38% do ácido acético presente no hidrolisado, reduziu a absorbância relativa em 37,84% e a concentração de D-xilose em 13,67%.

Observa-se na tabela 5.2.2.1 que nenhuma das resinas reduziu a concentração de ácido acético a valores próximos a 1g/L, concentração esta que favorece a produção de xilitol (FELIPE et al., 1995), fato que sugere a necessidade do acoplamento de tratamentos que aumentem o percentual de remoção dos compostos inibidores.

O tratamento na qual foram utilizadas as três resinas em sequência apresentou efeito sinérgico sobre a remoção de compostos inibidores, bem como na perda de açúcares do hidrolisado. A tabela 5.2.2.2 apresenta os valores percentuais de remoção de açúcares e compostos tóxicos pelo tratamento completo com resinas de troca iônica.

Tabela 5.2.2.2 - Efeito do tratamento com resinas sobre a remoção de açúcares e compostos inibidores

Amostras	D- glicose	D- xilose	L- arabinose	ác. acético	A.R.
Concentração inicial (g/L)	6,17	65,49	7,14	4,22	222
Concentração final (g/L)	2,87	25,87	2,90	1,51	12
%RA e %RCI*	53,54%	60,50%	59,31%	64,15%	94,59%

*%RA = percentual de remoção de açúcares; %RCI = percentual de remoção de compostos inibidores

Considerando que as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural no hidrolisado concentrado são muito baixas, pode-se dizer que a redução da A.R. refere-se, principalmente, a remoção de compostos fenólicos. Dessa forma infere-se que o tratamento que utilizou as resinas em sequência proporcionou melhores resultados na remoção de compostos inibidores do que o tratamento em que as resinas foram utilizadas isoladamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho et al. (2005, a) na remoção dos compostos inibidores. Os referidos autores obtiveram uma redução de 95% dos compostos fenólicos, enquanto neste trabalho foi obtida a redução de 94,59% da absorbância relativa.

Quanto à remoção de ácido acético, Carvalho et al. (2005, a) obtiveram 55% de diminuição da concentração deste ácido, enquanto que nas condições utilizadas neste trabalho, foi removido 64,15% deste inibidor, sendo obtido um hidrolisado com concentração de 1,51 g/L de ácido acético. A remoção de ácido acético também apresentou melhores resultados quando o hidrolisado foi tratado pelas três membranas do que pela utilização de cada uma delas isoladamente.

A redução de 60,5% na concentração D-xilose, principal substrato nos bioprocessos que envolvem hidrolisado hemicelulósico, foi substancialmente superior à perda desta pentose no tratamento em que cada uma das três resinas foram utilizadas individualmente. Esta redução na concentração da D-xilose é um problema na utilização do hidrolisado em bioprocessos. Rosa et al. (1998) demonstram que a concentração inicial desta pentose é um dos principais fatores que influenciam nos parâmetros fermentativos no processo de produção biotecnológica do xilitol. O fabricante das resinas (PUROLITE) sugere um

procedimento chamado de "adoçamento" das resinas para minimizar a perda dos açúcares. Este procedimento consiste em passar uma solução contendo o mesmo açúcar que se deseja purificar, num volume que varia de 1 a 2 vezes o volume do leite. Este procedimento não foi realizado para que fosse possível a análise do efeito do tratamento sobre a composição do hidrolisado tratado. Além disso, o procedimento de "adoçamento" das resinas exige que se utilize D-xilose pura na solução de açúcar, necessidade que aumentaria consideravelmente o custo do processo de tratamento de grandes volumes de hidrolisado considerando-se o valor comercial da D-xilose.

O tratamento utilizando as três resinas em sequência foi utilizado antes da fermentação do hidrolisado. Os resultados deste tratamento foram utilizados para avaliação comparativa aos demais tratamentos avaliados neste trabalho, uma vez que os resultados obtidos mostraram que a utilização em sequência foi mais eficiente na remoção de compostos inibidores do que a utilização individual das resinas.

5.2.3 - Tratamento por extração com solvente orgânico utilizando membranas como suporte de interface

5.2.3.1 - Determinação da composição da fase orgânica para destoxificação por extração líquido-líquido com interface imobilizada em membrana

A tabela 5.2.3.1 apresenta os resultados da utilização de diferentes composições da fase orgânica na remoção de ácido acético do hidrolisado em estudo para posterior aplicação no sistema de extração com suporte de interface em membranas. Estes experimentos foram realizados em tubos cônicos (tipo "falcon" - para centrifugação) com o mesmo volume de fase orgânica e fase aquosa, variando a composição da fase orgânica conforme descrito no item 4.4.3.

Tabela 5.2.3.1 - Resultados dos experimentos para determinação da composição da fase orgânica

Amostra	% alamina	D-glicose g/L	D-xilose g/L	L-arabinose g/L	ácido acético g/L	%RCI
1	0	6,51	65,07	6,91	2,95	37,10
2	30	6,87	67,20	7,19	2,45	47,76
3	50	6,88	67,25	7,22	1,83	60,98
4	70	6,75	65,85	7,09	2,22	52,66
5	original	6,53	67,28	7,23	4,69	ND*

*ND - não detectado

A variação na concentração de alamina 336 resultou em diferentes porcentagens de remoção de ácido acético presente no hidrolisado. No entanto o aumento na remoção deste composto inibidor não se manteve linear com o aumento da concentração da alamina. O experimento 3, em que a fase orgânica foi composta por 50% alamina e 50% octanol apresentou maior percentual de remoção de ácido acético do hidrolisado. Portanto esta proporção foi utilizada nos experimentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar nos experimentos posteriores.

5.2.3.2 - Tratamento do hidrolisado após definição da composição da fase orgânica

A tabela 5.3.3.2.1 apresenta o efeito do tratamento por extração sobre as concentrações de açúcares, compostos inibidores e A.R. do hidrolisado antes e após o tratamento por extração com solvente com interface imobilizada em membranas de fibra oca.

Tabela 5.3.3.2.1 - Efeito do tratamento por extração sobre as concentrações (g/L) de açúcares, ácido acético e A.R. do hidrolisado

Amostras	D- glicose	D- xilose	L- arabinose	ác. acético	A.R.
inicial	5,88	62,07	6,64	4,46	220
final	5,70	62,25	6,48	2,86	138

A fase orgânica, composta por octanol e alamina 336 na proporção de 1:1, foi capaz de promover a remoção de ácido acético, compostos fenólicos e dos compostos de degradação dos açúcares, sem promover perdas consideráveis dos açúcares. Segundo Grzenia, Schell e Wickramasinghe (2010) enquanto ácidos orgânicos presentes no hidrolisado, tais quais ácido fórmico, levulínico e ácido acético, formam complexos químicos com a Alamina 336, furfural e 5-hidroximetilfurfural são removidos por mecanismo não-reativo pela fase orgânica.

O tratamento iniciou-se com 1000 mL de hidrolisado e, ao término do processo, foi recuperado um volume de 860 mL deste hidrolisado. Parte da fase orgânica difundiu-se no hidrolisado, provavelmente por consequência da diferença de pressões entre o interior e exterior das membranas de fibra oca ocasionada pela utilização de bombas peristálticas com um número reduzido de guias. A mistura exigiu posterior separação dessas duas fases utilizando-se um funil de separação por 60 min, obtendo-se então o hidrolisado para posterior utilização.

Para obter os percentuais de remoção de açúcares e compostos inibidores, a diferença entre volume inicial e volume final foi considerada. Os resultados são apresentados na tabela 5.3.3.2.

Tabela 5.3.3.2 - Efeito do tratamento por extração com membranas sobre a concentração de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado

Amostra	D- glicose	D- xilose	L- arabinose	ác. acético	A.R.*
Inicial	5,89	62,07	6,64	4,46	220,00
Final	5,13	53,53	5,57	2,46	118,80
%RA e %RCI	17,13%	13,76%	16,12%	44,71%	46,07%

*A.R. - absorvância relativa

O tratamento proposto por Grzenia et al. (2008) foi capaz de remover quantidades consideráveis dos compostos tóxicos do hidrolisado mesmo no hidrolisado concentrado. Os autores aplicaram o sistema de extração com utilização de membranas no tratamento de hidrolisado não concentrado de folhagens de milho e obtiveram resultados de até 60% na remoção do ácido acético usando condições semelhantes de tratamento.

Outra diferença observada nos resultados foi quanto ao aumento do pH do hidrolisado final. Grzenia et al. (2008) obtiveram um hidrolisado com pH final em torno de 4,7, com considerável remoção de ácido sulfúrico do hidrolisado. Resultados semelhantes eram esperados neste trabalho, no entanto, ao final de 3,5 h de tratamento, o pH do hidrolisado aumentou de 0,80 para 1,81. A menor elevação do pH pode ser justificada pelo fato de, neste trabalho, o hidrolisado ter sido concentrado, o que levou a um aumento da concentração de íons H^+ provenientes principalmente do ácido utilizado na hidrólise do bagaço além do aumento das concentrações de ácido acético e outros ácidos que podem estar presentes no hidrolisado.

A eficiência na remoção de ácido acético permaneceu constante durante todo o processo, conforme observado na figura 5.3.3.1.

Figura 5.3.3.1 - Remoção de ácido acético (-x-) e redução da A.R. (-o-) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado por extração com membranas

A mesma figura apresenta a redução da absorbância relativa, indicando, qualitativamente, a extração de compostos furânicos e fenólicos pelo sistema de extração com membranas. Além disso, observa-se a gradativa remoção de ácido

acético, com sua concentração decrescendo linearmente com o tempo. Este decréscimo gradativo sugere que não houve sobrecarregamento da alamina diluída na fase orgânica. Dessa forma, o prolongamento do tempo de execução do experimento pode promover uma remoção ainda maior deste ácido do hidrolisado.

5.3 - Avaliação comparativa entre os diferentes tratamentos sobre a composição do hidrolisado

A tabela 5.3.1 apresenta os resultados dos diferentes tratamentos sobre a composição em massa dos compostos de interesse presentes no hidrolisado, bem como na absorbância relativa (A.R.) referente aos compostos furânicos e produtos derivados da lignina.

Observa-se que todos os tratamentos resultaram na alteração da composição do hidrolisado. Reduções consideráveis dos compostos inibidores foram acompanhados de forma não proporcional da redução de massa dos açúcares fermentescíveis e alteração do pH inicial.

Tabela 5.3.1 - Efeito dos tratamentos sobre a composição do hidrolisado (pH inicial = 0,8)

Tratamentos	Massa inicial (g)				AR inicial	Massa final (g)				AR final	pH final
	gli	xil	arab.	ác.ac		gli	xil	arab.	ác.ac		
Alteração do pH	6,12	65,12	6,57	4,73	240	3,61	37,24	3,80	2,52	72	5,5
Resinas de troca iônica	6,17	65,50	7,14	4,22	222	2,87	25,87	2,90	1,51	12	2,0
Extração com membrana	5,88	62,07	6,64	4,46	220	5,13	53,53	5,57	2,46	138	1,8

gli - D-glicose, *xil* - D-xilose, *arab* - L-arabinose, *AR* - absorbância relativa.

A alteração do pH em cada tratamento pode ser justificada pela remoção ou neutralização dos ácidos orgânicos presentes no hidrolisado, bem como pela remoção de parte do ácido acético utilizado no processo de hidrólise. Grzenia et al. (2008) apresentaram a possibilidade de remoção de H^+ e HSO_4^- pelo método

de extração utilizando compostos de amina terciários e quaternários para complexação de ácidos.

O efeito de cada tratamento na remoção de inibidores e de açúcares pode ser melhor visualizado na figura 5.3.1. Os gráficos apresentam resultados dos quais pode-se observar bastante efetividade dos tratamentos por alteração de pH e tratamento com resinas de troca iônica principalmente na redução da absorbância relativa (82,0% e 94,56%, respectivamente). Os resultados de remoção do ácido acético também foram expressivos, reduzindo em 46,74% a concentração deste ácido no hidrolisado tratado por alteração do pH e 64,15% no caso do tratamento por resinas. Pela utilização do tratamento por extração com membranas, foi obtida remoção de 44,71% da massa de ácido acético e redução de 46,07% da absorbância relativa.

Figura 5.3.1 - Efeito dos tratamentos sobre a remoção de inibidores (A) e açúcares (B)

A figura 5.3.1 B apresenta resultados que permitem concluir que a remoção de compostos inibidores apresentou relativa proporção com a perda de açúcares fermentescíveis. Dentre os tratamentos avaliados, o de maior eficiência na remoção de compostos inibidores foi o tratamento por resínas de troca iônica. No entanto, o mesmo tratamento resultou na maior perda de açúcares, o que fatalmente resulta na redução dos rendimentos em bioprocessos. No entanto, os tratamentos por alteração de pH e extração com membranas, apesar de promoverem uma menor perda dos açúcares fermentescíveis, não alcançaram os mesmos percentuais de remoção de inibidores apresentados pelo tratamento com resinas de troca iônica, de forma que parte destes compostos permaneceram no hidrolisado. Assim, para uso do hidrolisado tratado em processos fermentativos, faz-se necessário avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos compostos inibidores ainda presentes no hidrolisado, bem como a influência da concentração inicial de açúcares na cinética do processo.

5.4 - Efeito dos tratamentos sobre a fermentabilidade do hidrolisado a xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037

As características do hidrolisado tais como pH, concentração do substrato e suplementos além da concentração de compostos inibidores influenciam tanto o fator rendimento quanto o fator produtividade dos processos biotecnológicos. Os tratamentos do hidrolisado visam obter melhores resultados nestes parâmetros justamente alterando as características apresentadas.

O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar tratado pelos três métodos analisados neste trabalho foi utilizado nas fermentações com *Candida guilliermondii* FTI 20037, visando a produção de xilitol.

A figura 5.4.1 apresenta a variação da concentração de D-xilose no meio de fermentação (5.4.1 A), produção de xilitol (5.4.1 B) e crescimento da biomassa (5.4.1 C) nos hidrolisados tratados pelos três métodos de destoxificação analisados no presente trabalho. De acordo com os dados apresentados, observa-se que, mesmo sob as mesmas condições de suplementação, temperatura e agitação, o consumo de D-xilose apresentou perfil diferente nos três processos.

Figura 5.4.1 - Variação da concentração de D-xilose no meio de fermentação (A), produção de xilitol (B) e crescimento celular (C) na fermentação por *Candida guilliermondii* em meios tratados por alteração de pH (■), resinas de troca iônica (▲) e extração por membranas (◆).

Observa-se na figura 5.4.1 A que o consumo de D-xilose ocorreu desde as primeiras horas de fermentação. Após 72 h de fermentação, a concentração inicial de D-xilose foi reduzida em 84,41% no hidrolisado tratado por extração com

membranas, enquanto no hidrolisado tratado por alteração de pH a redução da concentração do mesmo açúcar foi de 93,81%. Já na fermentação em que foi utilizado o hidrolisado tratado com resinas de troca iônica, a redução na concentração de D-xilose foi de 99,08% após 72 h de fermentação. A reduzida concentração inicial de açúcares, bem como a concentração de inibidores no processo em que foi utilizado o hidrolisado tratado por resinas de troca iônica, podem ter sido fatores determinantes na quantidade de substrato consumida, considerando que em 48 horas de fermentação 97,44% da D-xilose havia sido consumida.

Os valores máximos de concentração de xilitol no meio de cultivo foram distintos nos três processos. A produção de xilitol (Fig. 5.4.1 B) aconteceu durante as 72 horas de fermentação nos hidrolisados tratados por alteração do pH e por extração com membranas, alcançando concentrações de 32,02 g/L e 18,65 g/L, respectivamente, sem que houvesse uma perceptível redução na velocidade de formação deste produto. No entanto, no hidrolisado tratado por resinas de troca iônica, a concentração máxima de xilitol observada foi de 9,79 g/L, obtida em 48 horas de fermentação. Após este tempo, a concentração de xilitol começou a diminuir, provavelmente pela escassez de D-xilose e consumo do xilitol como fonte de carbono pelas leveduras.

A concentração final de células foi bastante próxima nos hidrolisados tratados por alteração de pH e por resinas de troca iônica, sendo de 13,93 g/L e 14,61 g/L, respectivamente. A concentração de biomassa no hidrolisado tratado por extração com membranas foi de 6,04 g/L ao final de 72 horas de fermentação. Possíveis causas dessa reduzida concentração final de células são as maiores concentrações de compostos inibidores, uma vez que o tratamento por extração com membranas foi o que resultou nos menores percentuais de remoção desses compostos, principalmente dos compostos derivados da lignina (Tab. 5.4.1). Além disso, há a possibilidade de tanto da alamina 336 quanto do octanol utilizados no processo de destoxificação terem inibido o crescimento das leveduras.

A maior remoção de compostos inibidores promovida pela utilização de resinas de troca iônica favoreceu a produção de células (Fig. 5.4.1 C) na fermentação em que se utilizou o hidrolisado tratado por este método. No entanto, após 48 h de fermentação, observa-se que a concentração de D-xilose ficou próxima de zero e teve início a redução da concentração do produto de interesse,

o xilitol, levando a menores valores dos fatores de rendimento e produtividade após 72 h de fermentação. Dessa forma, para que se possa analisar de forma adequada a influência dos tratamentos sobre os parâmetros fermentativos, os fatores de rendimento e produtividade foram calculados nos tempos de 48 h e 72 h de fermentação.

A tabela 5.4.1 apresenta os valores percentuais de remoção de compostos inibidores (%RCI) e remoção de D-xilose (%RA), bem como os valores dos fatores de rendimento (Y_p/s) e de produtividade (Q_p) das fermentações realizadas para a produção de xilitol, utilizando o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado pelos três métodos em análise.

Tabela 5.4.1 - Efeito dos tratamentos na %RCI, %RA de D-xilose e parâmetros fermentativos da produção de xilitol

Tratamento	%RCI*		%RA** D-xilose	Y_p/s (g/g)		Q_p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	
	Ác. acético	A.R.		48h	72h	48h	72h
Alteração do pH	46,74%	82%	42,82%	0,57	0,67	0,39	0,44
Resinas de troca iônica	64, 15%	94,59%	60,50%	0,42	0,30	0,20	0,10
Extração com membranas	44,71%	46,07%	13,76%	0,33	0,39	0,16	0,26

*%RCI - percentual de remoção de composto inibidor ** %RA - percentual de remoção de açúcares

A fermentação do hidrolisado tratado por alteração do pH permitiu a obtenção de resultados similares aos encontrados na literatura para a produtividade volumétrica de xilitol. No entanto, o fator de rendimento foi inferior ao obtido por Alves et al. (1998), que obtiveram um rendimento de 0,79 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,47 g.L⁻¹.h⁻¹ em 63 h de fermentação pela mesma levedura, a *Candida guilliermondii*. Possivelmente diferenças na composição do hidrolisado, bem como na concentração inicial de células levaram a obtenção dos resultados distintos.

O tratamento por resinas de troca iônica obteve os maiores resultados na remoção de compostos inibidores. No entanto não obteve os melhores parâmetros fermentativos. A perda de 60% da massa de D-xilose gerou um

hidrolisado com baixa concentração desse substrato quando comparado aos outros tratamentos, influenciando negativamente o processo fermentativo.

Marton (2005) ao fermentar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado por alteração de pH seguido da passagem do hidrolisado por um sistema combinado de resinas de troca iônica obteve resultados para os fatores de rendimento e produtividade volumétrica iguais a 0,52 g/g e 0,27 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, após 72 h de fermentação. Estes valores são consideravelmente superiores aos encontrados no presente trabalho, fato que pode ser consequência da diferente concentração inicial de D-xilose no hidrolisado utilizado por Marton (2005), que foi superior a concentração desta pentose após o tratamento com resinas avaliado no presente trabalho.

Considerando que o pH inicial, temperatura e agitação foram as mesmas para todos os experimentos, a diferença na concentração inicial de D-xilose no experimento envolvendo o hidrolisado tratado por resinas de troca iônica passa a ser a principal justificativa para os reduzidos valores dos fatores de rendimento e produtividade deste experimento em relação aos realizados após tratamento por alteração de pH e extração por membranas, considerando o tempo de 72 h de fermentação. No entanto, em 48 h de fermentação do hidrolisado tratado por resinas de troca iônica permitiu a obtenção de rendimento superior aos valores obtidos pelo tratamento de extração com membranas, provavelmente devido aos maiores percentuais de remoção de compostos inibidores obtidos no tratamento com resinas de troca iônica.

A extração com membranas obteve resultado semelhante ao tratamento por alteração de pH quanto a remoção de ácido acético, além de ter gerado menor perda de D-xilose. No entanto, a redução da absorbância relativa foi 56,18% menor, o que significa menor remoção dos compostos fenólicos e furânicos. Somado a isso, a possível presença de traços de octanol e aminas de baixo peso molecular que podem ser tóxicos às leveduras, pode resultar em valores reduzidos dos parâmetros fermentativos (OFFEMAN et al., 2008). Não foram encontrados na literatura consultada trabalhos que utilizassem o tratamento por extração com solvente orgânico e alamina 336 como tratamento de destoxificação do hidrolisado visando sua fermentação.

Já os valores encontrados para os fatores de rendimento e produtividade nas fermentações do hidrolisado tratado por extração com membranas podem ter

sido afetados pela presença de maior concentração de compostos inibidores e também presença de traços de octanol e aminas de baixo peso molecular, sendo então estes valores inferiores aos encontrados para o hidrolisado tratado por alteração de pH, no qual houve maior remoção dos compostos tóxicos sem o problema da geração de outros inibidores inerentes ao processo de destoxificação. Neste tratamento, o rendimento final foi de 0,39 g/g e produtividade de 0,26 g L⁻¹h⁻¹.

5.5 - Efeito dos tratamentos sobre a fermentabilidade do hidrolisado a etanol pela levedura *Pichia stipitis* IMH 43.2

Os diferentes tratamentos aplicados ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também resultaram em distintos valores dos fatores rendimento e produtividade na produção biotecnológica de etanol.

A figura 5.5.1 apresenta a variação da concentração de D-xilose no meio de fermentação (A), produção de etanol (B) e crescimento celular (C) na fermentação por *Pichia stipitis* IMH 43.2 nos hidrolisados tratados pelos três tratamentos avaliados no presente trabalho. Observa-se que em 72h de fermentação, o consumo de D-xilose foi maior no processo em que se utilizou o hidrolisado tratado por resinas de troca iônica, na qual o consumo de D-xilose foi de 93,20%, enquanto que o consumo da mesma pentose foi de 40,76% quando utilizado o hidrolisado tratado por alteração de pH e de 4,55% no hidrolisado tratado por extração com membranas (Fig. 5.5.1 A). Uma das prováveis causas dos resultados mais baixos para consumo de D-xilose nos dois últimos hidrolisados é a concentração mais elevada de compostos inibidores do que no hidrolisado tratado com resinas de troca iônica. No caso do hidrolisado tratado por extração com membranas ainda há a possibilidade de inibição dos microrganismos por traços de octanol e compostos de amina presentes neste hidrolisado.

Figura 5.6.1 - Variação da concentração de D-xilose no meio de fermentação (A), produção de etanol (B) e crescimento celular (C) na fermentação por *Pichia stipitis* IMH 43.2 em meios tratados por alteração de pH (—■—), resinas de troca iônica (—▲—) e extração por membranas (—◆—).

A figura 5.5.1 B e C mostra que o consumo de substrato no meio com hidrolisado tratado por resinas de troca iônica favoreceu a produção de etanol e não de células. A produção de etanol teve início mais rápido e acelerado no

hidrolisado tratado por resinas quando comparado com o hidrolisado tratado por alteração de pH, o que pode ser explicado pelos maiores percentuais de remoção dos compostos inibidores que resultaram em um hidrolisado com melhores características para utilização em processo fermentativo.

Até 48 h de fermentação, a concentração de etanol foi superior no hidrolisado tratado por resinas do que no hidrolisado tratado por alteração de pH. No entanto, a partir deste ponto a concentração do álcool passou a diminuir, o que possivelmente se deve a utilização do produto como substrato para manutenção do crescimento celular, mostrado na figura 5.6.1 C, já que a concentração de D-xilose à partir deste tempo aproxima-se de zero.

Quanto ao tratamento por extração com membranas, as figuras 5.6.1 A, B e C apresentam um baixo consumo de substrato, 4,55%, mas sem a produção de etanol. Provavelmente, a levedura *Pichia stipitis* IMH 43.2 foi mais sensível aos compostos inibidores e ao solvente orgânico presentes no hidrolisado tratado por extração, quando comparada à levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

Tabela 5.5.1 - Efeito dos tratamentos na %RCI, %RA de D-xilose e parâmetros fermentativos da produção de etanol em 72 h de fermentação

Tratamento	%RCI Ácido acético	A.R.	%RA D- xilose	Yp/s (g/g)		Qp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
				48h	72h	48h	72h
Alteração do pH	46,74%	82%	42,82%	0,38	0,28	0,09	0,08
Resinas de troca iônica	64,15%	94,59%	60,50%	0,23	0,16	0,09	0,05
Extração com membranas	44,71%	46,07%	13,76%	0,00	0,00	0,00	0,00

*%RCI - percentual de remoção de composto inibidor ** %RA - percentual de remoção de açúcares

Da mesma forma como foi observado nos experimentos para a produção de xilitol, após 72 h de fermentação, o tratamento por alteração de pH resultou nos maiores resultados para fator de rendimento e produtividade em etanol, que foram de 0,28 g/g e 0,08 g L⁻¹h⁻¹ respectivamente.

Na fermentação em que foi utilizado o hidrolisado tratado por extração com membranas não foi obtido etanol e também não foi observado aumento

significativo na concentração de biomassa da levedura *Pichia stipitis* IMH 43.2, nas condições experimentais utilizadas. Possivelmente, esta levedura é mais sensível do que a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 às concentrações de compostos inibidores e também à presença de traços de octanol e alamina 336 presentes neste hidrolisado.

O tratamento com resinas de troca iônica resultou na remoção de 27,14% a mais de ácido acético e redução 13,31% superior na absorbância relativa do que o tratamento por alteração de pH, no entanto, o fator rendimento para o tratamento com resinas apresenta valor mais baixo quando comparados à fermentação do hidrolisado tratado por alteração do pH. Roberto et al. (1991) observaram que a produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* CBS 5773 não foi afetada com alterações na concentração inicial de D-xilose entre 20 e 99 g/L. Considerando que a concentração inicial de D-xilose no hidrolisado tratado por alteração de pH foi de 26,03 g/L, portanto próximo ao valor mínimo encontrado por Roberto et al. (1991), pode-se concluir que a concentração inicial dessa pentose influenciou o valor calculado para o fator de rendimento.

6 - Conclusões

Dentre os tratamentos analisados no presente trabalho, a maior remoção de ácido acético (64,15%) do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi obtida com o tratamento onde se utilizou resinas de troca iônica, seguido do tratamento por alteração de pH e extração com membranas, que apresentaram, respectivamente, 46,74% e 44,71% de remoção deste ácido.

Quanto a redução da absorbância relativa (A.R.) o maior percentual de remoção também foi apresentado pelo tratamento com membranas, seguido do tratamento por alteração do pH e tratamento por extração com mebranas, com 94,59%, 82% e 46, 07% de remoção, respectivamente.

A maior perda de xilose foi observada no tratamento com resinas de troca iônica, com percentual de redução igual a 60,5%, seguido do tratamento por alteração do pH e tratamento com extração com membranas, com 42,48% e 13,76%, respectivamente, de perda desta pentose.

O tratamento por alteração de pH foi o que forneceu os melhores resultados do fator de rendimento (0,57g/g para xilitol e 0,38g/g para etanol) em ambos os processos fermentativos. Este tratamento também rendeu a melhor produtividade volumétrica na produção de xilitol ($0,39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), enquanto que na produção de etanol este parâmetro foi igual ($0,09 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) tanto para o tratamento com alteração de pH quanto para o que se utilizou resinas de troca iônica.

Nas condições operacionais utilizadas, a fermentação do hidrolisado tratado por extração com membranas não resultou na produção de etanol, possivelmente devido a menor remoção dos compostos inibidores e da presença de traços de octanol e alamina 336 provenientes do tratamento.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que, para as condições operacionais utilizadas no presente trabalho na condução dos processos fermentativos em estudo, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar seja tratado por alteração do pH.

Referências

AGBLEVOR, F. A.; FU, J.; HAMES, B.; McMILLAN, J. D. Identification of microbial inhibitory functional groups in corn stover hydrolysate by Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.119, p. 97-120, 2004.

ALANEN, P.; HOLSTI, M.; PIENIHÄKKINEN, K. Sealants and xylitol chewing gum are equal in caries prevention. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 66, n. 1, 2008.

ALLEN, S.A.; CLARK, W.; McCAFFERY, M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P.J.; LIU, Z.L. GORSICH, S.W., Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, 2010. Disponível em <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/2>. Acesso em 02/02/2010.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p. 89-98. 1998.

AUDIO, J. T. Effect of xylitol chewing gum on salivary streptococcus mutans in preschool children. **Journal of Dentistry for Children**, p. 81-86, abril, 2002.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHINEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors that affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

BARROW, G.M.; YERGER, E.A. Acid-Base reactions in non-dissociating solvents. Acetic acid and triethylamine in carbon tetrachloride and chloroform. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 20, p. 5211-5216, 1954.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; MURAKAMI, L. Y.; MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; SILVA, S. S. Xylitol production in a bubble column bioreactor Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 258-262, 2007.

BRÁS, A.M.; MIRANDA, F.; HIPÓLITO, L.; DIAS, L.S. **Biomassa e produção de energia**. Disponível em: www.draedm.minagricultura.pt/draedm/centrodocumentacao/revista_pdf/06.Biomassa_AldaBr%C3%A1s.pdf. Acesso em: 30 de setembro de 2008.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2010.

CARAPITO, R.; CARAPITO, C.; JELTSCH, J.; PHALIP, V. Efficient hydrolysis of hemicellulose by a *Fusarium graminearum* xylanase blend produced at high levels in *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 845-850, 2009.

CARVALHO, R. J.; MARTON, J. M.; SILVA, F.; FELIPE, M. G. A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, v. 18, p. 48-55, 2005 a.

CARVALHO, W.; SANTOS, J. C.; CANILHA, L.; SILVA, S. S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 25-31, 2005.

CARVALHO, W.; SANTOS, J. C.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2135-2141, 2004.

CARVALHO, W.; SILVA, S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic Behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 165-169, 2002.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. **Z. Naturforsch**, v. 57, p. 109-112, 2001.

CEC – Commission of the European Communities. **Communication from the Commission: an EU strategy for biofuels**. Brussels, 2006.

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.

CHEN, J.; ZHANG, W.; TAN, L.; WANG, Y.; HE, G. Optimization of metabolic pathways for bioconversion of lignocellulose to ethanol through genetic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 593-598, 2009.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOU, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105-109, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-Açúcar, Safra 2009, Segundo Levantamento. Setembro de 2009.

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PEREGO, P.; SILVA, S. S.; ZILLI, M. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering Technology**, v. 23, p. 1013-1020, 2000.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n.6, p. 1858-1865, 2010.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. Tese (doutorado), 105 f., Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2006.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-337, 2005.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; FILHO, R. M.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206-1216, 2009.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 413-425, 2005.

ELIAS, F.; PINZAN, A.; BASTOS, J. R. M. Influência do complexo flúor-xilitol no controle da placa dentária e do sangramento gengival em pacientes herbiátricos com aparelho ortodôntico fixo. **Revista Dental Press Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 11, n. 5, p. 42-56, 2006.

EYAL, A. M.; CANARI, R. pH Dependence of Carboxylic and Mineral Acid Extraction by Amine-based extractants Effects of pKa, amine basicity, and diluent properties. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 34, p. 1789-1798, 1995.

U.S. Department of Energy Office of Science. **From biomass to cellulosic ethanol**.

Disponível em < <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/placemat.shtml> >.

Acesso em: Out. 2009.

U.S. Department of Energy. **Alternative Fuels & Advanced Vehicles Data Center**.

Disponível em

<http://www.afdc.energy.gov/afdc/ethanol/production_cellulosic.html>. Acessado em: Abr. 2010.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & biotechnology**, v. 18, p. 251-254, 1997 a.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 11-14, 1997 b.

FERREIRA, A.S.; SOUZA, M.A.; BARBOSA, N.R.; SILVA, S.S. *Leishmania amazonensis*: Xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of macrophage nitric oxide production. **Experimental Parasitology**, n. 119, p. 74-79, 2008.

GÍRIO, F. M., AMARO, C., AZINHEIRAL, H., PELICA, F., AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaromyces hansenii*. **Bioresearch Technology**, v.71, n. 3, p. 245-251, 2000.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 223-229, 2002.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GRZENIA, D. L.; SHELL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. R. Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. **Journal of Membrane Science**, v. 322, p. 189-195, 2008.

GRZENIA, D. L.; SHELL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. R. Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction. **Journal of Membrane Science**, v. 348, p. 6-12, 2010.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, GEERTJE.; FAAJI, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HRISTOZOVA, T.; ANGELOV, A.; TZEVTKOVA, B.; PASKALEVA, D.; GOTCHEVA, V.; GARGOVA, S.; PAVLOVA, K. Effect of furfural on carbon metabolism key enzymes of lactose-assimilating yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1108-1112, 2006.

IMAI, T.; OHNO, T. the relationship between viability and intracellular pH in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3604-3608, 1995.

JURADO, M.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ-ALCALÁ, A.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6378-6384, 2009.

KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; THOMSEN, B. A.; KONGJAN, P.; ANGELIDAKI, I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2562-2568, 2009.

KIANI, A.; BHAVE, R. R.; SIRKAR, K. K. Solvent extraction with immobilized interfaces in a microsporous hydrophobic membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 20, p. 125-145, 1984.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 139-144, 2001.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, n. 1263, p. 147-156, 2004.

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

KWON, S.; LEE, P. C.; LEE, E. G.; CHANG, YOUNG, K. C.; CHANG, N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 209-215, 2000.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p. 151-172, 1993.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731-1738, 2003.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v.101, p. 1036-1043, 2010.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, L-arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367-380, 2002.

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

LIU, L.; SUN, J.; LI, M.; WANG, S.; PEI, H.; ZHANG, J. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by FeCl₃ pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5853-5858, 2009.

LYND, R. L.; van ZYL, W. H.; McBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 577-583, 2005.

LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnol Progress**, v 15, n. 5, pg 777-793, 1999.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Byoproduct inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p. 103-121, 1983.

MÄKINEN, K. K. The rocky road of xylitol to its clinical application. **Journal of Dentistry Research**, v. 79, n. 6, p. 1352-1355, 2000.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SOLENZAL, A. I. N. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1193-1198, 2007.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I. N.; FELIPE, M. G. A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1677-1683, 2003.

MARTINEZ, A.; RODRIGUES, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 637-641, 2000.

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

MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; JÄMSÄ, T.; KNUUTTILA, M. L. E. Improved Bone Biomechanical Properties in Xylitol-Fed Aged Rats. **Metabolism**, v. 51, n. 1, p. 92-96, 2002.

MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 56-59, 2006.

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

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

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process biochemistry**, v. 43, p. 540-546, 2008.

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

NÁHLIK, J.; PALATOVÁ, M.; GÍRIO, F.; ROSEIRO, C. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1695-1705, 2003.

OFFERMAN, D. R.; STEPHENSON, S. K.; FRANQUI, D.; CLINE, J. L.; ROBERTSON, G. R.; ORTS, W. J. Extraction of ethanol with higher alcohol solvents and their toxicity to yeast. **Separation and Purification Technology**, v. 63, p. 444-451, 2008.

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.

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.

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

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; MATEOS, M. P. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 7-14, 2001.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 24, p. 25-33, 2000 b.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; RÊCZEY, K. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 286-293, 1997.

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

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1 Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998 a.

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

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3 Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998 c.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 599-604, 1997.

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

PERRY, R. H., GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. 7th ed., New York: McGraw-Hill, 1997.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3044-3050, 2008.

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

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

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 271-275, 1991.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1231-1237, 2003.

ROSA, S. M. A., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S., VITOLO, M. Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, p. 127-135, 1998.

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

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHA, B. C. α - L - Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and applications in biotechnology. **Biotechnology Advances**, n.18, p. 403-423, 2000.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.J.; CAMACHO, F. The fermentatation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. 77, p. 641-648, 2002.

SANCHEZ, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIG, T.; GALBE, M.; LINDEN, G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 249-256, 2004.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, V.; MUSSATO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 113-118, 2005.

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S.; SANTOS, D. T.; CONVERTI, A. Techincal Econimical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. **Chemical Engineering Technology**, v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SHEEHAN, J. HIMMEL, M.E., Department of Energy's research and development activities for bioethanol. **Biotechnological Progress**, v. 15, p. 817-827, 1999.

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. Dissertação (mestrado), 144 f., Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, 2007.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; LUCHESE, R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248-254, 2004.

SILVA, D. D. V., FELIPE, M. G. A., RODRIGUES, R. C. L. B. Influência da relação glicose/xilose nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA,6., 05-07 abr. 2004 Rio de Janeiro , p. 155, 2004 a.

SILVA, S. S.; MUSSATO, S. I.; SANTOS, J. C.; SANTOS, T. S.; POLIZEL, J. Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 141, p. 215-227, 2007.

SILVA, S. S.; MATOS, Z. R.; CARVALHO, W. Effects of sulfuric acid loading and residence time on the composition of sugarcane bagasse hydrolysate and its use as a source of xylose for xylitol bioproduction. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1449-1452, 2005.

SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K. K.; VITOLO, M. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 903-907, 2003.

SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. MANCILHA Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, pg 549-553, 1996.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; FELIPE, M. G. A. Xilitol um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 5, n. 1, p. 109-117, 1993.

SOLENZAL, A. I. N.; AROCHE, Y. O.; VERDE, M. V.; SANTANA, E. M.; MARTÍNEZ, E. A. Purificación de hidrolizado de bagaze de caña de azúcar con carbón activado y resinas de intercambio iónico. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 2, p. 124-128, 2006.

SORENSEN, H.R.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40, p. 908-918, 2007.

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

TECHNOLOGY review. Redesigning life to make ethanol. Technology Review – an MIT Enterprise. Disponível em:
www.technologyreview.com/printer_friendly_article.aspx?id=17052. Acesso em:
 28 de setembro de 2008.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista electrónica de Veterinaria**, v. VIII, n. 6, p. 1-9, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2005.

TUNG, L.A.; KING, C.J. Sorption and extraction of lactic and succinic acids at pH>pKa1. Factors governing equilibria. **Industria & Engineering Chemistry Research**, n.33, v. 12. p. 3224-3229, 1994.

ÚNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. 2008. O bagaço de cana como alternativa energética. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/opiniaio/show.asp?msgCode={46B20D1D-D55C-4E4B-8D13-4919D0FB6F67}>>. Acesso em: 09 de abril de 2009.

UHARI, M.; TERHI, T. KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 144-147, 2001.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, pg, 1-12, 2002.

WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 213-220, 2001.

WEE, Y. J.; RYU, H. W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4262-4270, 2009.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of -xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

YABANNAVAR, V.M., WANG, D.I.C. Strategies for reducing solvent toxicity in extractive fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 716-722, 1991.

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

APÊNDICE

Apêndice A - Tabelas com as concentrações dos diferentes compostos presentes no hidrolisado durante as fermentações do hidrolisado tratado por alteração de pH

Tabela A2 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Candida guilliermondii* FTI 20037

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác.acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	5,075	50,88	5,474	3,397	0	0,00	1,22
12	0,501	41,7	5,961	2,683	3,324	2,61	1,94
24	0,302	35,11	4,768	2,572	4,159	7,08	3,13
36	0,306	25,91	4,588	2,102	4,577	12,88	4,99
48	0,309	18,25	4,308	1,747	4,746	18,55	8,40
60	0,312	9,48	3,957	1,280	4,888	25,01	10,54
72	0,322	3,15	0	0,713	4,361	32,02	13,93

Tabela A3 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Pichia stipitis* IMH 43.2

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L-arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	5,251	51,61	5,367	3,474	0	0	0,93
12	4,152	51,85	5,439	3,362	0,22	0	2,78
24	0,651	49,55	5,600	2,970	2,17	0	2,83
36	0,48	44,62	5,976	2,348	3,74	0	3,08
48	0,48	39,89	6,512	1,783	4,47	0	3,27
60	0,48	35,29	7,140	1,437	5,7	0	3,29
72	0,293	30,57	7,644	1,013	5,98	0	3,75

Apêndice B - Tabelas com as concentrações dos diferentes compostos presentes no hidrolisado durante as fermentações do hidrolisado tratado por resinas de troca iônica

Tabela B1 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Candida guilliermondii* FTI 20037

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	2,834	23,84	2,556	1,392	0	0,00	0,90
12	0,514	14,73	2,310	0,855	1,583	2,94	2,69
24	0,529	7,38	2,157	0,568	2,087	7,04	4,87
36	0,575	1,82	1,829	0	2,716	9,25	7,44
48	0	0,61	0,614	0	2,695	9,79	10,56
60	0	0,58	0,589	0	1,437	9,10	14,45
72	0	0,22	0,513	0	1,804	7,03	14,61

Tabela B2 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Pichia stipitis* IMH 43.2

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	2,971	26,03	2,848	1,575	0	0	1,25
12	0	20,82	3,061	1,013	2,22	0	1,39
24	0	15,08	3,327	0,702	2,88	0	1,81
36	0	9,38	3,586	0,559	4,18	0	2,22
48	0	5,95	3,729	0,364	4,54	0	2,60
60	0	5,94	3,745	0,364	4,51	0	2,88
72	0	1,77	3,731	0,37	3,87	0	2,79

Apêndice C - Tabelas com as concentrações dos diferentes compostos presentes no hidrolisado durante as fermentações do hidrolisado tratado por Extração com membranas

Tabela C1 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Candida guilliermondii* FTI 20037

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L-arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	5,440	55,99	6,012	2,407	0	0	1,06
12	2,403	46,12	5,611	1,901	1,076	0	1,45
24	0,523	43,81	5,412	1,554	3,555	2,06	1,68
36	0,496	38,96	5,285	1,169	4,606	4,33	2,93
48	0,299	31,94	5,051	0,782	5,476	7,86	3,39
60	0,297	23,63	4,984	0,421	6,008	12,83	4,72
72	0	8,73	4,863	0,158	6,148	18,65	6,04

Tabela C2 - Concentrações dos diferentes compostos do hidrolisado durante a fermentação por *Pichia stipitis* IMH 43.2

Tempo (h)	D-glicose (g/L)	D-xilose (g/L)	L- arabinose (g/L)	ác. acético (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	Biomassa (g/L)
0	5,680	59,97	6,597	2,613	0	0	1,03
12	5,371	56,76	6,288	2,480	0	0	1,06
24	5,288	55,9	6,204	2,432	0	0	1,21
36	5,357	56,27	6,192	2,451	0	0	1,59
48	5,418	57,17	6,263	2,461	0	0	1,67
60	5,412	56,7	6,163	2,461	0	0	1,82
72	5,448	57,24	6,204	2,476	0	0	1,90

Apendice A1 - Fluxograma do trabalho realizado