

PABLO GOMES KIIPER

**Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e
fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus de
Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do título de
Mestrado em Ciências Biológicas (área
de Microbiologia Aplicada)

Orientador: Pedro de Oliva Neto

RIO CLARO

12/2009

547.29 Kiipper, Pablo Gomes
K57e Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de
cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose
por *Pachysolen tannophilus*. / Pablo Gomes Kiipper. - Rio
Claro : [s.n.], 2009
100 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Fermentação. 2. Xilose. 3. Pré-hidrólise ácida. 4.
Bagaço. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

PABLO GOMES KIIPER

**Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e
fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus de
Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do título de
Mestrado em Ciências Biológicas (área
de Microbiologia Aplicada)

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Prof^a. Dr^a. Dejanira de Franceschi de Angelis

Prof^a Dr^a. Sandra Regina Ceccato Antonini

Rio Claro, 10 de Dezembro de 2009

Dedico este trabalho àqueles que contribuíram com a minha educação desde o início.

Izabel Gomes

Marcílio Kazuhiko Sakyama

Sérgio Machado Kiipper

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto pela orientação, dedicação e confiança. Por me ajudar a crescer como biólogo ao longo destes anos

Aos alunos de Biologia Biotecnologia da Unesp de Assis, Bruna Escaramboni e Jhonny Takao, pela cooperação, dedicação e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

À CNPQ pela bolsa oferecida durante parte da realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação de Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da UNESP de Rio Claro, que me ajudaram inúmeras vezes e sempre foram tão solícitos.

Ao amigo Marcos de Freitas Barbosa pela ajuda com equipamentos, reagentes, técnicas e muitas horas juntos em laboratório adaptando e aprendendo com os experimentos.

À empresa CITROVITA AGRO INDÚSTRIAL LTDA pela disponibilidade de suas instalações e equipamentos.

À USINA NOVA AMÉRICA pela doação de materiais e aos seus funcionários por suas colaborações.

A Prof^a. Dr^a. Valéria Marta Gomes de Lima por suas contribuições e conselhos durante muitas horas no laboratório de bioquímica e microbiologia da UNESP de Aassis.

As Prof^{as}. Dr^{as}. Dejanira de F. de Angelis e Sandra Mara M Franchetti, por me ajudarem com material, conselhos, conhecimento e paciência quando precisei.

Aos meus companheiros de laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Assis pela força e amizade.

À minha família por me apoiar nos momentos mais difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho.

E, especialmente, à minha grande esposa, Camila Bueno Grejo, por ter sido um porto seguro para mim durante toda a realização deste mestrado.

SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. Cana de açúcar	21
3.1.1. Constituição do bagaço de cana-de-açúcar.....	21
3.1.2 A biomassa palha e pontas.....	22
3.2. Parede Celular	23
3.2.1. Celulose.....	23
3.2.2. Hemicelulose.....	25
3.2.3. Lignina.....	27
3.2.4. Materiais facilmente extraíveis.....	28
3.3. Materiais lignocelulósicos	30
3.4. Pré-Hidrólise de material Lignocelulósico e deslignificação	31
3.5. Hidrólise ácida	34
3.6. Hidrólise Enzimática	38
3.7. Produção de etanol e agentes inibidores da fermentação alcoólica	39
3.8. <i>Pachysollen tannophilus</i>	42

4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Material	47
4.1.1. Material lignocelulósico.....	47
4.1.2. Microrganismo.....	47
4.1.3. Reagentes	47
4.2. Métodos	48
4.2.1. Pré-tratamento ácido e deslignificação.....	48
4.2.2. Hidrólise ácida.....	51
4.3. Fermentação Alcoólica	53
4.4. Análises	54
4.4.1. Determinação do teor de lignina solúvel e insolúvel do pré-tratamento.....	54
4.4.2. Determinação de açúcares redutores.....	54
4.4.3. Determinação dos açúcares obtidos do pré-tratamento do bagaço da cana.....	55
4.4.3.1. <i>Determinação das concentrações de glicose</i>	55
4.4.3.2. <i>Determinação das concentrações de xilose</i>	56
4.4.4. Determinação das concentrações de furfural.....	56
4.4.5. Determinação das concentrações de 5-hidroximetilfurfural.....	57
4.4.6. Determinação da concentração de etanol.....	58
4.4.7. Cálculo da eficiência da fermentação alcoólica.....	58
4.4.8. Concentração de acidez e pH.....	59
4.4.9. Viabilidade celular.....	59
4.4.10. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. Pré-tratamento ácido	60
5.1.1. Deslignificação.....	60
5.1.2. Açúcares Redutores obtidos na pré-hidrólise.....	63
5.1.2.1. <i>Concentração de glicose obtida na pré-hidrólise</i>	66
5.1.2.2. <i>Concentração de xilose obtida na pré-hidrólise</i>	69
5.1.3. Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	72

5.2. Hidrólise ácida	74
5.2.1. Açúcares redutores.....	74
5.3. Ensaio fermentativo	76
5.3.1. Determinação da concentração de etanol.....	76
5.3.2. Cálculo da eficiência da fermentação alcoólica.....	78
5.3.3. Concentração de açúcares redutores.....	79
5.3.4. Concentração de acidez e pH.....	81
5.3.5. Viabilidade celular.....	82
5.3.6. Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	85
6. CONCLUSÕES	86
7. LITERATURA CITADA	87

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Diagrama indicando a disposição em um corte transversal dos compostos de fibra lignocelulósica.
- FIGURA 2** - Composição química do bagaço da cana-de-açúcar. (ROSSEL, 2006)
- FIGURA 3** - Unidades de glicose na celulose. (Fonte: LEHNINGER, 1984)
- FIGURA 4** - Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D- Glicose (Fonte: LEHNINGER, 1984)
- FIGURA 5** - Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose. (Fonte: LEHNINGER, 1984)
- FIGURA 6** - Estrutura proposta para macromolécula de lignina de Eucalipto. (Fonte: LEHNINGER, 1984)
- FIGURA 7** - Estrutura dos álcoois precursores da lignina. (Fonte: LEHNINGER, 1984).
- FIGURA 8** - Fluxograma da pré-hidrólise e processamento do bagaço para hidrólise ácida.
- FIGURA 9** - Fluxograma do processamento do bagaço da cana para determinação de melhor pré-hidrólise e hidrólise ácida.
- FIGURA 10** - Avaliação percentual da deslignificação do bagaço pré-tratado em diferentes condições de tempo e concentração de H_2SO_4 a $120^\circ C$ de temperatura e solvente organosolv (1:1) (v/v).
- FIGURA 11** - Avaliação percentual da deslignificação do bagaço pré-tratado em diferentes condições de tempo com concentração de 1,0% de H_2SO_4 a $120^\circ C$ de temperatura.
- FIGURA 12** - Teor de açúcares redutores obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise à $121^\circ C$ e 1 atm.

- FIGURA 13** - Avaliação do desempenho concentração ácida para obtenção de maior concentração de açúcares redutores proveniente da pré-hidrólise à 120°C e com 60 minutos de reação.
- FIGURA 14** - Avaliação do desempenho de extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 60 minutos de reação com diferentes condições de concentração de H₂SO₄ a 120°C.
- FIGURA 15** - Avaliação do desempenho da extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida em diferentes tempos de reação com concentração 1,0% de H₂SO₄ à 120°C.
- FIGURA 16** - Avaliação do desempenho da melhor condição para obtenção de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida à 1,0% de H₂SO₄ a 120°C.
- FIGURA 17** - Avaliação do desempenho da concentração de H₂SO₄ para obtenção de maior concentração de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida a 120°C com 60 min.
- FIGURA 18** - Efeito da pré-hidrólise do bagaço da cana à 120°C em diferentes concentrações de H₂SO₄ na produção de furfural e hidroximetilfurfural (HMF).
- FIGURA 19** - Efeito do tempo de pré-hidrólise ácida do bagaço da cana à 120°C com 1,0% de H₂SO₄ e solvente organosolv.
- FIGURA 20** - Avaliação do teor alcoólico das amostras da fermentação alcoólica em 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysollen tannophilus*.
- FIGURA 21** - Avaliação do consumo dos açúcares vs fermentação alcoólica em 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysollen tannophilus*.
- FIGURA 22** - Avaliação do rendimento etanólico nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana por *Pachysollen tannophilus*.

- FIGURA 23** - Avaliação da média do consumo dos açúcares redutores e xilose durante fermentação alcoólica de 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.
- FIGURA 24** - Avaliação da variação de pH dos diferentes tempos de fermentação por *Pachysolen tannophilus*.
- FIGURA 25** - Avaliação da viabilidade celular de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.
- FIGURA 26** - Avaliação do brotamento total das células de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.
- FIGURA 27** - Avaliação do número de brotos mortos em relação aos brotos vivos de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.
- FIGURA 28** - Avaliação da concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) no mosto de xilose nos tempos 0 hora e 120 horas de fermentação alcoólica por *Pachysolen tannophilus*.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Principais constituintes do caldo da cana-de-açúcar. (Fonte: ROSSEL, 2006).
- TABELA 2 - Distribuição percentual de celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos (BAILEY; OLLIS, 1986).
- TABELA 3 - Protocolo Experimental de pré-tratamento ácido do bagaço da cana.
- TABELA 4 - Protocolo experimental das condições estabelecidas para hidrólise ácida do bagaço de cana para obtenção do pré-hidrolisado.
- TABELA 5 - Protocolo experimental para determinação das concentrações de glicose das amostras de pré-hidrolisado e mosto.
- TABELA 6 - Protocolo experimental para determinação das concentrações de xilose das amostras de pré-hidrolisado e mosto.
- TABELA 7 - Porcentagem de deslignificação e rendimento do bagaço em diferentes condições de tempo e concentração de H_2SO_4 a $120^\circ C$ de temperatura e solvente organosolv (1:1) (v/v).
- TABELA 8 - Teor de açúcares redutores obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise à $121^\circ C$ e 1 atm.
- TABELA 9 - Melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com 1,0% de H_2SO_4 à $121^\circ C$ e 1 atm durante 60 min.
- TABELA 10 - Avaliação do desempenho de extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 60 minutos de reação com diferentes condições de concentração de H_2SO_4 a $120^\circ C$.
- TABELA 11 - Avaliação do desempenho para extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 1,0% de H_2SO_4 a $120^\circ C$.
- TABELA 12 - Avaliação do desempenho da condição para obtenção de maior extração de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida com 1,0% de H_2SO_4 a $120^\circ C$.

TABELA 13 - Avaliação do desempenho da concentração ácida para obtenção de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida à 1,0% de H₂SO₄ a 120°C com 60 min.

TABELA 14 - Hidrólise ácida do bagaço pré-tratado: Açúcares redutores (AR) obtidos em diferentes tempos de reação e concentração de ácido sulfúrico a 121°C a 1atm.

TABELA 15 - Concentração de etanol das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

TABELA 16 - Rendimento de teor alcoólico/g de xilose consumido das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

TABELA 17 - Açúcares redutores consumidos nos diferentes tempo da fermentação alcoólica via *Pachysolen tannophilus*.

TABELA 18 - Consumo da concentração de xilose das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

RESUMO

A utilização de solvente Organosolv em condições de acidez e temperaturas elevadas para a realização da deslignificação de bagaço de cana e hidrólise da fração de hemicelulose tem sido muito estudada e existem muitos parâmetros experimentais já descritos na literatura. Tem sido obtidos bons resultados de deslignificação e hidrólise parcial do bagaço a partir do pré-tratamento ácido com solvente Organosolv utilizando misturas de etanol e água, normalmente em proporções iguais de volume de cada.

Este estudo descreve um método de deslignificação e hidrólise da hemicelulose do bagaço da cana combinando a utilização da mistura dos solventes orgânicos, acetona e álcool, com água e solução ácida diluída. A mistura do solvente organosolv (acetona+álcool/água – 1:1 v/v), concentração ácida de 0,5 - 2,0% de H₂SO₄, e tempo de reação de 30 a 120 minutos e 5,0% de bagaço (p/v) foi realizado para o pré-tratamento. O efeito do ácido, solvente e temperatura no rendimento e extensão da deslignificação e hidrólise foram estudados.

Os resultados obtidos indicam importantes diferenças no pré-tratamento ácido com solvente Organosolv, devido ao uso da acetona e concentração ácida empregados nos experimentos deste estudo. Os melhores resultados foram obtidos com 1,0% de H₂SO₄ e 120 °C. Sob estas condições o rendimento de açúcares obtidos da hidrólise ácida da porção de hemicelulose do bagaço de cana foi de 7.53%. Estes resultados demonstram um rendimento de açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados como fonte de carbono para a fermentação alcoólica por *Pachysolen tannophilus*.

A conversão de Xilose em etanol por *Pachysolen tannophilus* é relativamente ineficiente nas condições de fermentação estudada. Esta ineficiência é atribuída em partes, ao consumo de etanol pela levedura concorrente à sua produção, baixa eficiência de fermentação e à formação de xilitol e outros subprodutos. A concentração de xilose utilizada no mosto foi de 2,0% para 120 horas de fermentação. Os melhores resultados de rendimento de teor alcoólico foram obtidos nas primeiras 24 horas de fermentação, assim que se inicia o consumo de etanol e a concentração de etanol diminui o rendimento de teor alcoólico cai. O rendimento de etanol obtido com 24 horas de fermentação foi de 0,21% e o tempo de fermentação com maior eficiência de rendimento foi de 0,234 com 12 horas de fermentação.

ABSTRACT

The utilization of Organosolv solvents under acid and high temperature conditions in the delignification and hemicelulose and cellulose hydrolysis of wood and bagasse has already been reported in the literature for several experimental parameters. Organosolv treatment of sugarcane bagasse has also been reported and has shown good results with ethanol–water mixtures, normally at volume ratios close to unit. This study describes a method of the delignification hemicelulose hydrolysis of sugarcane bagasse combining the use of ethanol+acetone/water mixtures and diluted acid solutions. Ethanol+acetone/water mixture (1:1 v/v), acid concentration of 0,5 - 2,0% of H₂SO₄, reaction times from 30 to 120 min, and 5,0% of sugarcane bagasse (w/v) was carried out for bagasse pre-treatment. The effect of acid, solvent and temperature on the yield and extent of delignification and hemicelulose hydrolysis was studied.

The obtained results indicate important differences from the Organosolv process, which may be due to the presence of acetone and acid concentration employed in this work. The best results were obtained at 1,0% of H₂SO₄ and 120 °C. Under these conditions the sugar yield obtained from hemicelulose hydrolysis from sugarcane bagasse 7.53%. These results shows that the sugar yield obtained can be used as carbon source for *Pachysolen tannophilus* fermentation to produce ethanol.

The conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus* is relatively inefficient in batch culture. The inefficiency has been attributed in part to concurrent utilization of ethanol, slow fermentation metabolism of the yeast and to the formation of xylitol and other by-products. The xylose concentration in the must was 2,0% during 120 hours of fermentation. The best ethanol yield was obtained in the first 24 hours, as the ethanol began to be consumed and the sugar concentration became low the yield became low. The yield of ethanol obtained with 24 hours of fermentation was 0,21% and the efficiency of the process was 0,234 with 12 hours of fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil defronta-se com a perspectiva de um aumento significativo da demanda de álcool combustível. Esta previsão sustenta-se em três realidades de mercado: aumento interno do consumo de álcool hidratado pelo sucesso da introdução da alternativa *flex-fuel* no mercado de veículos automotivos leves; expansão das exportações brasileiras de álcool em função do crescente interesse mundial pela mistura do álcool à gasolina; opção brasileira pela produção do biodiesel utilizando etanol na transesterificação dos óleos vegetais.

Uma visão realista projeta a necessidade de dobrar a produção de álcool brasileiro nos próximos 5-10 anos. Este importante salto de produção que começa a tornar-se realidade pela implantação de novas usinas, abrindo novas fronteiras agrícolas para cana-de-açúcar, exigirá paralelamente, um esforço concentrado na busca de um aumento significativo na produtividade alcançada em litros de álcool produzido por hectare-ano de cana plantada. Este aumento poderá ser alcançado por duas rotas tecnológicas. A primeira rota em seu foco voltado para área agrícola e buscará por meio da ampliação do atual programa de introdução de novas variedades de cana e futuramente pelo emprego de cana transgênica, estender e, se possível, potencializar o atual nível de aumento de produtividade em toneladas de cana/hectare-ano, que gira em torno de 2,5 % ao ano. A segunda rota focada no setor industrial buscará desenvolver tecnologias que permitam o aproveitamento integral da cana-de-açúcar na produção de etanol ou outros combustíveis renováveis ou mesmo pelo conceito da biorefinaria, agregar valor à cadeia da cana, pela produção de novos produtos. Estas novas

tecnologias concentram-se em duas linhas principais: a hidrólise do material lignocelulósico para a produção de açúcares fermentescíveis (rota química e biológica) e a gaseificação deste material seguida pela síntese de combustíveis líquidos (rota térmica) (BONOMI, 2006).

O recente aumento do interesse pela produção de etanol como substituto de combustíveis fósseis é previsível, uma vez que não contribui para o efeito estufa (MARTIN, 2002), e o Brasil encontra-se em um estado promissor na produção de álcool e materiais lignocelulósicos, mas a produção de etanol em países tropicais é baseada, principalmente na fermentação do caldo de cana-de-açúcar. A disponibilidade destes substratos, contudo, não é suficiente para satisfazer toda a demanda potencial de álcool combustível.

A biomassa representa um dos únicos recursos energéticos renováveis que pode ser explorada significativamente para a necessidade de energia, ao longo dos próximos anos. No Brasil, o uso da cana-de-açúcar para obtenção de álcool é muito importante e sua produção e consumo vêm crescendo a cada ano. O álcool pode ser obtido também a partir do melaço da produção de açúcar nas usinas, como este último é um produto muito importante para alimentação, indústrias farmacêuticas e outros não é economicamente viável a sua utilização somente para a fermentação alcoólica e novas fontes de glicose devem ser encontradas para suprir a crescente demanda de álcool combustível no mundo.

Devido também à crescente preocupação com o efeito estufa, o álcool tem sido considerado por um número cada vez maior de países como uma alternativa eficaz de substituição de combustíveis fósseis. Resíduos ricos em celulose, que atualmente são utilizados para produção de rações, adubo e produção de energia a partir de sua queima têm um potencial promissor na produção de etanol por serem abundantes e de baixo custo. O bagaço da cana-de-açúcar é uma fonte alternativa e renovável. Além disso, é produzido no próprio território nacional, não havendo, em consequência, o risco de sofrer grandes alterações no preço por causa do dólar.

Nas Usinas de açúcar e álcool, uma grande quantidade de material lignocelulósico (bagaço) é produzida para a extração do caldo da cana e este resíduo poderia ser utilizado para a produção de álcool, a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose do bagaço. A produção de álcool a partir do bagaço da cana-de-açúcar poderia ser uma forma importante de diminuição da emissão de gás carbônico, além dos bicomcombustíveis serem muito eficientes e apresentarem alto rendimento. O uso do etanol não aumenta o impacto ambiental causado pela emissão de poluentes, desta forma, sua produção a partir de resíduos como o bagaço da

cana-de-açúcar irá contribuir com países em desenvolvimento, tanto ecologicamente quanto economicamente.

A produção mundial de etanol atingiu os 36,5 bilhões de litros em 2006, dos quais 42,5% eram produzidos pelo Brasil com a cana-de-açúcar, e 44,5% pelos EUA com o milho. O Brasil produzindo atualmente 21 bilhões de litros de álcool poderia, de acordo com Schuchardt et al. (1988), com o uso de processos melhorados para a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar, dobrar o rendimento de açúcar ou álcool por hectare plantado resultando numa produção de, pelo menos, 40 bilhões de litros anuais. De acordo com Berthelot et al. (1943), uma tonelada de madeira poderia render, teoricamente, 61,1% de açúcares da série C6 ou 83,3% de açúcares das séries C6 e C5. Praticamente 200-300 litros de etanol seriam obtidos.

Para que possa ser utilizada como matéria-prima fermentescível, a celulose deve ser exposta ao catalisador, e para isso, o material lignocelulósico deve passar por um processo de pré-tratamento que remova totalmente ou em parte, o selo de lignina e hemicelulose que protege a celulose, (figura 1). A estrutura complexa e compacta faz necessário submeter esta biomassa à pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise para produção de etanol. O pré-tratamento visa à remoção da lignina e da hemicelulose, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível a hidrólise. Independentemente do tipo de hidrólise empregado (quer ele seja ácido ou enzimático), uma etapa de pré-tratamento é imprescindível. Existem vários métodos de pré-tratamento: físico (explosão a vapor), químico (álcalis, ácidos, solventes, gases, e outros) e biológico (enzima ou fungos), sendo que o desenvolvimento do químico e biológico parecem ser mais interessantes para a obtenção destes açúcares (PASQUINI et al., 2005).

A hidrólise biológica é realizada mediante a ação de celulasas, enzimas que hidrolisam a celulose em açúcares que possam ser fermentados, obtidas através do cultivo de linhagens de fungos lignocelulolíticos. A hidrólise enzimática não gera substâncias tóxicas, mas o processo não é eficiente em gerar um substrato bom para ser fermentado, devido ao baixo número de monossacarídeos e alto nível de oligossacarídeos (PESSOA JR et al., 1997) visto que os microrganismos utilizados na produção de etanol utilizam principalmente os dissacarídeos como a sacarose e monossacarídeos hexoses e pentoses, como a glicose e xilose respectivamente. Outro problema da hidrólise enzimática é o alto custo das usinas, tornando o processo inviável economicamente para a produção industrial e também devido ao fato da tecnologia não estar disponível para produção industrial (ROSSEL et al., 2005).

O tratamento ácido é eficiente em solubilizar e hidrolisar a celulose e hemicelulose da biomassa. Combinações de temperatura, pressão, concentração do ácido e tempo de reação podem resultar em altos níveis de açúcares para fermentação (ELANDER; HSU, 1995). A hidrólise ácida de lignocelulósicos é reconhecida como uma tecnologia eficiente na obtenção de açúcares fermentescíveis da biomassa do bagaço. Rossel et al. (2005) relatam que os ácidos minerais agem rapidamente como catalisadores na hidrólise destes polissacarídeos.

Os processos ácidos empregam normalmente os ácidos sulfúrico ou clorídrico e podem prescindir do pré-tratamento. Esses processos geram vários subprodutos inibidores da fermentação, devido à degradação parcial da glicose, da fração hemicelulósica e da lignina. Ademais os processos ácidos exigem o uso de equipamentos construídos com materiais caros para resistirem à corrosão e altas temperaturas que correspondem eventualmente a altas pressões. Estes constituem desafios a serem resolvidos para aplicação destes métodos.

O bagaço da cana-de-açúcar pode ser hidrolisado com ácidos fortes diluídos para a obtenção de uma mistura de açúcares para a fermentação e produção de álcool. Contudo, neste hidrolisado são produzidos resíduos que inibem os microrganismos que promovem a fermentação dos açúcares obtidos, como ácido acético, furfural, hidroximetil-furfural, compostos fenólicos (DOMINGUEZ et al., 1996) e o ácido utilizado deve ser neutralizado, pois o baixo pH também é fator inibitório de leveduras utilizadas no processo da fermentação de açúcares (MAIORELLA et al., 1983; OLIVA-NETO; YOKOYA., 1994; DORTA et al., 2006).

A hidrólise ácida tem sido investigada como um meio para tratamento de materiais lignocelulósicos residuais de madeira (SILVA, 1995), da cultura de arroz (ALMEIDA, 1991), polpa açucarada de beterraba (CHAMY et al., 1994) e resíduos da cultura de trigo (FANTA et al., 1984). Portanto, o desenvolvimento de uma tecnologia de pré-tratamento ácido, e posterior hidrólise enzimática ou hidrólise ácida são muito importantes para a obtenção de açúcares para fermentação alcoólica e, conseqüentemente, aumento na produção de bioetanol.

No Brasil, o bagaço é utilizado para a co-geração de energia através de sua queima nas próprias usinas e desta forma, o processo é visto como uma utilização econômica deste resíduo para indústria sucro-alcooleira. De acordo com dados apresentados por Finguerut (2006) estima-se que após a queima de bagaço para a co-geração de energia, ainda há uma sobra de aproximadamente 7% de todo bagaço gerado. Isso parece pouco, porem considerando-se o volume de toneladas de cana produzidas e moídas, é muito. Segundo Rossel (2006) há um excedente de 140 kg de bagaço/ton de cana.

Com a finalidade de aproveitar o bagaço excedente e oferecer às indústrias uma alternativa de produção de açucares e etanol combustível, e aplicar o conhecimento biotecnológico e bioquímico, este projeto visa encontrar novos caminhos para a utilização deste resíduo para obtenção destes produtos.

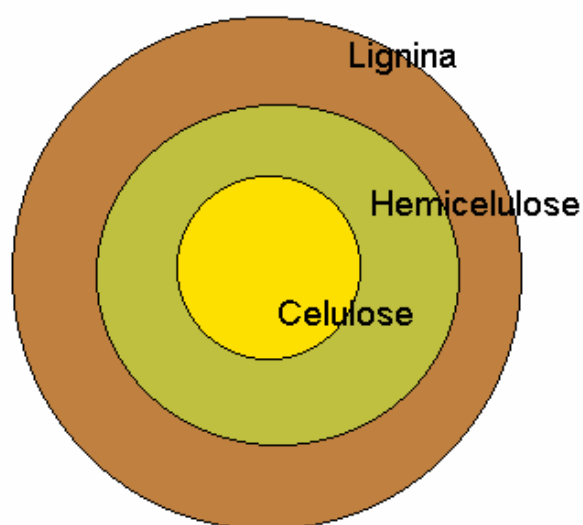


Figura 1 – Diagrama indicando a disposição em um corte transversal dos compostos de fibra lignocelulósica.

2. OBJETIVOS

Este estudo visa explorar e encontrar novas metodologias para o processo de pré-tratamento ácido e hidrólise ácida para obtenção de álcool a partir dos açúcares resultantes no hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar através do desenvolvimento dos seguintes objetivos:

- Deslignificação do material lignocelulósico do bagaço da cana-de-açúcar com pré-tratamento ácido e solvente organosolv.
- Desenvolver nova metodologia de pré-tratamento ácido e hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis e determinação do rendimento de açúcares redutores.
- Caracterização dos açúcares obtidos da pré-hidrólise do bagaço e fermentação alcoólica dos açúcares obtidos via *Pachysolen tannophilus*.
- Determinação da formação de furfural e 5-hidroximetilfurfural no pré-hidrolisado, como fatores de inibição do processo de fermentação.
- Determinação do rendimento da fermentação alcoólica do mosto obtido no hidrolisado do pré-tratamento ácido do bagaço.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana de açúcar

3.1.1. Constituição do bagaço de cana-de-açúcar

A origem provável da cana-de-açúcar data de 6 mil anos AC em regiões próximas à Índia. Durante a Antigüidade, porém, o açúcar não passava de uma especiaria exótica, sendo utilizada apenas como tempero ou remédio. O preparo de alimentos adocicados era feito com mel de abelhas.

No século 12, o açúcar chegou à Europa. Importantes regiões produtoras surgiram nos séculos seguintes, especialmente no Extremo Oriente. O interesse pela especiaria foi crescente depois do século 15, quando novas bebidas, como o café, o chá e o chocolate eram adoçados com açúcar. Em 1493, Cristóvão Colombo iniciou o cultivo da cana-de-açúcar nas Antilhas. A partir daí, a história do açúcar no mundo ganhou novas dimensões.

Segundo sua natureza, o bagaço é uma biomassa fibrosa que contém, em base seca, as diversas substâncias como constantes da Figura 2.

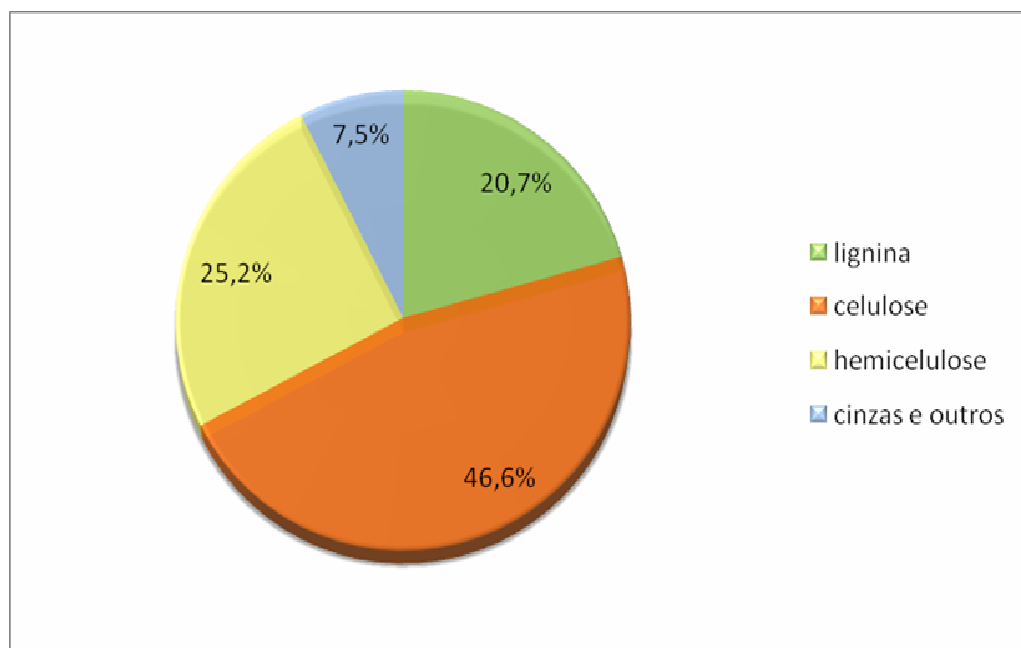


Figura 2 – Composição química do bagaço da cana-de-açúcar. (ROSSEL, 2006)

As características técnicas do bagaço de cana são estáveis e após a extração do caldo este apresenta um teor de umidade entre 45 e 50%. O bagaço de cana apresenta um elevado conteúdo de voláteis, quando comparado a outros tipos de combustíveis, fator a ser considerado durante a sua queima total e gaseificação. Apresenta também um baixo teor de carbono fixo.

3.1.2 A biomassa palha e pontas

A análise da palha foi realizada em seus três componentes: folhas verdes, folhas secas e ponteiros e mostrou que seus componentes apresentam diferenças importantes em umidade, teor de álcalis e outras características, mesmo sendo semelhantes na composição básica de celulose, hemicelulose e lignina. Fatores como a variedade de cana, idade, número de cortes, e do uso ou não de vinhoto na fertirrigação e do campo exercem influência importante nas características. Há grande variação no teor de umidade entre os componentes da palha, na condição “como colhida” (2,7% nas folhas secas, a 84,9 nos ponteiros). Cinzas, voláteis, carbono fixo e poder calorífico superior (base seca) variam muito pouco. Basicamente, a sacarose é o principal componente do caldo da cana-de-açúcar (líquido) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais constituintes do caldo da cana-de-açúcar. (Fonte: ROSSEL, 2006).

Constituintes	Sólidos solúveis (%)
Açúcares	75 a 93
Sacarose	70 a 91
Glicose	2 a 4
Frutose	2 a 4
Sais	3,0 a 5,0
de ácidos inorgânicos	1,5 a 4,5
de ácidos orgânicos	1,0 a 3,0
Proteínas	0,5 a 0,6
Amido	0,001 a 0,05
Ceras e graxas	0,05 a 0,15
Corantes	3 a 5

3.2. Parede Celular

Os tecidos vegetais são constituídos por células de parede celular, cujos formatos e dimensões variam entre as diferentes espécies de madeira. As células são mantidas unidas quase inteiramente composto por lignina (MARTINS, 2005). Em geral, a parede celular das plantas é subdividida em parede primária e secundária. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina nessas camadas variam de acordo com a espécie vegetal.

3.2.1. Celulose

A celulose é o maior componente estrutural de todas as células vegetais, é o mais abundante componente orgânico da Terra. Cada molécula de celulose é uma cadeia longa e não-ramificada de subunidades de D-glucose, como representada na figura 3, com uma massa molecular variando de 50000 a 2,5 milhões nas diferentes espécies, equivalendo de 300 mil a 15 mil resíduos de glucose (BAILEY; OLLIS, 1986).

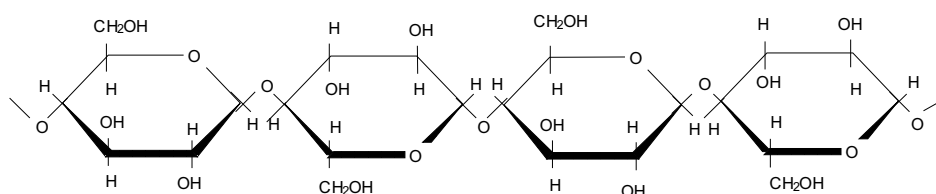


Figura 3 - Unidades de glicose na celulose. (Fonte: LEHNINGER, 1984)

Embora a ligação glicosídica na celulose ocorra entre os carbonos 1 e 4 de sucessivas unidades de glicose. Essas unidades são ligadas de maneira diferente em relação a amilose. Esta diferença na estrutura é significativa. Enquanto muitos microorganismos plantas e animais possuem as enzimas necessárias para hidrolisar as ligações β -1,4 encontradas no amido ou no glicogênio, poucos seres vivos podem hidrolisar as ligações β -1,4 da celulose. Um dos produtos da hidrólise enzimática da celulose é a celobiose (O- β -D-glucopiranosil-1,4- β -D-glucopiranoose), um dímero formado por duas unidades de glicose unidas por uma ligação β -1,4 (BAILEY; OLLIS, 1986), como apresentado nas figuras 3 e 4.

A resistência da celulose à degradação deve-se mais a sua estrutura cristalina e ao seu empacotamento do que às ligações glicosídicas β -1,4. A maior parte da celulose está organizada em regiões cristalinas altamente ordenadas, nas quais as cadeias de celulose ou fibrilas encontram-se tão firmemente compactadas que moléculas da água raramente penetram. Assim, a celulose é insolúvel na água. Porções menos ordenadas, chamadas regiões amorfas, compreendem aproximadamente 15% da microestrutura celulósica. As regiões amorfas são facilmente hidrolisadas por ácidos, enquanto as regiões cristalinas são muito mais difíceis de decompor. As fibrilas de celulose são agrupadas em microfibrilas. Os grupos de microfibrilas são envolvidos por moléculas de hemicelulose, e estas estruturas estão revestidas por uma camada de lignina que se une por ligação cruzada. Devido a este empacotamento, o termo lignocelulose é frequentemente usado para descrever estes materiais.

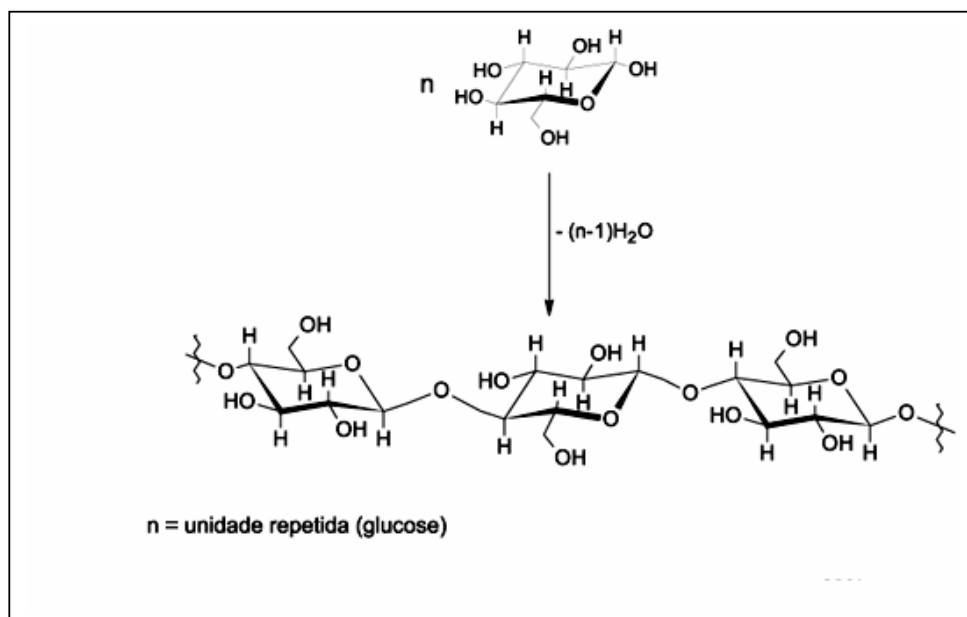


Figura 4 – Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D- Glicose (Fonte: LEHNINGER, 1984)

3.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são genericamente caracterizadas como uma família de polissacarídeos presente na parede celular vegetal. O termo hemicelulose foi primeiramente utilizado para designar polissacarídeos precursores da celulose. Com a evolução do conhecimento, constatou-se que isso não era verdadeiro e que as rotas envolvidas na síntese desses dois polissacarídeos são distintas. Alternativa foi a de considerar às hemiceluloses como polissacarídeos isolados da madeira em meio alcalino, mas essa hipótese acabou apresentando pouca sustentação porque a água quente também pode solubilizar polissacarídeos que não correspondem quimicamente às hemiceluloses. Atualmente, as hemiceluloses são genericamente definidas como polissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (MARTINS, 2005).

As hemiceluloses são formadas por uma ampla variedade de blocos constituídos de pentoses (por exemplo, xilose, ramnose e arabinose), hexoses (por exemplo, glicose manose e galactose) e ácidos urônicos (são exemplos os ácidos 4-O-metil-glucurônico e galacturônico) (Figura 5). São estruturalmente mais parecidas com a celulose que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (MARTINS, 2005).

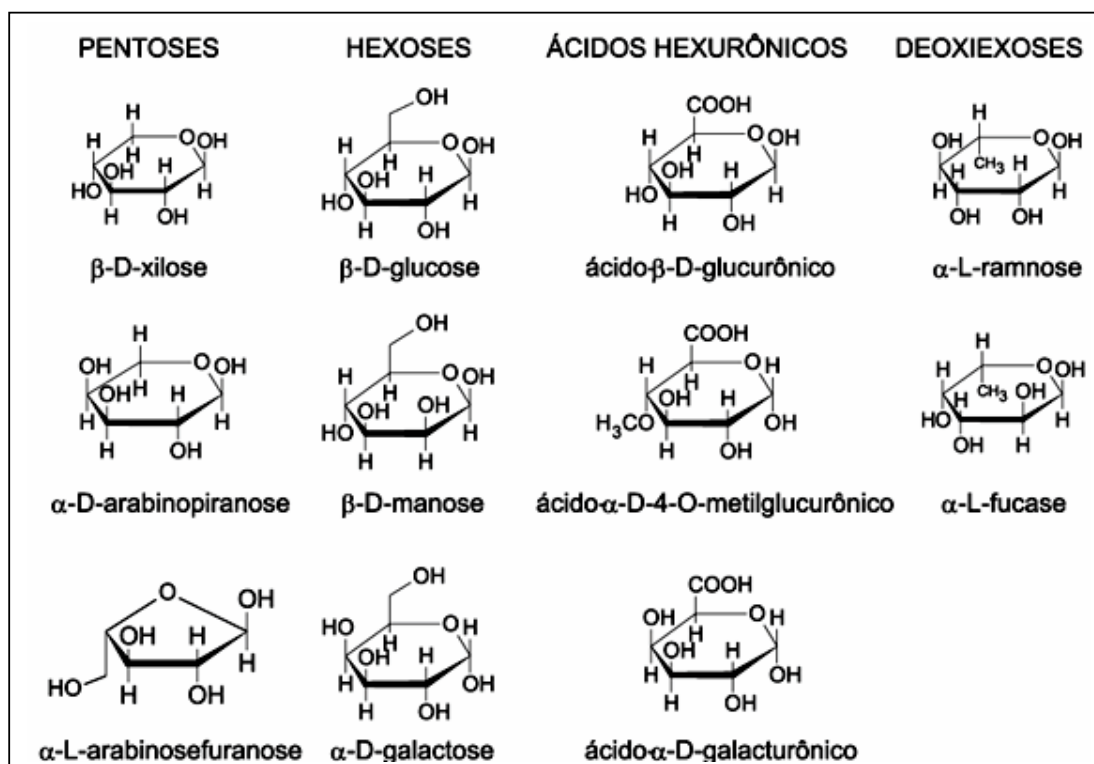


Figura 5 – Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose. (Fonte: LEHNINGER, 1984)

As hemiceluloses presentes em plantas folhosas e coníferas diferem significativamente entre si. As hemiceluloses de plantas folhosas são compostas principalmente por heteroxilanas altamente acetiladas, geralmente classificadas com 4-O-metil-glucuronoxilanas. Hexolanas também estão presentes, mas em quantidades muito pequenas como glucomananas. Devido à sua característica ácida e as suas propriedades químicas, as xilanas de folhosas são mais lábeis à hidrólise ácida e podem sofrer auto-hidrólise sob condições relativamente brandas. Ao contrário as coníferas têm uma grande proporção de glucomananas acetiladas e galactoglucomananas, e xilanas correspondem apenas a uma pequena fração. Como resultado disso, as hemiceluloses de folhosas (praticamente pentosanas) são mais lábeis a hidrólise ácida do que as hemiceluloses de coníferas (praticamente hexosanas) (MARTINS 2005).

As hemiceluloses são polímeros de pequenos ramificados de pentoses e algumas hexoses. Essas unidades normalmente contêm um grande número de grupos acetilados e estão unidas por ligações glicosídicas -1,3-, 1,6- e 1,4-. A hemicelulose pode ser solubilizada com relativa facilidade, empregando-se, por exemplo, ácido sulfúrico (0,05 a 3%) ou eventualmente com água quente (CALSAVARA, 1998).

3.2.3. Lignina

A lignina esta presente na madeira em cerca de 20% a 30%, agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (MARTINS, 2005).

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional muito complexa (Figura 6) e baseada em três precursores monoméricos: os álcoois áconiferílico, sinapílico e p-cumarílico (Figura 7). A proporção desses monômeros varia entre diferentes espécies de plantas e estas diferenças podem ser utilizadas com propósitos taxonômicos. Depende do grau de metoxilação, o grupo aromático e o p-hidroxibenzil (derivado do álcool p-cumarílico), guaiacil (derivado do álcool coniferílico) ou siringil (derivado do álcool sinapílico). A propriedade física mais importante dessa macromolécula orgânica é a sua rigidez, que não só confere estrutura ao tecido da planta, mas, também, previne de elementos condutores de água (MARTINS, 2005).

As ligninas de coníferas são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico (lignina do tipo G), enquanto as ligninas das folhosas contêm resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico (lignina tipo GS). Em contraste, as ligninas derivadas de gramíneas contêm os precursores básicos citados acima (lignina tipo HGS). Como consequência, as ligninas das folhosas possuem alta quantidade de grupos metoxílicos, são menos condensados e são mais suscetíveis à conversão química do que as ligninas derivadas das coníferas (MARTINS, 2005).

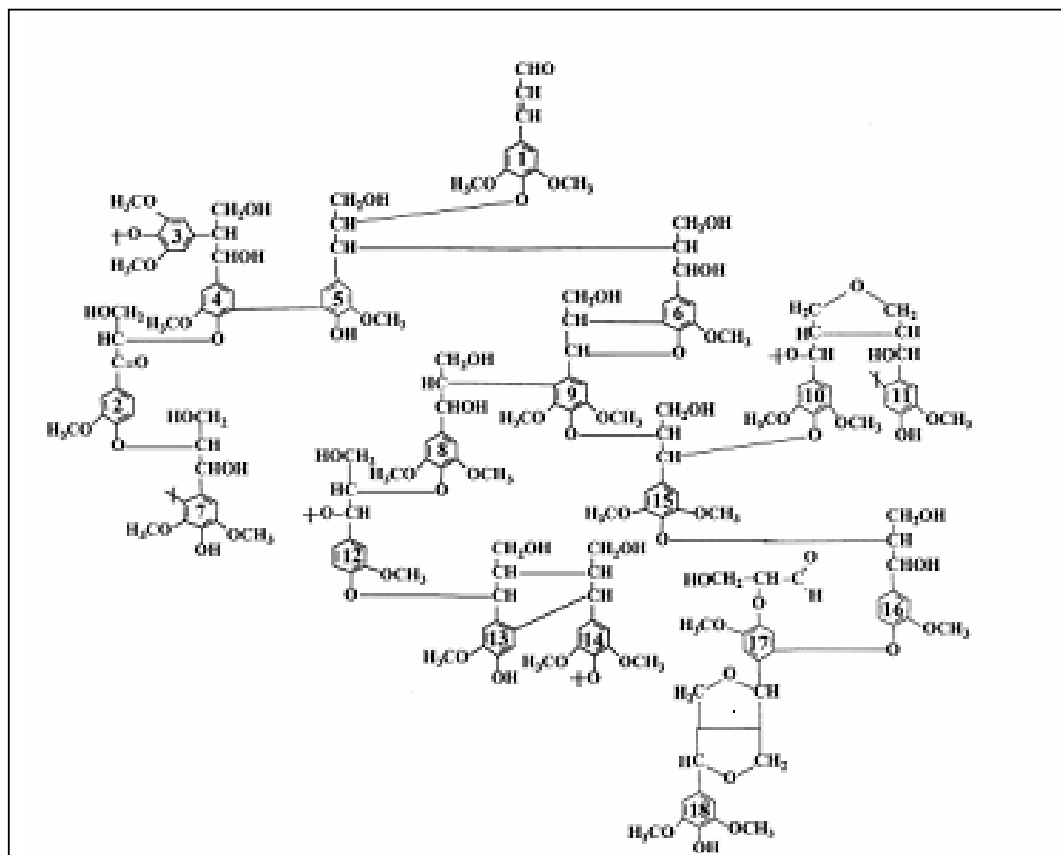


Figura 6 – Estrutura proposta para macromolécula de lignina de Eucalipto. (Fonte: LEHNINGER, 1984)

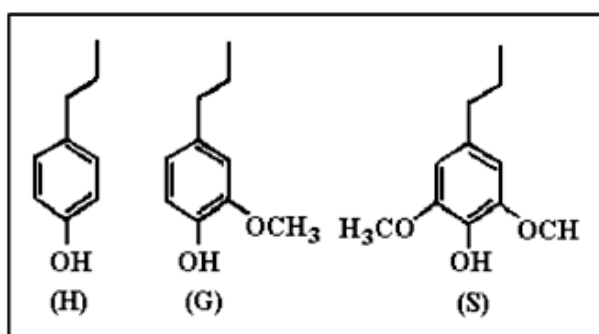


Figura 7 – Estrutura dos álcoois precursores da lignina. (Fonte: LEHNINGER, 1984):

3.2.4. Materiais facilmente extraíveis

Os componentes de menor massa molar, presente na fitobiomassa, incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença relativa é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na

parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais extraíveis em água e solventes orgânicos neutros ou volatilizados por arraste de vapor. A segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécticas (MARTINS, 2005).

O teor de materiais extraíveis em folhosas corresponde a cerca de 3 a 10%, estando esse valor em torno de 5 a 8% para as coníferas. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta, como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e suas propriedades abrasivas. É comum a denominação de resina para uma determinada classe de extrativos. Porém, este termo aplica-se a um conjunto de substâncias químicas que inibem a cristalização e, portanto, caracteriza mais a condição física do que a composição química da fração. Deste modo, os seguintes compostos podem ser encontrados em resinas de madeiras: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonoides e outros aromáticos. Além dessas substâncias, outros componentes orgânicos podem também estar presente, como gordura, ceras, ácidos graxos, álcoois, esferóides e hidrocarbonetos de elevada massa molar (MARTINS, 2005).

A tabela 3, apresenta a composição típica de alguns resíduos celulósicos onde constata-se que as proporções de celulose, hemicelulose e lignina variam consideravelmente com o tipo de material lignocelulósico (BAILEY; OLLIS, 1986).

Tabela 2 – Distribuição percentual de celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos (BAILEY; OLLIS, 1986).

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina
Tronco de madeira dura	40-45	24-40	18-25
Tronco de madeira mole	45-50	24-35	25-35
Pastagem (grama)	25-40	25-50	10-30
Folhas	15-20	80-85	0
Papel	40-45	24-50	18-30
Resíduos de papel da indústria de polpação	60-70	10-20	5-10
Bagaço de cana-de-açúcar	40-50	20-26	18-25

3.3. Materiais lignocelulósicos

O bagaço de cana-de-açúcar, por se tratar de um material lignocelulósico, tem em sua composição principalmente, lignina, celulose, e hemicelulose, esses dois últimos constituem cerca de 70% da biomassa seca do bagaço (PESSOA JR., 1997).

A celulose é um polímero linear composto basicamente por monossacarídeos contendo mais de 10.000 unidades de D-glucose, uma hexose, ligados linearmente por ligações glicosídicas β (1-4) (CHUM et al., 1985; MACHADO, 2000).

A hemicelulose é um polímero formado por monômeros de pentoses, como D-xilose e L-arabinose, hexoses, como D-glucose, D-manose e D-galactose, e ácido acético, sendo que açúcar D-xilose é o principal componente do polímero (RODRIGUES, 2001).

A lignina é um polímero, formado por ligações variadas de grupos de metóxilas, em diferentes regiões da sua unidade monomérica fenilpropano. Esses três componentes dos materiais lignocelulósicos sempre se encontram associados, a celulose é incrustada a hemicelulose e lignina, que formam uma barreira física que protege a celulose da ação de agentes biológicos e químicos dos processos de hidrólise (CHUM et al., 1985).

Após a extração dos açúcares contidos na cana-de-açúcar, há formação de bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo do processo de extração. O bagaço é utilizado como combustível para as caldeiras, as quais fornecem energia necessária ao sistema de produção de etanol da usina (MARTÍN, 2006). Como para cada tonelada de cana-de-açúcar processada produz aproximadamente 300 kg de bagaço e a demanda energética da usina pode ser suprida com a queima de 40% desse bagaço (DUARTE, 1989), ainda há um excedente significativo de bagaço (MACHADO, 2000), que a partir de processos de hidrólise, se obtêm açúcares redutores que são fermentescíveis por leveduras, que podem fermentá-los os açúcares em álcool (SCHUCHARDT, 2001). O bagaço, que é um resíduo sólido abundante e lignocelulósico da cana tem alto teor de carboidratos polissacarídeos, sendo um substrato de baixo custo.

A produção de energia nas usinas de açúcar e álcool, em sistemas de co-geração, que usam o bagaço de cana como combustível, tem sido muito utilizada no Brasil. Entretanto, o que diferencia seu uso é a eficiência com que o potencial do bagaço é aproveitado. A utilização da biomassa torna-se fundamental, principalmente por dois aspectos: a geração de energia é descentralizada e os equipamentos, bem como o combustível, são nacionais. Ressalta-se, ainda, a importância ambiental de minimizar as emissões de gás carbônico, que o CO₂ liberado na combustão da biomassa é absorvido pelas plantas durante a fotossíntese,

mantendo constante a sua quantidade na atmosfera. A conjunção desses fatores torna a biomassa, em especial o bagaço de cana, uma importante fonte alternativa de energia para o país. (MARTÍN, 2006)

Um dos desafios associados à utilização do bagaço de cana na geração de energia é a sua estocagem adequada, necessária devido à sua produção em grande quantidade durante a safra.

A hidrólise e a gaseificação da biomassa residual, uma vez desenvolvida, serão capazes de transformar fibras em etanol ou outros combustíveis, a partir da fermentação do açúcar gerado (hidrólise) ou da síntese de compostos a partir do gás gerado (gaseificação). Com este novo paradigma, pode-se aumentar significativamente a produção de etanol por hectare-ano, passando dos atuais 6.000 litros para cerca de 9.000 litros (patamar mínimo esperado).

Os materiais lignocelulósicos têm em sua composição basicamente celulose, hemicelulose e lignina, na proporção aproximada de 40 a 50%, 20 a 30% e 25 a 30% respectivamente, variando em função do tipo de material. Esses compostos formam uma estrutura complexa e compacta, cujas características também dependerão do tipo de material a ser processado (bagaço ou palha de cana e diferentes variedades de cana, entre outros).

A utilização de biomassa para a produção de álcool combustível pela rota química e biológica envolve, basicamente, dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol ou outros combustíveis. A hidrólise ácida destes materiais lignocelulósicos é reconhecida como uma tecnologia eficiente na obtenção de açúcares fermentescíveis da biomassa do bagaço. (MARTIN, 2006).

3.4. Pré-Hidrólise de material lignocelulósico e deslignificação.

Para que haja hidrólise eficiente enzimática ou química da celulose é necessária uma etapa de pré-tratamento, que pode ser feita através de processos físico-químicos, físicos ou biológicos (SCHUCHARDT, 2001).

O pré-tratamento tem como objetivo remover a lignina e a hemicelulose, solubilizando e/ou degradando-os, reduzir a cristalização da celulose e aumentar a porosidade do material lignocelulósico (MOSIER, 2005), sem grande formação de compostos inibidores de

fermentação (LASER, 2001), assim aumentar a exposição da celulose aos processos de hidrólise.

Há diversos processos de pré-tratamento aplicados em materiais lignocelulósicos, como o tratamento biológico, o qual é baseado na utilização de organismos lignolíticos como os fungos, os quais degradam praticamente a lignina e liberam o acesso à hemicelulose e celulose. Porém, o pré-tratamento por organismos lignolíticos, além do seu alto custo produção, o processo muito lento.

Outro processo de pré-tratamento é o tratamento físico, no qual se utiliza variados tipos de moinhos e diferentes irradiações para o material lignocelulósico, que aumenta a superfície de contato do material com enzimas ou os solventes dos processos de hidrólise (TAHERZADEH; KARAMI, 2007), conseqüentemente melhorando os rendimentos, mas esse processo demanda grande quantidade de energia (LASER, 2001), e, portanto é um tratamento oneroso.

O pré-tratamento muito estudado é o tratamento físico-químico, no qual tem como principal característica a solubilização da lignina e a hidrólise da hemicelulose, contido no material lignocelulósico. Há diversos procedimentos de tratamento que combinam diferentes pressões e temperaturas com vários produtos químicos como ácidos, álcalis, solventes orgânicos, agentes oxidantes e químicos em estado supercrítico (LASER, 2001 apud WEIL, 1994). Alguns desses processos são: **a)** Os processos baseados em explosão à vapor (steam explosion) (LASER 2001; ASADA et al., 2005; MARTÍN, 2006); **b)** com CO₂ supercrítico (CO₂ explosion) (FERNANDES, 1998; ZHENG, 1998) ; **c)** com amônia no processo de explosão de fibras com amônia (método AFEX); **d)** e SO₂ na explosão com SO₂ impregnado (SO₂ explosion) (MOSIER et al., 2005; TAHERZADEH e KARAMI, 2007). Nestes procedimentos o vapor é mantido em altas temperaturas e pressões reagindo sobre o material por poucos minutos, com a adição dos químicos citados acima ou não, e ao final do tempo de reação, é feita a rápida descompressão da mistura material/vapor com a liberação do vapor e acomodamento do material em outro recipiente para a rápido resfriamento (CHUM et al., 1985; MOSIER et al., 2005)

Outro processo utiliza agente oxidante, como a oxidação úmida (wet oxidation) (THYGESEN et al., 2003; KINDSIGO; KALLAS, 2006; MARTÍN, 2006), no qual o material lignocelulósico é exposto a soluções aquosas, de pH variados, que podem ser ácida ou neutra ou básica dependendo do ácido ou álcali utilizado como catalizador, mais a adição de oxigênio gasoso (O₂) à pressões entre 0,5 à 24MPa, temperaturas entre 110 °C à 320 °C (KINDSIGO; KALLAS, 2006), e tempo de reação curta, porém sem alta descompressão.

O tratamento alcalino, utiliza álcalis como o hidróxido de sódio (NaOH) (SHIMIZU et al., 1984), para retirar a lignina do material lignocelulósico, solubilizando-a em suas soluções, que pode ocorrer em temperatura e pressão ambiente, com tempo de reação em torno de várias horas, o qual com o aumento da temperatura é possível diminuir esse tempo (MOSIER, 2005).

Solventes orgânicos são utilizados para o tratamento conhecido como organosolv, esse tratamento consiste em misturar solventes orgânicos com água, em diferentes proporções com ou sem catalisadores, adicionar o material lignocelulósico e fornecer calor ao sistema (CHUM, 1985; MUURINEN, 2000; ROCHA, 2000; TAHERZADEH, 2007). Os solventes orgânicos mais utilizados são, o metanol, etanol e acetona, que com a elevação da temperatura e pressão de reação do meio há o favorecimento da solubilização da lignina, a temperatura, pressão e tempo de reação podem ser abrandadas com o utilização de catalisadores (SOUSA, 1986; PASQUINI, 2005)

Para ser possível a hidrólise da celulose é necessário fazer a separação da lignina da celulose e hemicelulose, para tanto, são necessários solventes orgânicos como a mistura de álcool/água ou acetona/água para realizar este processo (PATEL et al., 1989; PASQUINI et al., 2005).

Quando comparadas suas capacidades de solvente, a mistura acetona/água apresenta um maior rendimento de deslignificação (HISLT, 1997), por outro De Rosa; Da Silva Curvelo (1997) demonstram que com a mistura de álcool/água o tempo de reação da deslignificação é menor, mas apresenta uma energia de ativação maior que a acetona/água. Para que se tenha um melhor aproveitamento econômico durante este processo, o solvente organosolv de álcool/água apresenta um menor custo da produção (SOUZA et al., 1986; ROSSEL, 2005).

Novos sistemas de deslignificação em madeira foram investigados por Sano (1985), que cozinhavam os pedaços de madeira na presença de fenóis o processo de deslignificação tem rendimento aumentado. A mistura de etanol ou acetona com fenóis, quando colocados junto à madeira para o pré-tratamento da madeira, não aumenta significativamente o rendimento do processo.

Etanol/água é um dos mais promissores solventes “organosolv” para processo de deslignificação entre as diferentes opções até agora estudadas de acordo com Curvelo (1995). Esta mistura de solvente combina as vantagens do processo devido ao baixo custo e abundância do etanol em países onde a cana-de-açúcar é economicamente viável. A deslignificação ocorre em três fases: inicial, principal e residual. A fase inicial é rápida e remove aproximadamente 25% do total da lignina. O volume da deslignificação ocorre na

fase principal onde praticamente 75% da lignina restante é removida. A última e mais lenta fase é onde a seletividade é perdida e a degradação da celulose pode ser alta e longa. O estudo apresenta uma proporção de etanol/água (1:1/v.v)

Pasquini et al. (2005) reportou a maior influência da temperatura em relação à pressão no processo organosolv. Rocha (2000) conseguiu 77% e 91% de remoção de lignina do bagaço de cana-de-açúcar, com a utilização de soluções de etanol/água à 60% e acetona/água à 60% respectivamente, com a adição de hidróxido de sódio a 1%, como catalisador. Segundo Sousa (1986), a adição de catalisadores ácidos acelera sensivelmente o processo de deslignificação, e em seu estudo com a adição de um catalisador ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2$) a 2% na solução etanol/água 50% pode se alcançar 75% de deslignificação à 170°C de temperatura e 50 minutos de reação. O pesquisador Da Rosa (1997) reportou eficiência de deslignificação com a solução etanol/água e maior solubilização de lignina em soluções acetona/água.

Pasquini et al. (2005) descrevem um estudo sobre a retirada da polpa celulósica da madeira de *Pinus taeda* e do bagaço da cana-de-açúcar, combinando uso da mistura de etanol/água e dióxido de carbono em altas pressões. Os resultados obtidos indicam importantes diferenças entre os diferentes processos organosolv, que podem ter sido causados devido à presença de CO_2 e/ou a presença de altas pressões envolvidas. O rendimento da polpa e a extensão da deslignificação mostraram como o esperado, uma influência muito maior da temperatura que da pressão. Os melhores resultados obtidos mostram que em *Pinus taeda* a deslignificação foi de 93,1% e bagaço da cana-de-açúcar foi de 88,4%. A madeira teve um rendimento mais significativo quando comparado ao bagaço.

3.5. Hidrólise ácida

O processo de hidrólise ácida é feito por meio da utilização de ácido sulfúrico (FOUAD et al., 2005) e ácido clorídrico (DUARTE, 1989) em diferentes concentrações juntamente com variações de temperaturas e tempos de reação. A hidrólise ácida é realizada principalmente de duas formas de acordo com a literatura: soluções ácidas de alta concentração ou de baixa concentração. São amplamente utilizados os ácidos sulfúrico e clorídrico.

Na hidrólise da celulose para obtenção de açúcares para fermentação alcoólica podem ser usados diversos materiais lignocelulósicos, como madeira, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos da plantação de trigo, arroz, mandioca, etc.

As investigações de Lavarack et al. (2002) demonstraram que o ácido clorídrico é menos eficiente na degradação do bagaço para produção de açúcares quando comparado ao ácido sulfúrico e Villar (1984) relatam que o H_2SO_4 é um catalisador mais eficiente na degradação do bagaço da cana-de-açúcar para a obtenção de açúcares para fermentação alcoólica. O rendimento total de vários açúcares obtidos chega a 63% do peso do material lignocelulósico usado na hidrólise com soluções ácidas diluídas (BERGIUS, 1939), por outro lado, Villar (1984) relata não haver aumento significativo no rendimento de açúcares do bagaço em concentrações de solução de H_2SO_4 maiores que 2%. Hidrolisar materiais lignocelulósicos com HCO_2H a 25-80% e então com HCO_2H-HCl resulta em açúcares fermentescíveis. Um tratamento de 17,88 g de bagaço seco com 25-80% de HCO_2H e concentração de 5% a 25% de HCl podem chegar a um rendimento de açúcares de 97%. Fouad et al. (2005) conseguiu taxas de conversão de 97,5% da taxa máxima teórica de conversão com a utilização de H_2SO_4 concentrado a 70% com 2% de bagaço com tempo de reação de 60 minutos à 50°C.

Este teor de açúcares poderia ter bom rendimento na produção industrial de álcool (WENZL, 1954), por outro lado, as concentrações ácidas são altas e requerem neutralização, neste caso, gerando custo e, desta forma, torna-se um procedimento inviável do ponto de vista industrial (HILST, 1997; ROSSEL, 2005). Duarte (1989) realizou a hidrólise com ácido clorídrico concentrado, o qual relata altas taxas de hidrólise, com concentrações de 39%, e tempo de reação de 20 minutos. O pesquisador também relata a relação do tempo de reação com a formação de inibidores de fermentação e sua inoperabilidade no meio industrial devido a corrosão causada pelo ácido concentrado.

A sacarificação de madeira tem sido processada com sucesso tanto com soluções de H_2SO_4 concentrado ou em soluções diluídas em elevadas temperaturas (WENZL, 1954). Neste período o processo Rheinau com HCl foi melhorado pela introdução de pré-hidrólise para eliminar açúcares do tipo pentose e pela modificação do estágio de pós-hidrólise e recuperação do HCl . Os diversos processos com uso de H_2SO_4 (Scholler, Madison, e TVA) são eficientes na hidrólise. Os açúcares obtidos mediante estas hidrólises podem ser amplamente utilizados em processos fermentativos para produção de etanol e em obtenção de biomassa.

A hidrólise da madeira em soluções ácidas diluídas e concentradas é discutida a partir do ponto de produção de açúcares para fermentação alcoólica. Os processos Bergius e Scholler foram descritos como exemplos dos mais modernos processos de soluções concentradas e diluídas respectivamente para aquela época. Os experimentos indicaram que o

processo Scholler era mais econômico que o processo Bergius e sob as aquelas condições poderia ser usado para fermentação alcoólica. (COREY; MOORE, 1944)

De todos os métodos químicos, a hidrólise por ácidos fortes diluídos, como H_2SO_4 , o processo de pré-tratamento utilizando ácido diluído tem sido amplamente estudada, pois pode alcançar altas taxas de reação e é um tratamento de baixo custo. A maior vantagem desse processo é a alta obtenção de xilose solúvel e favorecimento da porosidade das fibras, que favorece a alta eficiência na posterior hidrólise da celulose (PESSOA JR et al., 1997; TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Matos (2001) conseguiu obter até 22,71 g de xilose por litro de pré-hidrolisado com a utilização de ácido sulfúrico 130mg de H_2SO_4 (3,25% v/v – 50g massa) por grama de massa e 30 minutos de reação a temperatura de 121°C. Fogel (2004) em seu trabalho conseguiu concentração de xilose, no hidrolisado, de 57,3 g/L, com solução de H_2SO_4 à 3% (v/v) à 121°C. Takahashi (1997) reportou melhores liberações de açúcares na hidrólise com H_2SO_4 à 1% durante 40 min e a temperatura de 120 °C. Um dos problemas encontrados na hidrólise ácida, além da formação de furfural e ácidos inorgânicos, que são inibidores da fermentação alcoólica (DORTA et al., 2005), e a produção de pentoses, como a xilose, que são dificilmente aproveitados na fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Purchase (1986) tem estudado e relata um progresso contínuo no desenvolvimento da fermentação para a obtenção de álcool a partir da xilose derivada do bagaço da cana-de-açúcar.

Em seu estudo, Planes (1974), obteve o maior recuperação de açúcares redutores com a pré-hidrólise com H_2SO_4 à 1 % (v/v) em temperatura de 140°C por 30 minutos. Villar (1984) demonstrou a reação de pré-hidrólise com ácido sulfúrico à 2% e 140°C de temperatura com 30 minutos de reação foi a que apresentou maior produção de açúcares redutores, e citou o pequeno aumento da produtividade com o aumento da concentração de ácido acima de 2%. O pesquisador demonstrou também que de 7% a 10% de concentração de ácido e temperatura de 80° a 90°C, com duração de reação entre 5 a 55 min, o rendimento de açúcares fermentáveis obtidos foi maior com o aumento da temperatura e concentração da solução ácida e rendimento máximo foi obtido ao diminuir o tempo de reação ao passo que os outros fatores foram aumentados, ou seja, um processo hidrolítico mais longo degrada o açúcar.

Kim (2002) em seu estudo sobre a cinética da hidrólise da celulose sob as condições de ácidos diluídos (1,0; 2,0; e 3,0 %), incluindo condições de soluções ácidas extremamente diluídas (ELA) (0.07 %) e temperatura variando entre 180-220°C foram investigadas usando reatores para “batch” e reatores BSFT. Neste estudo, o máximo rendimento de glicose obtido

nos experimentos com reatores “batch” foi de aproximadamente 30% do bagaço da cana-de-açúcar, que ocorreu entre 200 e 210°C. O máximo rendimento do bagaço pré-tratado baseado em uma reação BSFT aumentou para 55%. Nos experimento usando uma reação BSFT de dois estágios, um rendimento de glicose de 63% foi obtido a partir do bagaço da cana-de-açúcar em temperaturas entre 210° e 220°C sob condições de soluções ácidas extremamente diluídas. As soluções diluídas de ácido são difíceis de realizar devido ao fato de exigirem pressões e temperaturas elevadas, o que torna este tipo de hidrólise pouco competitiva na indústria (ROSSEL, 2005).

As investigações sobre a hidrólise ácida com soluções concentradas apresentam resultados com rendimento de açúcares de 97,3% (FOUAD et al., 2005), mas as altas concentrações de ácido tornam a manipulação do processo difícil e geram custos devido aos desgastes do equipamento, sensíveis a acidez (HILST, 1997; ROSSEL et al., 2005).

A pré-hidrólise com a utilização de ácidos produz também o furfural e hidroximetil-furfural e ácido acético, resultantes da degradação das hexoses e pentoses submetidos a um meio ácido e de alta temperatura (MUSSATTO; ROBERTO, 2004), os quais são produtos tóxicos às leveduras e prejudicam a fermentação do hidrolisado, e dependendo de suas concentrações, podem inibir consideravelmente a fermentabilidade das leveduras (LASER et al., 2001; MATOS 2001). Laser (2001) considerou taxa de inibição de 20 à 30% da fermentação em meios com concentrações de 0,3g/L de furfural. Martín (2006) relacionou a presença de aldeídos, provenientes da degradação da lignina (MUSSATTO, 2004), como principal fator de inibição da fermentação.

Além da produção de compostos tóxicos, é necessário que o pH do hidrolisado seja neutralizado para que o meio seja propício para a fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Planes (1974) reporta a relação entre concentrado ácido e a formação de produtos tóxicos à fermentação, no qual a quantidade de ácido é diretamente proporcional a quantidade de produtos inibidores da fermentação formados. Harris (1946) acusou o tempo de contato com o ácido o fator de degradação dos produtos lignocelulósicos.

3.6. Hidrólise Enzimática

A sacarificação da celulose via ação enzimática representa uma alternativa para a destinação de fitobiomassas residuais como o bagaço de cana e resíduos de atividades florestais. No entanto, apesar de muitos estudos, não estão totalmente compreendidas quais as características do substrato que atribuem maior eficiência à taxa de hidrólise da celulose. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (PALOMEN et al., 2004). Além disso, bioprocessos baseados na hidrólise enzimática requererão substratos produzidos com a qualidade adequada, a partir de fitobiomassa residual. Diferentes tipos de pré-tratamento podem ser aplicados para promover a conversão destes materiais em substratos susceptíveis à hidrólise enzimática e, dentre estes, o pré-tratamento a vapor tem sido descrito como um dos mais eficientes (NEGRO et al., 2003; SODERSTROM et al., 2003; MOSIER, 2005). Paralelamente, estudos têm sido realizados na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira cada vez mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulásicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies mediante aplicação de métodos de engenharia genética (JORGENSEN et al., 2004; IMAI et al., 2004).

Dentre os organismos produtores de ligninases e celulasas, os fungos têm sido muito estudados devido à variedade de enzimas que produzem. Os principais microrganismos produtores do complexo celulase, que são conhecidos, são os fungos *Trichoderma sp* e *Aspergillus sp* (CANTARELLA et al., 1984). Atualmente, sabe-se que o complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases, que não são consideradas como celulasas legítimas. De acordo com o modelo de sinergismo “endoexo”, essas enzimas cooperam da seguinte maneira: as celobiohidrolases (CBH) agem como exoenzimas (promovendo a hidrólise no final das cadeias) e liberam celbiose como produto principal; as endoglucanases (EG) agem randomicamente ao longo da cadeia produzindo novos sítios de ataque para as celobiohidrolases; e as β -glucosidases completam o processo pela hidrólise da celbiose e de outros sacarídeos à glicose (MARTIN, 2005). A ação combinada de dois ou mais componentes da celulase pode aumentar a eficiência da atividade catalítica de hidrólise da celulose, em comparação com a simples soma das atividades catalíticas de hidrólise verificadas quando esses componentes atuam separadamente.

No país há vários grupos de pesquisa voltados ao estudo da hidrólise enzimática de bagaço de cana. Esses grupos, com financiamento da FINEP, FAPESP e OXITENO, estão preocupados com a produção de enzimas do complexo celulolítico, pré-tratamentos eficientes e econômicos, e hidrólise enzimática ou fermentação e sacarificação simultâneas.

A Petrobras, em parceria com instituições de pesquisa, estuda o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol a partir de resíduos de composição lignocelulósica (bagaço de cana). O projeto em escala de bancada iniciou em 2004, e atualmente encontra-se em construção a primeira planta piloto nacional. Os resultados de bancada apresentam grande eficiência na hidrólise da hemicelulose e da celulose atingindo elevadas concentrações de açúcares. Os hidrolisados produzidos foram submetidos a processos de fermentação alcoólica com leveduras, levando a valores de produtividade volumétrica em etanol de 1g/L.h a 3g/L.h. Isto conduz a uma relação de 165 L de etanol/ton de bagaço (MACEDO, 2006).

3.7. Produção de etanol e agentes inibidores da fermentação alcoólica.

A indústria sucro-alcooleira no Brasil é de grande importância para a economia. O etanol, além de suas propriedades antimicrobianas, é utilizado como combustível alternativo para automóveis, sendo menos poluente que a gasolina e, além disso, é derivado de uma fonte de energia renovável. Devido ao custo da gasolina gerado por conflitos e oscilações econômicas mundiais, e por ser derivada de uma fonte de energia não renovável, o etanol está podendo tornar-se uma importante matriz energética mundial.

A produção comercial de álcool no Brasil é feita mediante do processo de batelada alimentada ou fermentação contínua. O etanol é produzido após a fermentação do açúcar de cana por *Saccharomyces cerevisiae*, na qual existe o reciclo de células que acaba intensificando o problema da contaminação bacteriana. Tal problema caracteriza-se pela floculação, diminuição do consumo do açúcar, produção do álcool e da viabilidade da levedura como resultado dos componentes tóxicos liberados no meio pelos contaminantes (ROSSEL et al., 2005)

Desde a última década do século XX as usinas de açúcar e álcool têm aumentado a dosagem de melaço no mosto fermentativo em relação ao caldo de cana, acarretando maiores problemas para a produção etanólica, como a adição de sulfito no processo. Tal substância é utilizada na clarificação do açúcar e acumulada tornando-se excessiva no melaço. A presença do referido reagente, em quantidades elevadas no melaço-de-cana, tem sido descrita por

pesquisadores como um outro fator de diminuição do rendimento alcoólico, da viabilidade e do crescimento celular de leveduras. Entretanto, Alves (1994) chegou a conclusão que a presença de sulfito no meio fermentativo pode exercer um efeito benéfico na fermentação, inibindo a proliferação de bactérias contaminantes.

Os processos de fermentação etanólica mais utilizados no Brasil são o de batelada alimentada e o contínuo. O processo de batelada alimentada surgiu inicialmente na fabricação industrial de fermento para a panificação, no início do século XIX (Brown, 1990, apud ABUD, 1997). Segundo Almeida (1940), em tal processo há a alimentação contínua do mosto na dorna de fermentação e ao seu término, o produto fermentado é centrifugado e separado da levedura. A condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibitório do açúcar, durante a fase inicial, resultando em maior concentração de etanol num mesmo período de tempo quando comparada com a batelada convencional (não alimentada). Ainda, no referido processo, a alimentação pode ser realizada mediante adições intermitentes, à velocidade constante e de forma exponencial (WINKLER, 1991; 1995). Segundo Laluce et al. (1990), grande parte das usinas brasileiras trabalha com o processo de batelada alimentada com o reciclo do fermento, o qual é tratado com ácido sulfúrico antes de retornar para as dornas fermentativas. O mosto é, assim, adicionado lentamente durante aproximadamente 4h, sendo que após 6-9h chega-se ao final da fermentação.

No processo contínuo, o mosto mais o inóculo são injetados de forma contínua em reatores, com a saída da mesma quantidade de meio fermentado. (WINKLER, 1995; ABUD, 1997). Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado e diminuição de tempo de limpeza e sanitização das dornas. (CYSEWSKI; WILKIE, 1978).

A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais susceptíveis à contaminação bacteriana devido aos longos prazos de exposição, além de exigir um conhecimento apurado para otimizar as condições de processo para atingir o rendimento desejado - especialmente durante a adição de produtos químicos, alterações da taxa de fluxo e a mistura dos nutrientes, ou alterações nos parâmetros estimados (Ingledeew, 2003 apud BAYROCK; INGLEDEW, 2005). Considera-se importante o conhecimento desses parâmetros quando a planta do processo contínuo é desenhada ou operada (BAYROCK; INGLEDEW, 2005).

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura, causando uma inibição do tipo não competitiva (GHOOSE; TYAGI, 1979; Leão; van UDEN, 1982). Fatores como a temperatura e existência dos subprodutos acetaldeído, ácidos fórmico, acético, láctico, octanóico e decanóico contribuem para a elevação do efeito tóxico pelo etanol (DORTA et al., 2006)

Tanto a concentração de ácido láctico, quanto a presença de sulfito durante o processo fermentativo, podem ter menor ou maior efeito tóxico, dependendo das condições em que estes se encontram, como o teor alcoólico, pH e nível de contaminação. Muito ainda tem que ser feito para a verificação dos efeitos sinérgicos de toxinas e outros fatores estressantes para as leveduras durante a produção etanólica, visando otimização do processo.

Mediante hidrólise ácida obtém-se um hidrolisado contendo açúcares pentoses como D-xilose e L-arabinose e hexoses como D-glicose além de compostos tóxicos como ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e íons metálicos. As pentoses formam furfural como principal produto de degradação, já as hexoses formam 5-hidroximetilfurfural (HMF) e outros compostos como 2-hidroxiacetilfurano e isomaltol (LEVANON, 1983; DELGENES et al., 1996).

A pré-hidrólise com a utilização de ácidos produz o furfural e hidroximetilfurfural resultantes da degradação das hexoses e pentoses submetidos a um meio ácido e de alta temperatura (MUSSATTO, 2004), os quais são produtos tóxicos às leveduras e prejudicam a fermentação do hidrolisado, os quais dependendo de suas concentrações podem inibir a fermentação pelas leveduras (LASER et al., 2001; MATOS 2001). Laser (2001) considerou taxa de inibição de 20 à 30% da fermentação em meios com concentrações de 0,3g de furfural por litro. Mussato (2004) relacionou a presença de aldeídos, provenientes da degradação da lignina, como principal fator de inibição da fermentação. Além da produção de compostos tóxicos, é necessário que o pH do hidrolisado seja neutralizado para que o meio seja propício para a fermentação (DORTA et al., 2006; TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Planes (1974) reporta a relação entre concentrado ácido e a formação de produtos tóxicos à fermentação, no qual a quantidade de ácido é diretamente proporcional a quantidade de produtos inibidores da fermentação formados.

A degradação da lignina produz uma variedade de compostos aromáticos. Além destes o ácido acético é liberado a partir da estrutura lignocelulósica durante o pré-tratamento com ácido e representa um dos principais inibidores da atividade microbiana devido à acidez do meio. Dentre esses compostos, o ácido acético tem sido apontado como um dos principais inibidores do metabolismo microbiano. O efeito inibidor desse ácido está diretamente

relacionado com a acidez do meio e, principalmente, à concentração desse no meio se fermentação (FERRARI et al., 1992).

Devido à liberação de xilose da fração hemicelulósica e a da capacidade de microrganismos fermentarem esta pentose, várias pesquisas vêm sendo feitas para o desenvolver de uma tecnologia de produção de xilitol e etanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

Durante o processo hidrolítico de materiais hemicelulósicos, os compostos tóxicos ao metabolismo microbiano afetam a produtividade volumétrica das fermentações e, de acordo com Parajó et al. (1998), limitam o consumo da fonte de carbono e diminuem a cinética de crescimento. Dentre os diversos pré-tratamentos utilizados para diminuir a concentração destes inibidores, a neutralização, o emprego de carvão ativo e de resinas de troca iônica são os mais empregados. Ranatunga et al. (2000) observaram remoção de 12, 70 e 66% de fenóis, furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, de um hidrolisado de madeira ao utilizar hidróxido de cálcio. Marton (2003) observou redução de 76,22% de fenóis e 44,18% de ácido acético ao alterar o pH do hidrolisado de bagaço de cana e em seguida utilizar carvão ativo, obtendo uma produtividade volumétrica igual a 0,51g.L/h. Verde (1999) também utilizou este método de detoxificação e conseguiu reduzir 50,36% de ácido acético e remover totalmente o furfural, hidroximetilfurfural e os íons cobre, cromo e zinco, com produtividade de 0,48g.L/h.

Assim, o estudo de metodologias alternativas de tratamento do hidrolisado poderá permitir condições adequadas para maior eficiência de remoção de compostos tóxicos e, conseqüentemente melhoria deste bioprocessos de forma a que este possa vir a ser competitivo ao processo químico.

3.8. *Pachysolen tannophilus*

Devido à considerável quantidade de D-xilose presente na porção de hemicelulose e seu potencial como substrato para a produção de etanol a partir da biomassa, muitos estudos foram realizados para elucidar como é realizada a fermentação desta pentose por leveduras (SCHNEIDER et al., 1983; MCKRACKEN; GONG, 1983; DECKER, 1982). A conversão da hemicelulose em monossacarídeos é a mais fácil que a glicose de ser realizada, porém os açúcares produzidos são pentoses e não são fermentados por *S. cerevisiae*. Estes açúcares poderiam ser utilizados para a produção de etanol, mas o rendimento de etanol obtido pelas leveduras fermentadoras de pentose em culturas com D-xilose é limitada principalmente por dois fatores: a utilização concorrente do etanol na presença de concentrações elevadas de D-

xilose (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982) e a formação de xilitol e outros compostos como sub-produtos (SCHNEIDER et al., 1985). Melhoramentos no rendimento podem ser obtidos com linhagens que não utilizem etanol como fonte de energia. Uma forma de encontrar uma linhagem com estas características é o isolamento de mutantes com deficiência respiratória.

Até o presente momento, conhece-se apenas algumas espécies de leveduras são capazes de fermentar a xilose. A atenção tem sido focada em *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* e em várias linhagens de *Candida sp.* Contudo, estas leveduras parecem ter um rendimento limitado de etanol, abaixo do desejado para a indústria alcooleira. Outro fator que dificulta o rendimento de produção alcoólica encontra-se no fato de que, sob condições anaeróbias, uma grande fração da xilose é convertida em xilitol e o rendimento de álcool é baixo (LEE et al., 1986).

As leveduras fermentadoras de pentoses podem converter a xilose tanto em etanol, como já descrito, quanto xilitol. O xilitol é um poliol que possui aplicações em diferentes segmentos industriais e vem sendo produzido pela fermentação da xilose presente no hidrolisado de bagaço de cana. No entanto, para que este composto com alto poder adoçante e anti-cariogênico seja consumido, é necessário que seja separado dos açúcares remanescentes no caldo fermentado. Uma vez que a etapa de separação é difícil e sobrecarrega o custo total do processo, alternativas à cromatografia convencional, técnica comumente utilizada, têm sido desenvolvidas. No entanto, a produtividade do xilitol é ainda relativamente baixa ao se comparar com outros processos biotecnológicos, o que poderá comprometer o oferecimento desta tecnologia ao setor sucroalcooleiro (DI LUCCIO et al., 2000). Este fato deve-se a presença no hidrolisado, de compostos tóxicos aos microrganismos, como fenóis, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e metais pesados oriundos da corrosão dos equipamentos, os quais se encontram presentes no meio mesmo após diferentes tratamentos como alteração de pH, adsorção em carvão ativo e utilização de resinas de troca iônica (ROSSEL et al., 2005).

Em estudos, foi verificado que a levedura *P. tannophilus* formou 5,5% de etanol a partir de 12% glicose, mas apenas 2% de etanol a partir de 12% xilose. A aeração dobrou a taxa da fermentação de glicose por *P. tannophilus*, quando comparada com a fermentação anaeróbia, mas a taxa da fermentação da xilose permaneceu inalterada. Adições periódicas de 0,5% glicose em fermentações aeróbias de 3% de xilose aumentaram o rendimento de etanol de 0,28 g/g de xilose para 0,41 g/g de xilose utilizada. O rendimento da produção de etanol por *P. tannophilus* em meio com 3% de xilose foi de 5,5%, porém, numa mistura contendo xilose e glicose, o rendimento em etanol foi melhorado para 24,26% do teórico (DUARTE,

1987). A taxa de utilização de xilose permaneceu inalterada, e estudos mostraram que a adição de 0,5% de glicose não inibiu a utilização da xilose em condições aeróbias ou anaeróbias. Nenhuma melhora foi observada em fermentação anaeróbia, e nos hidrolisados ácidos na presença de inibidores de crescimento e fermentação (JEFFRIES, et al., 1985). Duarte (1987) constatou que *P. tannophilus* cresce duas vezes mais na condição aeróbia, em relação à semi-aeróbia, em meio contendo 2% de glicose. Quanto à produção de etanol, utilizando-se de glicose, foi melhor para a condição que recebeu mais oxigênio. Estes resultados contrastam com aqueles encontrados na literatura obtidos em xilose por Schneider, et al. (1981) e Maleszka; Schneider (1982).

Na fermentação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, dois grandes problemas são encontrados: a fermentação da xilose, e a presença de inibidores dos microrganismos fermentadores. A xilose pode ser fermentada diretamente por leveduras, como a *P. tannophilus*, *Candida shehatae*, e *Pichia stiptis* (DECKER, 1982), ou por isomerização da xilose em xilulose com a enzima glucose (xilose) isomerase, e subsequente fermentação por *S. cerevisiae*. A fermentação direta requer oxigenação baixa e cuidadosamente controlada e também a eliminação dos inibidores. As leveduras fermentadoras de xilose têm uma tolerância limitada a concentração de álcool. A combinação de isomerização e fermentação em *S. cerevisiae* tem um rendimento e produtividade comparável com o obtido na fermentação de hexoses sem oxigenação e eliminação dos inibidores. Contudo, a enzima não é muito estável em hidrolisados lignocelulósicos e *S. cerevisiae* tem um desenvolvimento abaixo do desejado em meios com enzimas de via metabólica pentose fosfato. Estratégias diferentes envolvendo adaptação de linhagens, e engenharia de proteínas e genética adotadas para superar estes diferentes obstáculos são discutidos (HAHN-HÄGERDAL, et al., 1991)

Para demonstrar a habilidade de uma cultura crescer em um meio com D-xilose como a única fonte de açúcar e, simultaneamente, demonstrar o consumo e produção de álcool a concentração inicial de D-xilose era de 2%, e a final de 1,1%. No período de 23 horas, o peso seco duplicou (2,2x) e a concentração de etanol no meio fermentado aumentou 7,6 vezes (14 até 107 $\mu\text{mol/mL}$). Durante o mesmo intervalo de tempo, a quantidade de etanol consumido aumentou 105 vezes (0.1 $\mu\text{mol/mL}$ depois de 1 min para 10,5 $\mu\text{mol/mL}$ depois de 23 h). A quantidade de etanol consumido durante o experimento foi de 9,8% do total produzido (SCHNEIDER, et al., 1981).

Para determinação da incorporação de etanol na presença de outros açúcares, células colocadas para crescer em condições idênticas com álcool como a única fonte de carbono

foram suspensas em 217 $\mu\text{mol/mL}$ de álcool mais 1% de glicose. Esta hexose inibiu o consumo de etanol rapidamente: mesmo a 0,1%, o consumo foi inibido num período de 1h. A extensão da inibição aumentou com o aumento da concentração de açúcar, mas o consumo de etanol continuou na presença de 2% de glicose. As quantidades de etanol consumido em 8h correspondem a 9,2, 3,7 e 1,4% das concentrações de etanol inicialmente presentes com 0,0, 0,1, e 2% de glicose, respectivamente. As quantidades de etanol consumidos na presença de 0,1 e 2% de glicose foram de 4,0 e 15%, respectivamente, das quantidades consumidas na ausência dos açúcares. (MALESZKA; SCHNEIDER; 1982)

Apesar de *P. tannophilus* ser classificada taxonomicamente como um organismo que não assimila xilitol (LEE et al., 1986), foi observado um crescimento lento. Todos os compostos testados inibiram o consumo de açúcares, mas cada um de forma diferente. Para simplificar a comparação, a porcentagem de etanol consumido na presença de açúcar foi calculada considerando o consumo de etanol na ausência de açúcar como sendo igual a 100%. A glicose foi o melhor inibidor testado: a quantidade de etanol consumido na sua presença foi de 23% da quantidade consumida na sua ausência. O valor correspondente para D-xilose foi de 37%. Os diferentes consumos na presença de glicose e xilose não ocorreram devido ao crescimento inicial das células em álcool. Resultados similares foram obtidos quando as células cresceram inicialmente em soluções de concentração de 2% do açúcar utilizado no teste. (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982)

A oxigenação do meio também pode influenciar a fermentação por *P. tannophilus*, produção e consumo de etanol. De acordo com Duarte (1987), em meio com oxigênio, o rendimento de etanol é menor em sua ausência. Conforme aumenta a disponibilidade de oxigênio, aumenta também o consumo de etanol. A perda de etanol do meio por volatilização é menos de 5% da quantidade inicialmente presente. Resultados similares foram obtidos quando as células cresceram em meio contendo, inicialmente, concentração de 2% de xilose. A relação entre a perda de etanol devido ao metabolismo e disponibilidade de oxigênio foi também observada em células de culturas que não crescem. A ausência de crescimento foi mantida por privação de fonte de nitrogênio. (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982; NEIRINCK, et al., 1984)

Em culturas de *P. tannophilus*, ocorreram perdas significativas de etanol em condições aeróbias resultantes de seu metabolismo, quando o açúcar presente era a xilose. Tais perdas também ocorreram na presença de outros açúcares. Num experimento, em que o etanol foi produzido a partir da xilose, o volume de etanol perdido foi equivalente a 9,8% do volume de etanol produzido. Em substratos práticos para utilização, a xilose está presente, junto com

outros açúcares. Em hidrolisados de madeira, são incluídas a glicose e manose. Embora ambas as hexoses tenham sido mais eficientes que D-xilose em inibir o consumo de etanol, ainda não foi obtida uma inibição significativa. Menor quantidade de etanol foi consumida quando o volume de oxigênio disponível na cultura foi reduzido. (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982; NEIRINCK, et al., 1984)

Apesar de o etanol poder ser produzido anaerobiamente a partir de D-xilose, resultados obtidos indicam que dentro de um determinado tempo de fermentação, os rendimentos obtidos de culturas anaeróbias são baixos e menores do que os obtidos de culturas aeróbias. Um baixo grau de aeração pode ser considerado ótimo para a fermentação (SLININGER, et al., 1982).

Uma base molecular para entender os efeitos dos açúcares no consumo de etanol por *P. tannophilus* ainda não foi estabelecido. Uma possibilidade é que o efeito Crabtree, que se refere a inibição da respiração das leveduras por açúcares está envolvido. *S. cerevisiae* quando cultivadas em meio contendo glicose na presença de ar, este efeito é considerado responsável pela conversão inicial de glicose para etanol mediante oxidação quando a glicose fica baixa. Em *S. cerevisiae*, a inibição da respiração varia quando outros açúcares são substituídos por glicose. Em *P. tannophilus*, os diferentes graus em que os açúcares inibem o consumo de etanol refletem na sua capacidade de estimular a ocorrência do efeito Crabtree. Outro fator que pode estar envolvido é a repressão da atividade álcool desidrogenase por ação de diferentes açúcares. Em *S. cerevisiae*, a glicose reprimiu duas das três desidrogenases conhecidas (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Material lignocelulósico

Bagaço desfibrado da cana-de-açúcar obtido para os experimentos foi adquirido junto à “Usina NOVA AMÉRICA” (Tarumã/SP). O material foi seco em estufa por 24 horas a 100°C.

4.1.2. Microrganismo

A levedura de *Pachysolen tannophilus* foi adquirida junto ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista, localizada na cidade de Rio Claro, cedida por atenção do Prof. Dr. Fernando C. Pagnocca. Esta cepa é mantida a -75°C em Eppendorfes com meio YM (com 10% v/v de glicerol), em pH 5,0. Esta levedura foi usada nos experimentos de fermentação alcoólica.

4.1.3. Reagentes

No presente trabalho, foram utilizados, etanol 96° GL, acetona 99,5% “VETEC”, ácido sulfúrico (PA) fabricado por “Synth”, sulfato de ferro III e Ca(OH)₂ e água proveniente do sistema de abastecimento de água da cidade de Assis/SP, para realização do pré-tratamento e hidrólise ácida.

Para o cultivo das leveduras foi utilizado meio formulado: 18.75 g/L KH₂PO₄ (Labsynth); 3.0 g/L (NH₄)₂HPO₄ (Labsynth); 1.13 g/L MgSO₄ x 7 H₂O (Labsynth); 3.75 g/L extrato de levedura (Difco); 5,0 g/L de peptona (Labsynth); 30 g/L glicose (Difco P.A.); pH 5.0, temperatura de 30°C e 3 dias de incubação com agitação a 150 rpm em shaker.

Para análise de glicose foi utilizado o kit enzimático Glucox 500 (DOLES). A concentração de xilose é quantificada utilizando solução de ácido acético glacial, clorídrico e floroglucinol.

Foram utilizados, para fazer a quantificação de 5-hidroximetilfurfural das amostras, os seguintes reagentes: K₄Fe(CN)₆ . 3H₂O (Labsynth), Zn(CH₃COO)₂ . 2H₂O (Acetato de Zinco) e NaHSO₃ (Labsynth).

4.2. Métodos

Para a hidrólise ácida do bagaço de cana os experimentos foram conduzidos conforme a figura 8, incluindo uma etapa de deslignificação.

4.2.1. Pré-tratamento ácido e deslignificação

Durante o pré-tratamento ácido, foi utilizado o solvente Organosolv (água, acetona e etanol 2:1:1) para separar lignina do bagaço da cana-de-açúcar a fim de possibilitar a hidrólise da hemicelulose e celulose para a obtenção de açúcares fermentescíveis. Para determinar a melhor concentração ácida do pré-tratamento, foram realizados os experimentos de acordo com a tabela 4:

Tabela 3 – Protocolo Experimental de pré-tratamento ácido do bagaço da cana.

Experimento	H₂SO₄ (%)	Bagaço g	Acetona/Etanol (1:1) / mL	Água mL	Sulfato de Ferro III/g	Tempo min
A Controle	0,0	50	500	500	1,25	30/60/120
B	0,5	50	500	495	1,25	30/60/120
C	1,0	50	500	490	1,25	30/60/120
D	2,0	50	500	480	1,25	30/60/120

Foram colocados em recipientes de vidro resistentes a calor e pressão, volume de 2 litros (Boeco), 50g de bagaço previamente secado em estufa a 105°C durante 24 horas. Em seguida, foram adicionados 250mL de etanol (96°) e 250mL de acetona (99,5%). A seguir acrescentou-se 5% de sulfato de ferro III por peso do bagaço seco (agente oxidante), e 400mL de água para diluição do ácido sulfúrico. Acrescentou-se água para completar volume no recipiente até 1000mL. Alíquotas de 20 mL foram retiradas dos frascos para análise no tempo zero. Os recipientes foram colocados em autoclave e a reação mantida em autoclave a 121°C

e 1 atm durante 30, 60 e 120 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata para confirmação dos resultados.

Após autoclavagem, o bagaço não hidrolisado foi prensado para retirar o máximo de líquido de sua massa e este pesado e armazenado, o resíduo sólido separado e lavado sendo que 4,0g do bagaço foram secadas para determinação da umidade e composição da massa seca. O líquido foi medido e completado com água até 1000 mL, deste volume foram separadas amostras de 25mL para análises laboratoriais e o restante armazenado em geladeira a 10°C. Todas as concentrações ácidas foram realizadas utilizando 30, 60 e 120 minutos para determinar qual o melhor tempo de reação para preparar o bagaço para hidrólise ácida.

O experimento que resultar em maior percentual de açúcares redutores (AR), levando em consideração o resíduo de bagaço não hidrolisado seco restante, e a neutralização do pré-hidrolisado, é utilizado como pré-tratamento padrão das hidrólises ácidas do próximo passo do projeto de pesquisa.

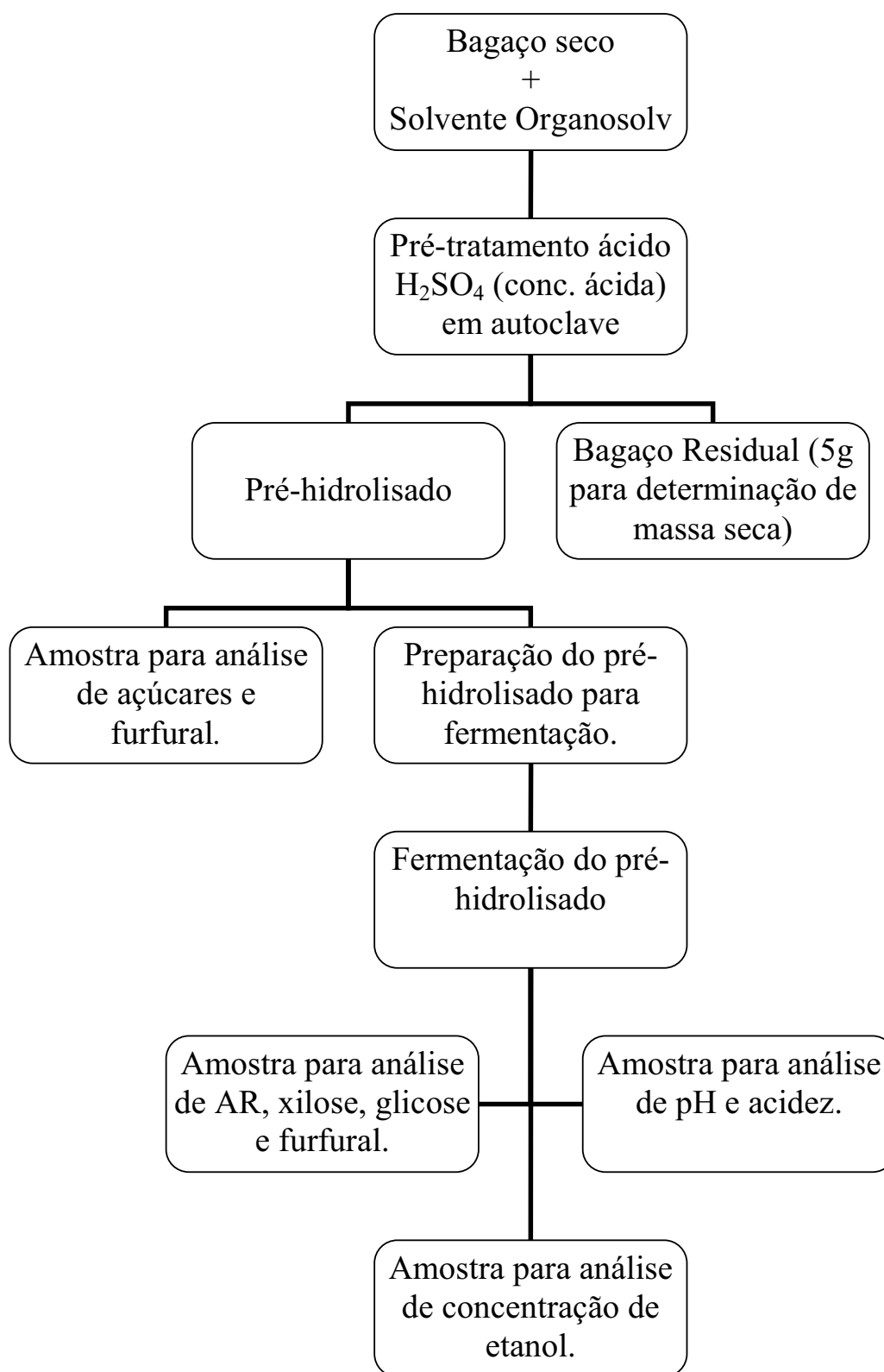


Figura 8 – Fluxograma da pré-hidrólise e processamento do bagaço para hidrólise ácida.

4.2.2. Hidrólise ácida

Após o pré-tratamento ácido, colocou-se em recipientes de vidro de 2000 mL, o bagaço previamente preparado e em seguida, acrescentou-se 500mL de etanol (96°) e água até completar 1000mL de volume, e o ácido sulfúrico para atingir a concentração desejada. Os recipientes foram colocados em autoclave e a reação mantida em autoclave a 121°C e 1 atm durante 90, 120 e 150 min. Os experimentos foram realizados de acordo com a tabela 5, em triplicata para confirmação dos resultados:

Tabela 4 – Protocolo experimental das condições estabelecidas para hidrólise ácida do bagaço de cana para obtenção do pré-hidrolisado.

Experimento	H₂SO₄ (%)	Bagaço g	Etanol mL	Água mL	Tempo min
A	0,0	50	500	500	90/120/150
B	1,0	50	500	490	90/120/150
C	5,0	50	500	450	90/120/150
D	10,0	50	500	400	90/120/150

Após a hidrólise, os frascos foram retirados da autoclave e o bagaço não hidrolisado separado da fração líquida através de centrifugação, pesado e armazenado. O resíduo sólido foi lavado e 4,0g foi secada para determinar umidade e sua composição. O volume líquido foi medido e completado com água até 1000mL, destes, foram separadas amostras de 50mL para análises laboratoriais e o restante armazenado em geladeira a 10°C.

Para determinar a melhor concentração ácida e melhor tempo, foi analisada a porcentagem de açúcares redutores (AR) no líquido pré-hidrolisado de cada experimento realizado.

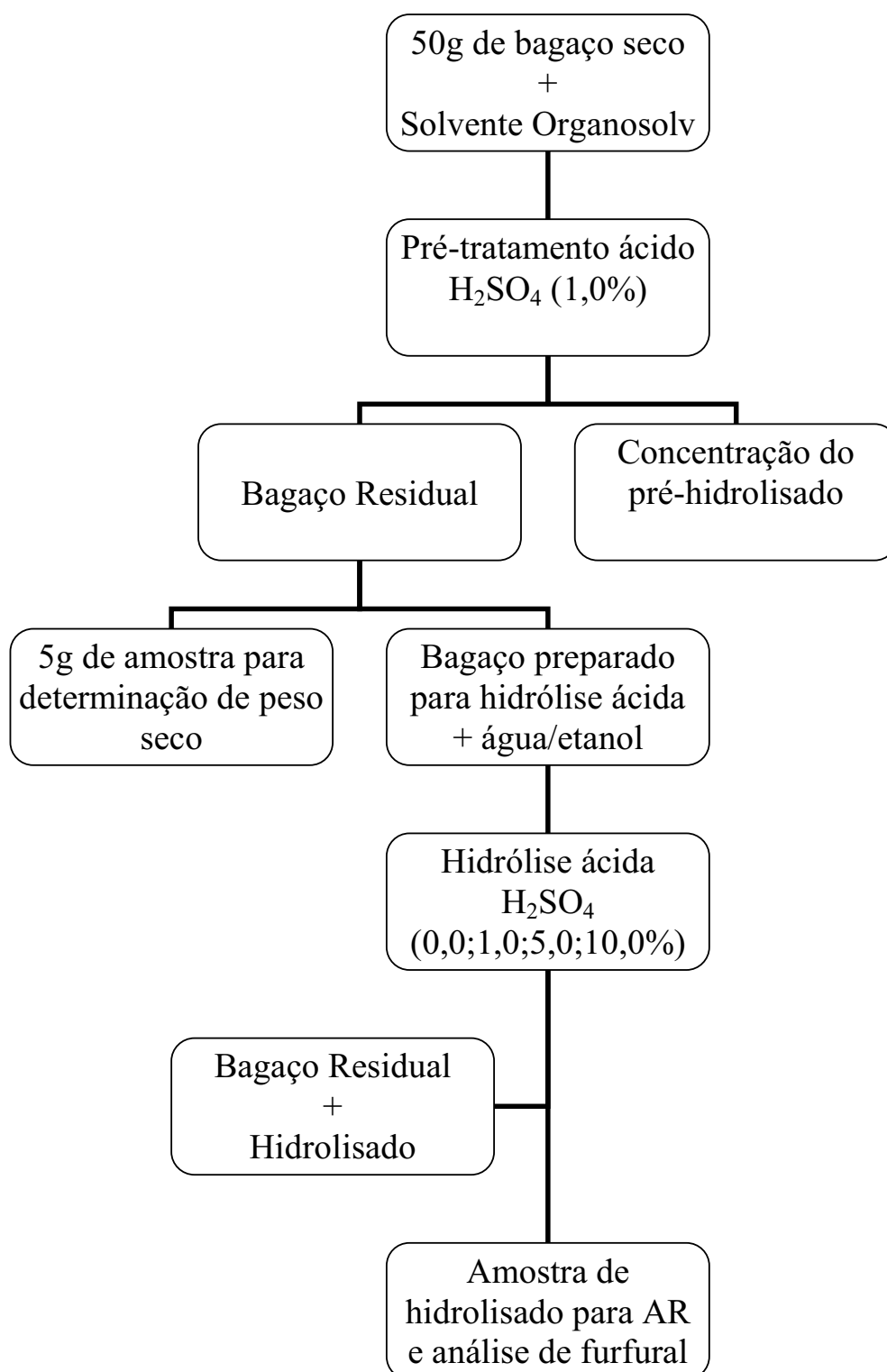


Figura 9 - Fluxograma do processamento do bagaço da cana para determinação de melhor pré-hidrólise e hidrólise ácida.

4.3. Fermentação alcoólica

Após a pré-hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar preparou-se o mosto para fermentação pela *P. tannophilus* mediante o processo de “Batelada”.

Para preparação do mosto, o pré-hidrolisado foi neutralizado e clarificado com CaO até pH 7,0. Após esta etapa, o hidrolisado foi filtrado e concentrado em banho maria a 80g/L de açúcares sendo que a xilose deve predominar. Este líquido foi filtrado com carvão ativado (1,0%) em filtro convencional para retirar inibidores do meio. O xarope de xilose foi diluído até 2,0% de concentração para ser utilizado na fermentação alcoólica por *Pachysolen tannophilus*.

Tais leveduras encontram-se armazenadas à -75°C em Ependorfes com meios YM (com 10% de glicerol) a pH 5,0 no Laboratório de Biotecnologia Industrial da UNESP (Assis/SP).

A obtenção do inóculo para os processos fermentativos da levedura *P. tannophilus* foi feita de forma asséptica mediante cultivos no meio formulado e distribuído em tubos de cultura e posteriormente transferidos para Erlenmeyers de 500 mL à temperatura de 30°C, sob agitação constante de 150 rpm por 72 h. Após atingirem a concentração celular desejada no cultivo, as leveduras foram centrifugadas durante 30 min à 3500 x g.

Para a condução dos processos fermentativos foram pesadas 30 g de biomassa úmida da *P. tannophilus* e foi suspensa em 75 mL de água destilada esterelizada e transferida para Erlenmeyers.

O mosto para fermentação foi obtido da pré-hidrólise do bagaço, foi enriquecido com: 1 g/L MgSO₄; 2 g/L KH₂PO₄; 3 g/L (NH₄)₂SO₄ e inoculado com as leveduras e. A incubação para fermentação foi de 30°C durante 120 horas e mantidas sob agitação durante o processo. Amostras foram retiradas nos tempos 12; 24; 48; 72; 96 120 horas e centrifugadas, o sobrenadante foi utilizado para as análises de rendimento mediante destilação do álcool e inibidores.

4.4. Análises

4.4.1. Determinação do teor de lignina solúvel e insolúvel do pré-tratamento

O teor de lignina foi determinado pela soma da quantidade de lignina solúvel e lignina insolúvel em meios ácidos (Pasquini, et al., 2005):

- A lignina insolúvel foi caracterizada com o filtrado do hidrolisado, o qual foi lavado até sua neutralização, e seco. Uma amostra de 2 gramas foi transferido para um Becker de 100 mL e adicionado 10 mL de H₂SO₄ 72%, submetendo-o a vigorosa agitação à 45 °C por 7 minutos e, posteriormente, foi adicionado 50 mL de água destilada e transferido a um erlenmeyer de 500 mL, no qual o volume foi elevado até 275 mL.

O erlenmeyer foi fechado com folha de alumínio e autoclavado por 15 minutos a 1 atm. Após a retirada dos frascos e seu resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada, e o filtrado lavado com água destilada e seco em estufa à 105 °C até massa constante. A quantidade de lignina é medida pela a razão da massa do filtrado submetido a esse tratamento ácido pela massa seca inicial.

$$\text{Deslignificação (\%)} = \frac{L_I - (L_M \times M / 100)}{L_I} \times 100$$

Onde:

- L_I é a lignina insolúvel do bagaço (%)
- L_M é a lignina insóluel da massa hidrolisada
- M é a massa hidrolisada.

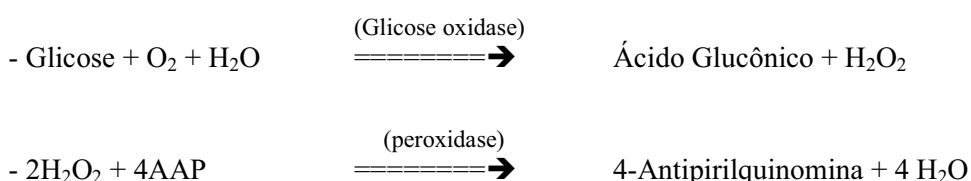
4.4.2. Determinação de açúcares redutores

A determinação da concentração de açúcares redutores (AR) foi feita a partir de amostras obtidas nos experimentos descritos anteriormente. Após neutralização a pH 7,0, filtradas e centrifugadas. AR foram determinados pelo método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1944) utilizando espectrofotômetro com a absorvância à 535nm, com a utilização de soluções conhecidas, para a definir a curva de calibração.

4.4.3. Determinação dos açúcares obtidos do pré-tratamento do bagaço da cana

4.4.3.1. Determinação das concentrações de glicose

A determinação da concentração de glicose no pré-hidrolisado e hidrolisado foi realizado com o Sistema enzimático para determinação da glicose (Glucos 500 – DOLES). A metodologia consiste em adicionar glicose em uma solução tampão de fosfatos em pH 7,4, contendo Glicose Oxidase, Peroxidase, 4-Aminoantipirina (4-AAP) e p-hidroxibenzoato (reagente de cor), processam-se as seguintes reações:



Misturar os reagentes por agitação e incubar por 10 minutos em banho-maria, a 37°C. Retirar do banho-maria e fazer leitura colorimétrica, com absorção em 510nm. O produto formado pela oxidação de 4- Aminoantipirina (4- Antipirilquinimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade, diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. Proceder como segue:

Tabela 5 – Protocolo experimental para determinação das concentrações de glicose das amostras de pré-hidrolisado e mosto.

	Tubo de referência	Tubo das amostra	Tubo do padrão
Reagente de cor (kit glucos)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Solução padrão glicose (0,01%)	-	-	20 µL
Amostras	-	20 µL	-

4.4.3.2. Determinação das concentrações de xilose

A determinação da concentração de xilose foi feita através de uma técnica clínica que mede a concentração desta pentose no plasma sanguíneo ou urina, adaptado para as amostras de pré-hidrolisado do bagaço da cana e o mosto fermentado. Para ser realizada a análise, o floroglucinol deve ser dissolvido numa solução de ácido acético e ácido clorídrico (9:1, v/v) até a concentração de 36 mmol/L. As pentoses formam, em meio ácido, um complexo colorido com o floroglucinol que se pode determinar através da leitura colorimétrica (EBERTS et al., 1979; JOHNSON et al., 1984). Para reação da solução ácida e xilose ocorrer devem ser pipetados em tubos de ensaio os reagentes de acordo com a tabela 6:

Tabela 6 – Protocolo experimental para determinação das concentrações de xilose das amostras de pré-hidrolisado e mosto.

	Tubo de Referência	Tubo do Padrão	Tubos das Amostras
Solução ácida (ác. acético e clorídrico)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Água destilada	0,1 mL	-----	-----
Sol. padrão xilose (0,01%)	-----	0,1 mL	-----
Amostras	-----	-----	0,1 mL

4.4.4. Determinação das concentrações de furfural

As concentrações de furfural nos hidrolisados foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD na indústria de alimentos CITROVITA (Catanduva/SP), sob as seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP 18 (200mm); temperatura da coluna: 25°C, detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente: solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume de amostra

injetada $20\mu\text{dm}^3$. As amostras foram diluídas e filtradas em membrana HAWP $0,45\mu\text{m}$ (Millipore). O eluente foi filtrado à vácuo em membrana GVWP $0,22\mu\text{m}$ (Millipore) e, em seguida, degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 0,25h.

4.4.5. Determinação das concentrações de 5-hidroximetilfurfural (HMF)

Foi utilizado o método espectrofotométrico, sendo as seguintes soluções preparadas previamente:

- Solução de Carrez I: 15 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Ferrocianeto de Potássio) diluídos e completados para 100mL com água deionizada;
- Solução de Carrez II: 30g de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Acetato de Zinco) diluídos e completados para 100mL de água deionizada;
- Solução de bissulfito de sódio 0,2% (m/v).

Em um béquer, foram adicionados 5,00g de amostra e cerca de 25 mL de água deionizada, solubilizando a amostra. Foram adicionados $500\mu\text{L}$ da solução de Carrez I, homogeneizando, e mais $500\mu\text{L}$ da solução de Carrez II, homogeneizando (neste momento, a solução se torna turva) e completando o volume para 100 mL. A solução foi então filtrada em papel, descartando-se os primeiros 10 mL filtrados.

Da solução filtrada, foram pipetados 5,0 mL em quatro tubos de ensaio. No primeiro, foram adicionados 5,0 mL da solução de bissulfito de sódio 0,2%, sendo este o tubo de referência. Nos demais foram adicionados 5,0 mL de água deionizada, sendo chamados de soluções teste.

As soluções foram homogeneizadas e medidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 284nm e 336nm em cubeta de quartzo. Antes das medidas em triplicata de cada amostra, o aparelho foi calibrado com a solução referência (bissulfito de sódio 0,2%). O método indica que se as leituras de absorvância forem superiores a 0,6 deve-se diluir as soluções teste e referência na mesma proporção, e repetir a leitura.

O teor de HMF, expresso em mg/Kg, é calculado:

$|\text{Abs } 284 - \text{Abs } 336| * F$, onde $F = 149,7$.

$$\text{Cálculo do F: } F = \frac{126 * 1000 * 1000}{16830 * 10 * 5}$$

onde 126 = P.M do HMF; 1000 = mg/g; 16830 = Abs HMF 284nm;

10 centilitro/L; 5 = g de amostra; 1000 = g/Kg.

4.4.6. Determinação da concentração de etanol

O teor alcoólico foi determinado nas dependências da Usina Nova América (Tarumã/SP). A concentração de álcool das amostras da fermentação do pré-hidrolisado utilizando o microdestilador TECNAL, modelo TE-012. Para a destilação, 25,0 mL de amostra foram misturadas com 50,0 mL de água destilada, coletando-se 50,0 mL do destilado, cuja concentração alcoólica foi determinada através de densímetro digital ANTON-PAAR, modelo DMA 4500.

4.4.7. Cálculo do rendimento da fermentação alcoólica

A eficiência da fermentação alcoólica (Y_p/s) é dada pela seguinte fórmula (Oliveira Neto; Yokoya, 1995):

$$\text{Rendimento (g/g)} = \frac{E_f - E_i}{AR_{\text{inicial}} - AR_{\text{final}}}$$

Onde:

AR inicial = concentração de AR no mosto de 0h de fermentação.

AR final = concentração de AR no mosto do tempo de fermentação analisado.

E_f = teor alcoólico no mosto do tempo de fermentação analisado.

E_i = teor alcoólico no mosto do tempo de fermentação inicial ou anterior ao analisado.

4.4.8. Concentração de acidez e pH

Mediante coleta de 10mL do vinho no final da fermentação foram analisadas o pH e acidez total. O pH foi medido potenciometricamente (Corning Scientific Instruments, mod 110) e a acidez total (a soma da acidez produzida, do hidrolisado e a do inoculo), pela titulação com NaOH 0,1N padronizado (AOAC, 1984). Os resultados de acidez foram em g/l de ácido láctico calculado pela seguinte equação:

$$\text{Acidez Láctica g/L} = \frac{\text{mL NaOH 0,1N} \times 9,008 \times \text{fator correção NaOH}}{\text{Volume da amostra (mL)}}$$

4.4.9. Viabilidade celular

A porcentagem de brotamento e de células vivas (viabilidade) em relação ao total de células foi determinada através do microscópio óptico em câmara de Neubauer. Para tanto, as células de leveduras foram coradas com solução eritrosina, sendo tomado como parâmetro, amostras do final de cada ciclo fermentativo. Os resultados foram dados em porcentagem de células vivas e de brotos vivos (descorados) em função do número total de células contadas.

4.4.10. Análise estatística

Os resultados dos experimentos executados nos testes de hidrólise ácida e fermentação serão analisados estatisticamente através do programa estatístico **GRAPHPAD PRISM** (Rutgers University). Foram utilizados os testes de análise de variância – ANOVA (One Way Analysis of Variance) e o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento ácido

5.1.1. Deslignificação

A deslignificação foi feita através do pré-tratamento do bagaço de cana com 120°C e solvente organosolv com diferentes condições de tempo e concentração de ácido sulfúrico (Tabela 7). Com 30 minutos de reação a 120°C e solvente organosolv (1:1 v/v), a deslignificação com 1,0 e 2,0% de H₂SO₄ foram respectivamente de 70,94 e 72,67%. No entanto, a deslignificação obtida por Pasquini et al. (2005) com 30 minutos de reação a 170°C e etanol (1:1 v/v) foi de 93%. Estes resultados indicam que a temperatura tem papel importante na deslignificação. Os resultados obtidos com 30 minutos de reação, nas mesmas concentrações ácidas comparados à tempos de reação diferentes foram estatisticamente inferiores (TUKEY, $p > 0,05$) (Figura 10).

Tabela 7 – Porcentagem de deslignificação e rendimento do bagaço em diferentes condições de tempo e concentração de H₂SO₄ a 120°C de temperatura e solvente organosolv (1:1) (v/v).

Tempo – H₂SO₄ (%)	Bagaço hidrolisado (%)	Deslignificação (%)	Desvio Padrão
30 - 0,0	87,23	25,22	4,511
30 - 0,5	75,35	34,66	2,703
30 - 1,0	65,85	44,84	1,850
30 - 2,0	62,84	50,77	1,361
60 - 0,0	84,78	35,37	2,300
60 - 0,5	73,47	42,72	2,010
60 - 1,0	58,97	61,11	2,209
60 - 2,0	58,20	66,14	2,005
120 - 0,0	83,94	36,84	2,372
120 - 0,5	72,18	40,86	2,010
120 - 1,0	57,13	62,47	1,209
120 - 2,0	55,01	67,47	2,005
30 - 1,0	65,85	44,84	1,850
60 - 1,0	58,97	61,11	2,209
120 - 1,0	57,13	62,47	1,209

Com 60 minutos de reação a 120°C e solvente organosolv (1:1) (v/v), o melhor resultado foi obtido com 2,0% de H₂SO₄, no entanto, não houve diferença estatística (TUKEY, $p > 0,05$) nos resultados referentes à concentração de açúcares e deslignificação, quando comparado com o obtido com 1,0% de H₂SO₄, mas no que se refere à produção de furfural e HMF, a concentração obtida com 2,0% de H₂SO₄ foi significativamente (TUKEY, $p < 0,05$) maior daquela encontrada em 1,0% de H₂SO₄ (Figura 18). No pré-tratamento realizado com 120 minutos de reação a 120°C e solvente organosolv (1:1) (v/v), quando os resultados são comparados aos obtidos com 1,0% de H₂SO₄ não há significância estatística (TUKEY, $p > 0,05$) (Figura 10), confirmando os resultados da literatura e do presente estudo, que reportam que concentrações ácidas entre 1,0% - 10,0% de H₂SO₄, a 120°C, 1 bar não contribuem com maiores rendimentos de lignina extraída e açúcares fermentescíveis nas condições. O aumento da hidrólise ácida só ocorre em altas concentrações ou soluções ácidas diluídas sob alta pressão (25 bar) e temperatura (190 a 220°C) (HILST, 1997). Nos resultados obtidos por Pasquini et al. (2005), a deslignificação no tempo de 60 minutos, utilizando solvente organosolv (etanol/água) (1:1) (v/v) a 170° e 190 bar, foi de 93,5%

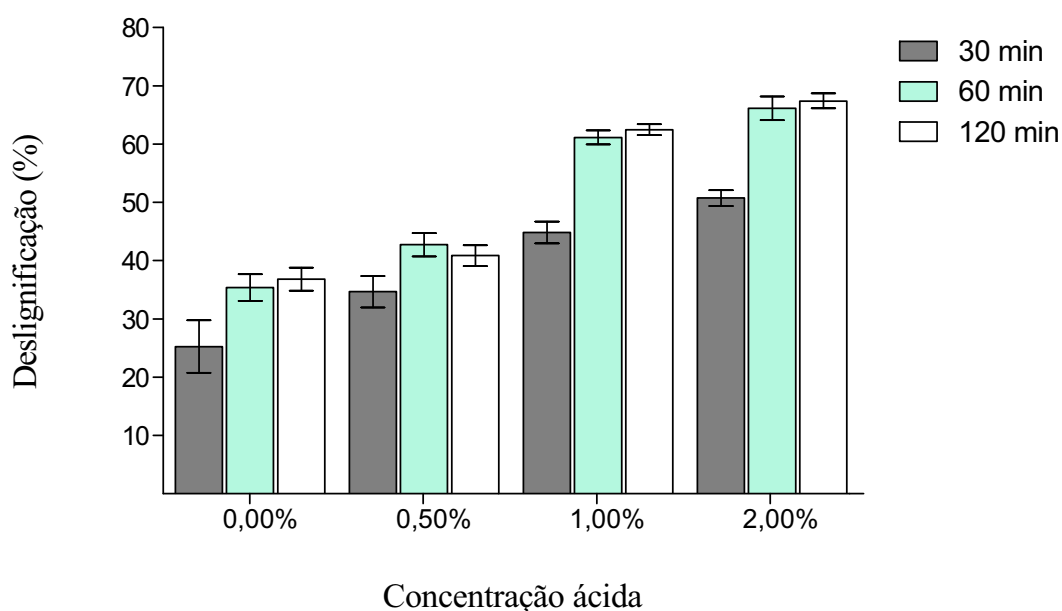


Figura 10 – Avaliação percentual da deslignificação do bagaço pré-tratado em diferentes condições de tempo e concentração de H₂SO₄ a 120°C de temperatura e solvente organosolv (1:1) (v/v).

Na Figura 11, comparou-se o pré-tratamento frente a diferentes condições de tempo a 120°C e 1,0% de H₂SO₄. A análise estatística mostrou que, entre 60 e 120 minutos de reação, não há diferença significativa (TUKEY, $p > 0,05$) e, que em 30 minutos de reação, o rendimento de lignina extraída é significativamente menor (TUKEY, $p < 0,05$).

Estes resultados sugerem que o tempo de reação de 60 minutos a 120°C de temperatura e 1,0% de H₂SO₄ é mais adequado para a obtenção de biomassa pré-tratada para a hidrólise ácida ou enzimática, devido ao rendimento do bagaço deslignificado (Tabela 7), facilidade para neutralizar a solução ácida resultante, diminuição da degradação dos carboidratos do bagaço e formação de resíduos inibidores da fermentação.

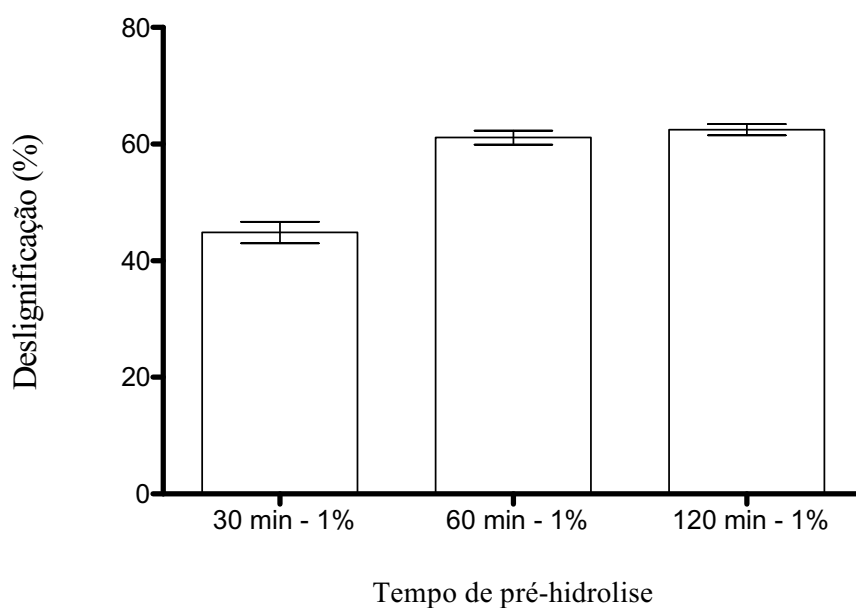


Figura 11 – Avaliação percentual da deslignificação do bagaço pré-tratado em diferentes condições de tempo com concentração de 1,0% de H₂SO₄ a 120°C de temperatura.

5.1.2. Açúcares redutores obtidos na pré-hidrólise

A partir do pré-tratamento do bagaço da cana (Tabela 8), com duração de 30 minutos, obteve-se melhor rendimento de extração dos açúcares na concentração de 2,0% de H_2SO_4 e resultou em 5,65 g/l de AR. No tempo de 60 minutos, com 1,0 e 2,0% de H_2SO_4 , os rendimentos atingiram valores próximos, 7,65 e 7,86 g/l de AR, respectivamente. Com 120 minutos de pré-tratamento, o melhor valor obtido foi 9,28 g/l de AR (2,0% de H_2SO_4). Estes resultados demonstraram que, quanto maior a concentração (entre 0,0-2,0% de H_2SO_4) e maior o tempo de reação (entre 0 e 120 min), maior é o rendimento de AR obtidos na pré-hidrólise. Entretanto, para a escolha dos parâmetros de tempo e concentração ácida no pré-tratamento do bagaço da cana, com base na literatura e nos resultados obtidos (Tabela 9), utilizou-se uma condição intermediária, (1,0% de H_2SO_4 , 60 min, 121°C), devido ao fato de que nesta etapa previa-se uma hidrólise parcial da fibra, onde a mesma se torna mole, quebradiça e facilmente homogeneizada no liquidificador para realização da etapa seguinte.

Tabela 8 – Teor de açúcares redutores obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise à 121°C e 1 atm.

Tempo (min)	H_2SO_4 (%)	AR (%)			média	Desvio Padrão
		1x	2x	3x		
30	0,0	0,051	0,046	0,048	0,048	0,003
	0,5	0,328	0,321	0,325	0,325	0,004
	1,0	0,413	0,389	0,402	0,402	0,012
	2,0	0,541	0,604	0,552	0,565	0,034
60	0,0	0,052	0,052	0,057	0,054	0,003
	0,5	0,387	0,374	0,354	0,372	0,017
	1,0	0,774	0,792	0,725	0,765	0,035
	2,0	0,809	0,76	0,786	0,786	0,020
120	0,0	0,049	0,057	0,048	0,052	0,005
	0,5	0,508	0,554	0,486	0,516	0,035
	1,0	0,723	0,751	0,782	0,753	0,029
	2,0	0,798	1,094	0,889	0,928	0,152

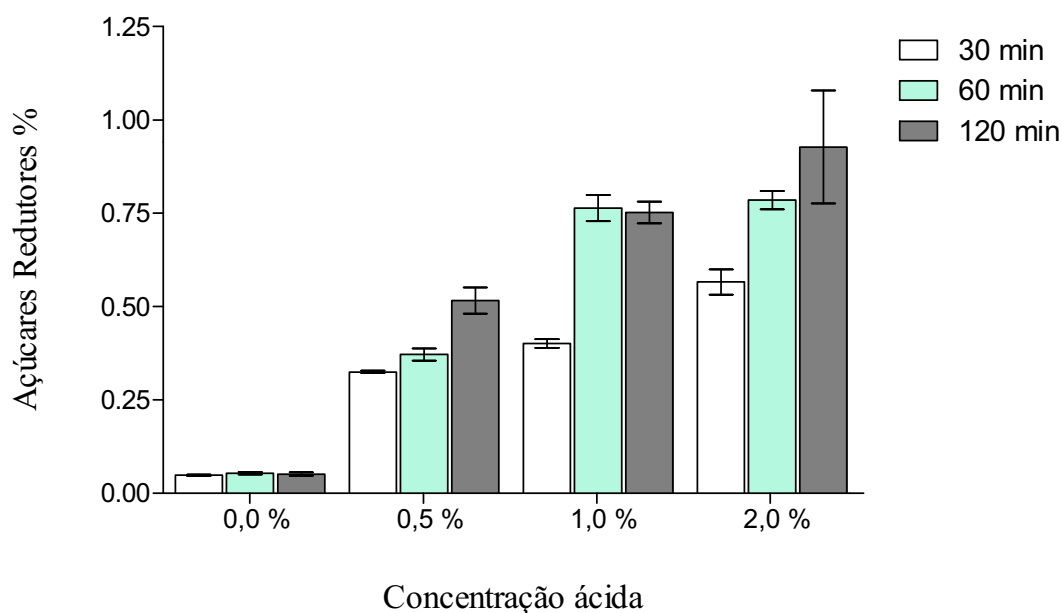


Figura 12 – Teor de açúcares redutores obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise à 121°C e 1 atm.

Tabela 9 – Melhor tempo e concentração ácida para a pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com 1,0% de H₂SO₄ à 121°C e 1 atm durante 60 min.

Repetições	AR (%)	Desvio Padrão	Rendimento (%)	Desvio Padrão
1	0,855	---	69,2	---
2	0,787	---	63,7	---
3	0,822	---	66,5	---
4	0,828	---	66,8	---
5	0,702	---	65,8	---
6	0,738	---	59,8	---
média	0,789	0,058	65,3	3,22

Com isso, a partir da pré-hidrólise, obteve-se a separação da lignina da fibra de celulose, bem como a hidrólise da hemicelulose, o que possibilitou a realização da hidrólise ácida, onde a celulose sofreu processo de hidrólise e, em menor proporção, as pentoses, xilose e arabinose, restantes foram degradadas.

A escolha da condição mencionada deve-se ao fato, também de provocar menor formação de compostos como furfural, hidroximetil-furfural e outros ácidos orgânicos devido à degradação dos açúcares obtidos. Nesta fase, obteve-se AR, e supõe-se que ocorra predomínio de xilose da fração de hemicelulose. (Tabelas 8 e 9)

De acordo com Pessoa Jr, et al. (1997), o pré-tratamento é eficiente na conversão de hemicelulose em xilose, enquanto a porção de celulose dificilmente é hidrolisada. Purchase (1986) tem estudado e relatam um progresso contínuo no desenvolvimento da fermentação para a obtenção de álcool a partir da xilose derivada do bagaço da cana-de-açúcar. Villar (1984) demonstrou que de 7 a 10% de concentração de ácido sulfúrico e temperatura de 80° a 90°C, com duração de reação entre 5 a 55 min, o rendimento de açúcares fermentescíveis obtidos foi maior com o aumento da temperatura e concentração da solução ácida. Contudo o rendimento máximo obtido pelo autor diminuiu o tempo de reação, ao passo que os outros fatores parâmetros aumentaram, ou seja, um processo hidrolítico mais longo poderia degradar os açúcares. Por este motivo, o tempo de reação de 60 minutos foi escolhido, para evitar a produção de compostos inibidores da fermentação pela degradação dos açúcares. No entanto, é necessário o desenvolvimento de metodologia que produza maior extração da porção de hemicelulose sem produzir compostos tóxicos.

Planes (1974) e Villar (1984) demonstraram em seus estudos que a maior recuperação de AR foi obtida com a pré-hidrólise com H₂SO₄ à 1,0 % (v/v) em temperatura de 140°C por 30 minutos e pré-hidrólise com ácido sulfúrico à 2,0 e 140°C com 30 minutos. Os autores relataram aumento pouco expressivo na aquisição de açúcares com o aumento da concentração de ácido entre 2,0 e 7,0%, confirmando os resultados obtidos no pré-tratamento e hidrólise ácida (Tabela 7). No presente trabalho, os resultados apontam que concentrações ácidas entre 1,0 e 10,0% com tempo de reação entre 60 e 150 minutos aumentam o rendimento de açúcares fermentáveis obtidos, atingindo melhores resultados com 150 minutos e 10% de H₂SO₄ (9,75g/L). As soluções diluídas de ácido não hidrolisam as fibras celulósicas devido ao fato de exigirem pressões e temperaturas elevadas, o que torna este tipo de hidrólise pouco competitiva na indústria (KIM, 2002; ROSSEL, et al., 2005). O presente trabalho propõe que a utilização do sulfato férrico e a adição de acetona no solvente devem contribuir para melhorar o pré-tratamento com temperaturas abaixo de 140°C, o que evitaria, a degradação dos AR e desta forma, aumentar o tempo de reação e melhorar os rendimentos da pré-hidrólise e hidrólise.

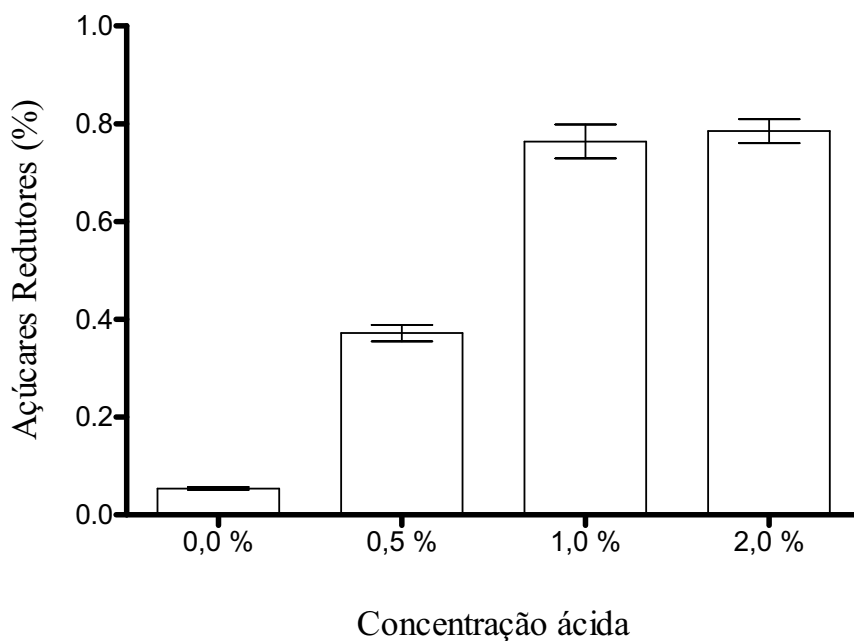


Figura 13 – Avaliação do desempenho concentração ácida para obtenção de maior concentração de açúcares redutores proveniente da pré-hidrólise à 120°C e com 60 minutos de reação.

5.1.2.1. Concentração de glicose obtida na pré-hidrólise

A concentração da glicose presente no pré-hidrolisado é baixa comparada à concentração de xilose. Isto se deve ao fato de que as condições utilizadas para hidrolisar a fração de hemicelulose (Tabela 10) não são fortes o suficiente para quebrar as ligações da celulose, o que implica num baixo rendimento da hexose que forma sua estrutura, a glicose. Na Figura 14, observa-se que, apesar da concentração de glicose ser baixa em relação à xilose, a hidrólise da celulose é significativamente mais acentuada em concentrações de H_2SO_4 acima de 1,0% (TUKEY, $p < 0,05$) e, independente de concentração ácida ou tempo de reação, a quantidade de glicose gerada a partir da hidrólise da celulose não é significativa (TUKEY, $p > 0,05$) (Figura 15).

Tabela 10 - Avaliação do desempenho de extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 60 minutos de reação com diferentes condições de concentração de H_2SO_4 a $120^\circ C$.

Conc. % H_2SO_4	Repetições (g/L)			média (g/L)	Desvio Padrão
	1	2	3		
0,0	0,03	0,028	0,035	0,031	0,004
0,5	0,205	0,196	0,223	0,208	0,014
1,0	0,446	0,412	0,438	0,432	0,018
2,0	0,424	0,473	0,381	0,426	0,046

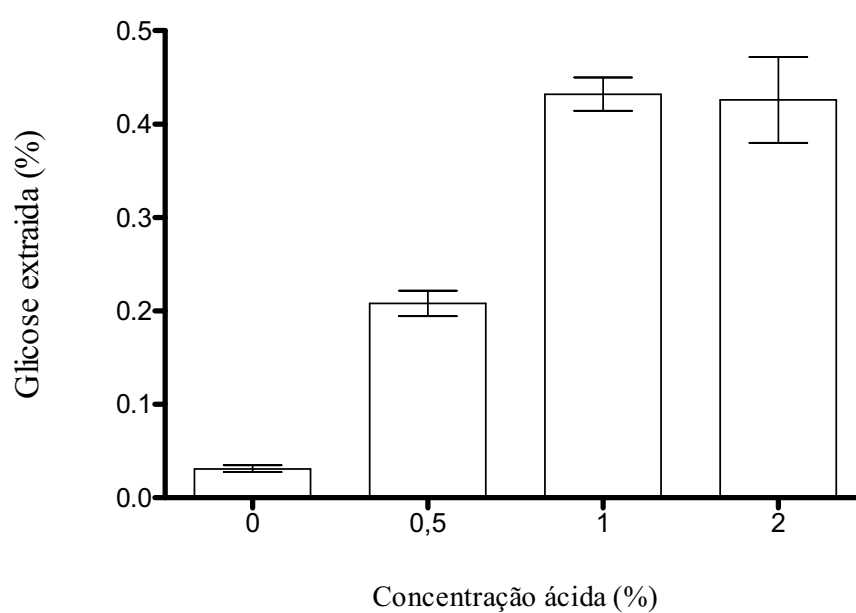


Figura 14 – Avaliação do desempenho de extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 60 minutos de reação com diferentes condições de concentração de H_2SO_4 a $120^\circ C$.

Tabela 11 - Avaliação do desempenho para extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida com 1,0% de H_2SO_4 a $120^\circ C$.

Tempo (min)	Repetições (g/L)			Desvio Padrão	Média (g/L)
	1	2	3		
30	0,254	0,189	0,217	0,032	0,203
60	0,449	0,391	0,406	0,030	0,3985
120	0,445	0,428	0,399	0,023	0,4135

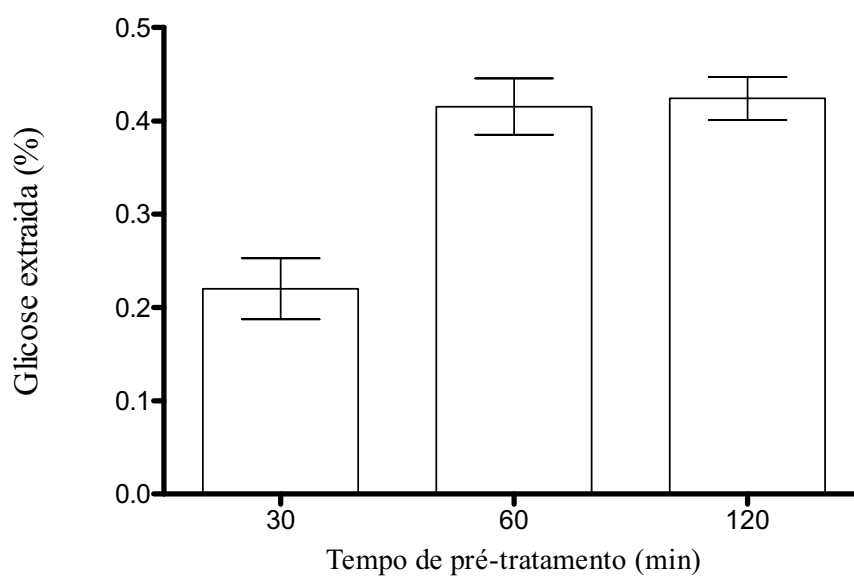


Figura 15 – Avaliação do desempenho da extração de glicose proveniente da pré-hidrólise ácida em diferentes tempos de reação com concentração 1,0% de H_2SO_4 à $120^\circ C$.

5.1.2.2. Concentração de xilose obtida na pré-hidrólise

A partir do pré-tratamento do bagaço da cana (Tabela 12), nos tempos de 30, 60 e 120 minutos com concentração ácida de 1,0%, obteve-se melhor rendimento de extração da xilose com os tempos de reação de 60 e 120 minutos que resultaram, respectivamente em 7,13 g/L e 7,07 g/L de xilose. No tempo de 30 minutos, com 1,0% de H₂SO₄, o rendimento atingiu um valor baixo, de 3,53 g/L de xilose. Assim como foi observado nos resultados de açúcares redutores, a concentração de xilose com 60 minutos de tempo de reação foi um pouco maior em relação ao valor obtido com 120 minutos de pré-tratamento. Estes resultados demonstram que, quanto maior o tempo de reação, a partir de 60 minutos de reação, o rendimento de xilose obtido na pré-hidrólise diminui, devido à exposição prolongada a altas temperaturas e acidez, que causam a formação de ácidos orgânicos e furfurais.

Tabela 12 – Avaliação do desempenho da condição para obtenção de maior extração de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida com 1,0% de H₂SO₄ a 120°C.

Tempo (min)	Repetições (g/L)			Média (g/L)	DP
	1	2	3		
30	3,386	3,677	3,539	3,534	0,146
60	6,926	7,387	7,074	7,129	0,235
120	7,347	6,821	7,045	7,071	0,264

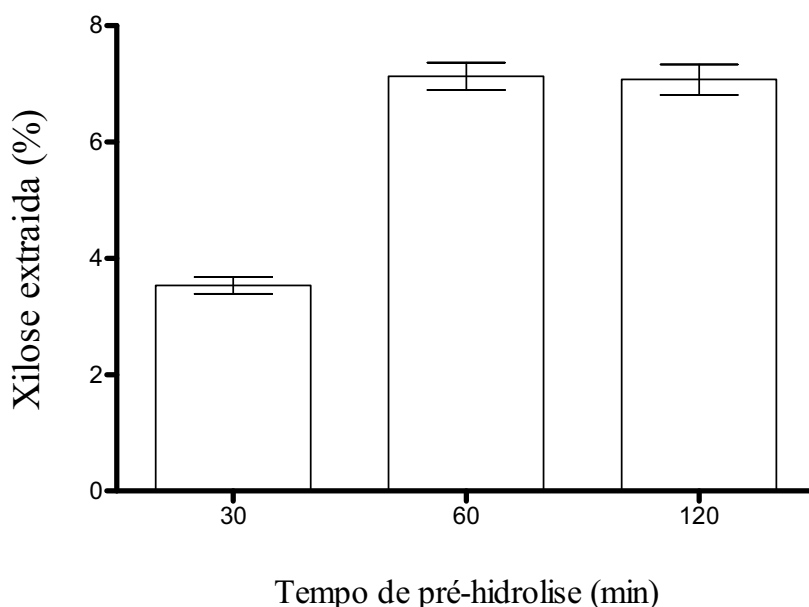


Figura 16 – Avaliação do desempenho da melhor condição para obtenção de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida à 1,0% de H_2SO_4 a 120°C.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que a escolha dos parâmetros de tempo e concentração ácida no pré-tratamento do bagaço da cana, com base na literatura e nos resultados obtidos (1,0% H_2SO_4 , 60 min, 121°C) foi a mais eficiente, devido ao fato de que nesta etapa houve maior conversão da porção de hemicelulose em açúcares pentose, predominantemente a xilose.

Depois de determinado o melhor tempo, foram realizados experimentos para se avaliar qual é a melhor concentração ácida para 60 minutos para tempo de reação da pré-hidrólise (Tabela 12). AR foram determinados indicando que, para 1,0 e 2,0% de H_2SO_4 , os resultados são semelhantes, 7,65 e 7,53 g/L. No entanto, observa-se na Tabela 13 que a quantidade de xilose obtida com 1,0% foi superior em todos os experimentos realizados em relação ao observado em 2,0%. Este resultado indica que, não somente um tempo prolongado de exposição à temperatura, mas também à concentração ácida, tem um papel determinante na degradação da xilose em inibidores de microrganismos na fermentação alcoólica.

Tabela 13 – Avaliação do desempenho da concentração ácida para obtenção de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida à 1,0% de H₂SO₄ a 120°C com 60 min.

Conc. H ₂ SO ₄	Repetições (g/L)			média (g/L)	Desvio Padrão
	1	2	3		
0,0%	0,505	0,454	0,478	0,479	0,025
0,5%	3,163	3,296	3,282	3,247	0,073
1,0%	6,906	7,162	7,187	7,085	0,155
2,0%	6,681	6,753	6,744	6,726	0,111

Com 60 minutos de reação 0,5% de H₂SO₄, não ocorreu pré-hidrólise com rendimento significativo em relação aos obtidos nos experimentos às condições de concentração de 1,0 e 2,0% de H₂SO₄. Na condição sem adição de ácido sulfúrico, a quantidade de pentoses obtida é baixa, no entanto, este resultado indica que temperaturas elevadas podem hidrolisar a porção de hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar.

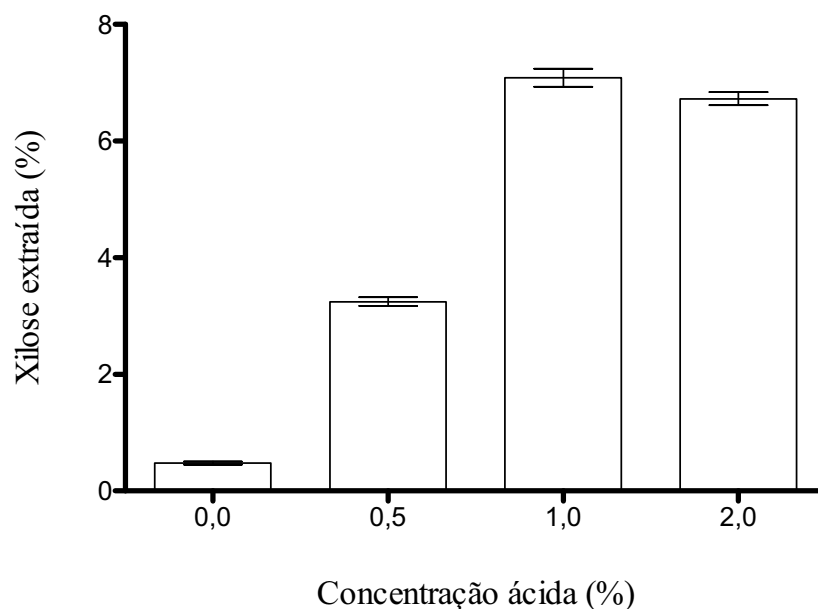


Figura 17 – Avaliação do desempenho da concentração de H₂SO₄ para obtenção de maior concentração de xilose proveniente da pré-hidrólise ácida a 120°C com 60 min.

5.1.3. Concentração de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

Os resultados das análises de amostras das pré-hidrólises com 60 minutos de reação a 120°C de temperatura em diferentes concentrações ácidas (Figura 18) demonstram que a concentração de H₂SO₄ tem papel muito importante na formação do HMF e furfural. No hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento sem adição de ácido sulfúrico, as concentrações de HMF e furfural são extremamente baixas, provavelmente resultantes da degradação do baixo teor de AR obtidos nos controles (0,0% de H₂SO₄). As concentrações ácidas acima de 1,0% de H₂SO₄ são eficazes na formação destes produtos formados durante a degradação das hexoses e pentoses liberadas pelo pré-tratamento, como é mostrado na figura 18. Tanto a concentração de HMF e furfural são significativamente maiores (TUKEY, $p < 0,05$) no hidrolisado do pré-tratamento com 2,0% de H₂SO₄ quando comparados aos resultados do hidrolisado do pré-tratamento com 1,0% de H₂SO₄.

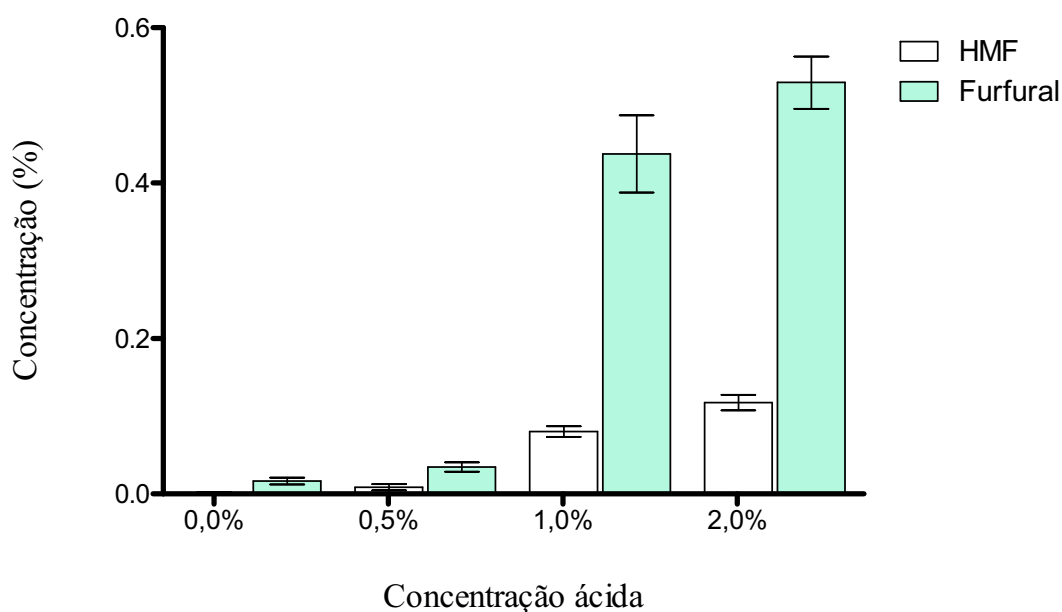


Figura 18 – Efeito da pré-hidrólise do bagaço da cana à 120°C em diferentes concentrações de H₂SO₄ na produção de furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

A determinação do melhor tempo de pré-hidrólise foi feita com base nos resultados apresentados na Figura 19. Mantendo a concentração de 1,0% de H_2SO_4 a $120^\circ C$ de temperatura em diferentes tempos de reação, pode ser visto que com 30 minutos de reação, não ocorre degradação significativa de açúcares para a formação de furfurais. A partir de 60 minutos de reação, a concentração destes produtos aumenta significativamente. Embora as concentrações de furfural não sejam muito diferentes em 60 e 120 minutos de pré-tratamento (0,411 e 0,446 respectivamente), estatisticamente esta diferença foi significativa (TUKEY, $p < 0,05$), no que diz respeito ao HMF, não houve diferença significativa entre os dois experimentos (TUKEY, $p > 0,05$).

Devido aos resultados obtidos, o pré-tratamento com 60 minutos de reação a $120^\circ C$ de temperatura, 1,0% de H_2SO_4 e solvente organosolv (1:1) (v/v) foi confirmado como melhor conjunto de parâmetros para obtenção do xarope de xilose para ser utilizado como substrato da fermentação, já que o HMF e o furfural são grandes inibidores da fermentação e do desenvolvimento dos microrganismos utilizados para o experimento.

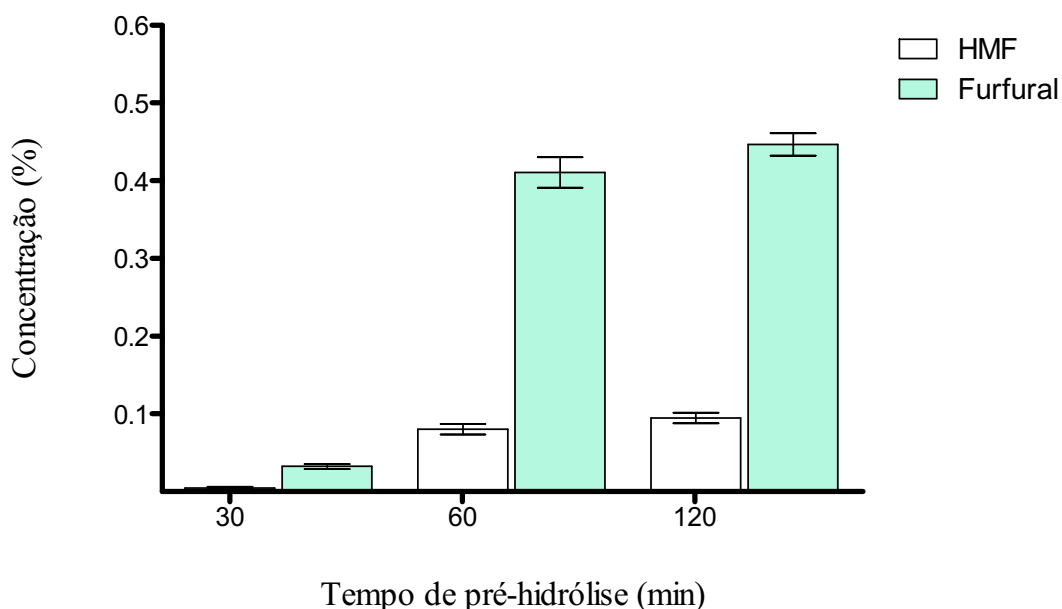


Figura 19 – Efeito do tempo de pré-hidrólise ácida do bagaço da cana à $120^\circ C$ com 1,0% de H_2SO_4 e solvente organosolv.

5.2. Hidrólise ácida

5.2.1. Açúcares redutores (AR)

Os resultados obtidos na pré-hidrólise demonstram que, levando em consideração a concentração ácida que deverá ser neutralizada para fermentação, tempo de reação do pré-tratamento e concentração de açúcares obtidos na pré-hidrólise, a melhor condição de pré-tratamento para a realização da hidrólise ácida do bagaço da cana é a mostrada na Tabela 9. Com 1,0% de H_2SO_4 e 60 minutos de reação, o bagaço foi pré-hidrolisado e foi preparado para a hidrólise ácida.

O teor de AR das amostras de 90 minutos de hidrólise teve aumentou gradualmente, conforme a concentração ácida foi aumentada. Embora tenha sido encontrado um aumento de açúcares redutores com o aumento da concentração ácida com tempo de reação de 90 minutos a $121^\circ C$, este não foi expressivo e não resultou num rendimento de extração de açucars muito superior, demonstrando que a faixa de concentração ácida utilizada neste experimento tem pouca influência na reação de hidrólise (Tabela 14).

Na hidrólise com duração de 120 minutos, as concentrações de açúcares obtidas não aumentaram quando comparadas com os resultados observados na hidrólise de 90 minutos, indicando que um aumento de 30 minutos no tempo de hidrólise não melhora o rendimento dos açúcares obtidos da hidrólise do bagaço previamente tratado (Tabela 14).

Na hidrólise de 150 minutos, nas concentrações ácidas de 0,0% e 1,0 % de H_2SO_4 , não foi obtida nenhuma concentração de açúcares redutores diferentes dos resultados obtidos anteriormente, no entanto, foi observado no hidrolisado de 5,0% de H_2SO_4 , uma concentração de 3,07 g/l de açúcares e, na hidrólise de maior concentração ácida (10,0% de H_2SO_4), foi obtido um teor alto em relação aos outros hidrolisados, de 9,75 g/l de açúcares, como pode ser observado na Tabela 14.

As investigações de Foad et al. (2005) sobre a hidrólise ácida com soluções concentradas apresentam resultados com rendimento de açúcares perto do máximo teórico, mas as dificuldades de neutralização do hidrolisado para fermentação, difícil manipulação na indústria devido à corrosão dos equipamentos e estrutura e risco de formação de compostos tóxicos geram altos custos que tornam esta hidrolise proibitiva.

Os resultados obtidos na hidrolise indicam a necessidade do aumento do tempo de reação sob as mesmas condições de acidez já trabalhadas, uma vez que o aumento da concentração ácida impede a utilização desta tecnologia no meio industrial pelos problemas já

citados. Para determinar se a degradação de açúcares é significativa, serão realizadas análises nas amostras já coletadas e nos experimentos que ainda serão realizados. É necessário quantificar os teores de lignina e de compostos resultantes de sua degradação para determinar a eficiência do pré-tratamento e seguir, por último, com a fermentação do hidrolisado e análises de seu rendimento na presença de furfural e técnicas de extração deste composto para otimização da fermentação do hidrolisado do bagaço.

Tabela 14 – Hidrólise ácida do bagaço pré-tratado: Açúcares redutores (AR) obtidos em diferentes tempos de reação e concentração de ácido sulfúrico a 121°C a 1atm.

Tempo (min)	Conc ácida H₂SO₄ (%)	AR (%)	Massa Obtida (g/L)
90	0,0	0,215	2,15
	1,0	0,235	2,35
	5,0	0,261	2,61
	10,0	0,341	3,41
120	0,0	0,205	2,05
	1,0	0,245	2,45
	5,0	0,259	2,59
	10,0	0,352	3,52
150	0,0	0,195	1,95
	1,0	0,217	2,17
	5,0	0,307	3,07
	10,0	0,975	9,75

5.3. Ensaios fermentativos

5.3.1. Determinação da concentração de etanol

Os resultados obtidos demonstram que o teor alcoólico do mosto nas primeiras 24 horas de fermentação atinge seu valor máximo e, após as 24 horas, a concentração de etanol começa a diminuir (Figura 20). Na Tabela 15, pode ser observada a variação do aumento da concentração etanólica nas primeiras 12 horas de fermentação, cuja concentração de etanol é de 0,15% e, em 24 horas de fermentação, a concentração de etanol atinge 0,205%. A partir das 48 horas de fermentação, a concentração de etanol diminui, devido ao consumo concorrente à produção de etanol por *P. tannophilus*. Na Figura 20, é importante ser observado que em todas as fermentações realizadas a produção de etanol e seu consumo são semelhantes e não existiu diferença significativa (TUKEY, $p > 0,05$) quanto à produção de etanol entre as três tratamentos testados. De acordo com os resultados obtidos e a literatura, este consumo se deve ao fato de que a concentração de AR diminui rapidamente nas primeiras 24 horas e passa a diminuir gradualmente até as 120 horas finais do experimento, logo o fermento passa a utilizar o etanol como fonte de carbono. Na Figura 21 pode ser evidenciado que a diminuição da concentração de etanol e o consumo de açúcares são mais acentuados nas 24 horas iniciais da fermentação e em seguida passa a ter uma diminuição gradual. Isto se deve ao fato de que, tanto o etanol quanto os açúcares, estão sendo utilizados pelo fermento para a produção de energia.

Tabela 15 – Concentração de etanol das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

Tempo das amostras	Repetições (%)			Médias (%)	Desvio Padrão
	1	2	3		
0 h	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0000
12 h	0,148	0,141	0,157	0,149	0,0065
24 h	0,190	0,210	0,216	0,205	0,0112
48 h	0,121	0,145	0,130	0,132	0,0099
72 h	0,032	0,036	0,040	0,036	0,0033
96 h	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0000
120 h	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0000

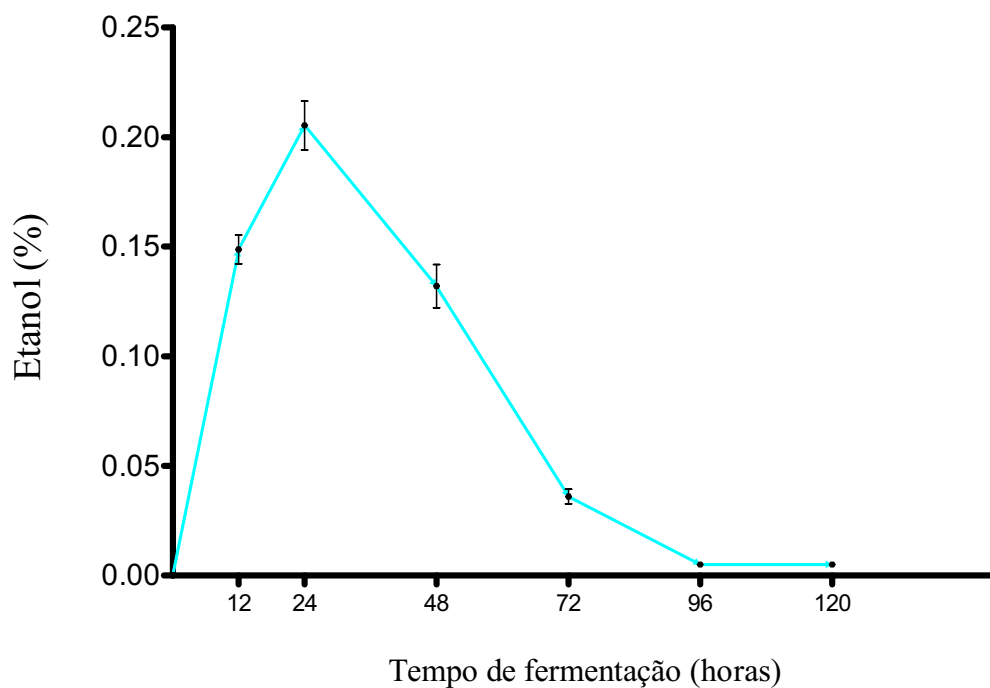


Figura 20 – Avaliação do teor alcoólico das amostras da fermentação alcoólica em 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysollen tannophilus*.

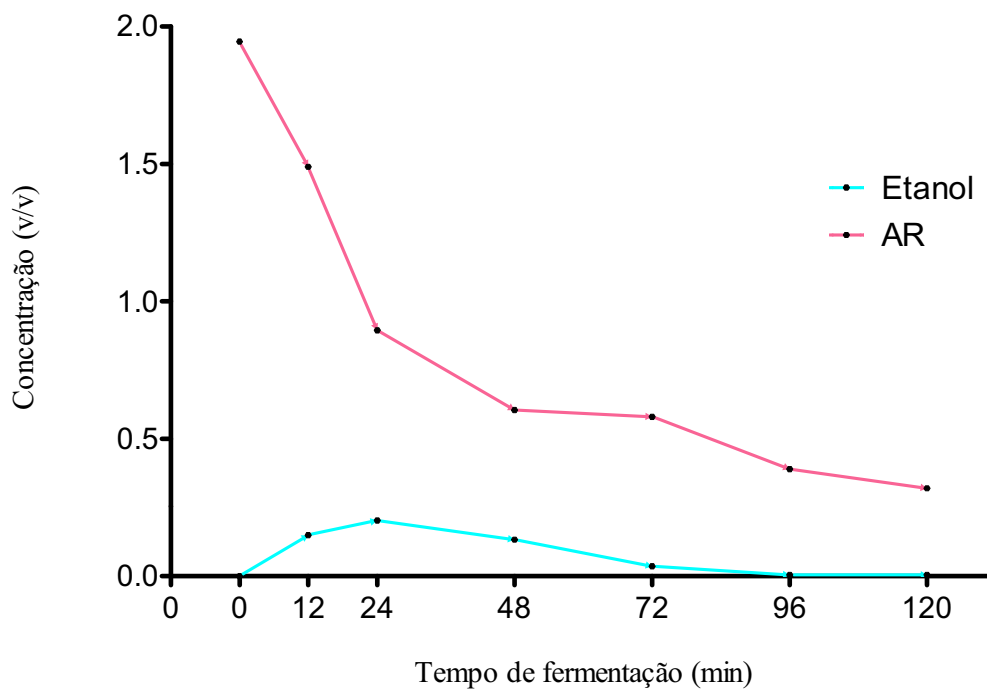


Figura 21 – Avaliação do consumo dos açúcares vs fermentação alcoólica em 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysollen tannophilus*.

5.3.2. Cálculo da eficiência da fermentação alcoólica

Os resultados obtidos (Tabela 16) indicam que o rendimento de etanol é muito inferior em relação a fermentação tradicional em todos os tempos de fermentação, principalmente a partir do momento em que o fermento passa a consumir o etanol produzido (Figura 22). Apesar do teor de xilose ser suficiente, o consumo de etanol observado dificulta o aproveitamento deste na fermentação alcoólica por *P. tannophilus* nas condições estudadas

Tabela 16 – Rendimento de teor alcoólico/g de xilose consumido das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

Tempo	Repetições (etanol/g xilose)			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
0 h - 12h	0,285	0,220	0,235	0,247	0,034
12 h - 24 h	0,12	0,125	0,097	0,114	0,015
0 h - 24 h	0,22	0,177	0,169	0,188	0,028
0 h - 48 h	0,095	0,112	0,089	0,098	0,012
0 h - 72 h	0,025	0,026	0,027	0,026	0,001
0 h - 96 h	0,0035	0,003	0,003	0,003	0,000
0 h - 120 h	0,0032	0,003	0,003	0,003	0,000

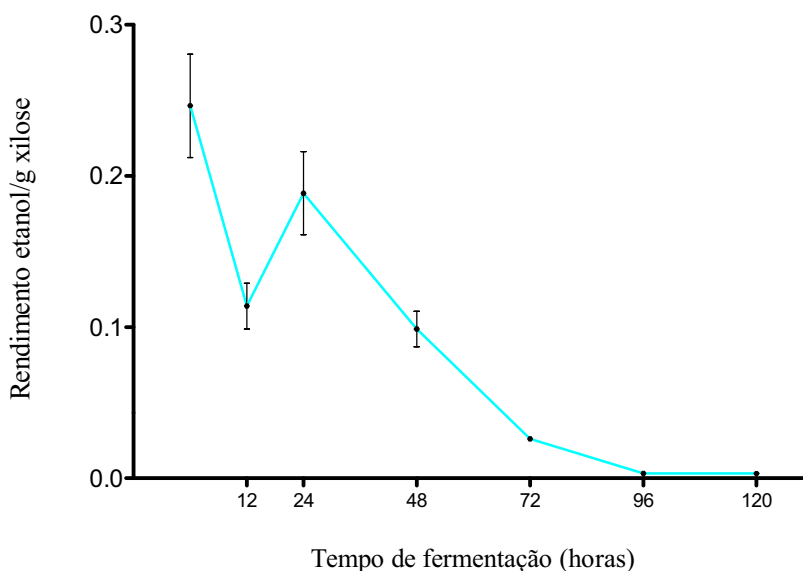


Figura 22 – Avaliação do rendimento etanólico nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da hidrólise da hemicelulose do bagaço de cana por *Pachysolen tannophilus*

5.3.3. Concentração de açúcares redutores (AR)

Foram retiradas as amostras do mosto para análise de açúcares redutores de todos os tempos de retirada da fermentação do pré-hidrolisado. Pode ser observado na Tabela 17 que a maior parte do açúcar disponível é consumido nas primeiras 24 horas da fermentação e, após este período, a concentração de açúcares redutores diminui lentamente até as 120 horas finais. A concentração inicial de 1,95 g/L de Açúcares redutores diminui para 1,43 g/L na amostra de 12 horas e 0,83 g/L na amostra de 24 horas (Figura 23), este consumo representa cerca de 60% do total. Na análise das amostras de 48, 72, 96 e 120 horas, é observado um consumo médio de 8,0% do volume inicial a cada 24 horas. As concentrações de xilose e glicose nas amostras do fermentado foram consumidas na mesma proporção (Figura 23). De acordo com a literatura e com os resultados do teor de açúcares (Tabela 17) e concentração de etanol (Tabela 15) obtidos nas amostras do fermentado, os açúcares são rapidamente consumidos nas primeiras 24 horas, pois são as únicas fontes de carbono disponíveis para as leveduras e, conforme o etanol é produzido e o teor dos açúcares não é repostado, as leveduras da espécie *P. tannophilus* consomem preferencialmente a xilose (Tabela 18) para seu metabolismo energético e produção de etanol, mas podem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono alternativa para compensar a baixa concentração dos açúcares do meio. Estes resultados indicam que esta levedura apresenta grande desvantagem em relação à *Saccharomyces cerevisiae*, que não consome o produto de fermentação, que é a finalidade do procedimento. De acordo com a literatura, *P. tannophilus* produz xilitol a partir dos açúcares e do etanol como produto final de seu processo fermentativo.

Tabela 17 – Açúcares redutores consumidos nos diferentes tempo da fermentação alcoólica via *Pachysolen tannophilus*.

Tempo (horas)	Repetições (%)			Médias (%)	Desvio Padrão
	1	2	3		
0 h	1,97	1,92	1,97	1,95	0,029
12 h	1,70	1,28	1,30	1,43	0,237
24 h	1,10	0,73	0,69	0,84	0,226
48 h	0,69	0,62	0,52	0,61	0,085
72 h	0,67	0,54	0,49	0,57	0,093
96 h	0,52	0,32	0,26	0,37	0,136
120 h	0,39	0,25	0,25	0,30	0,808

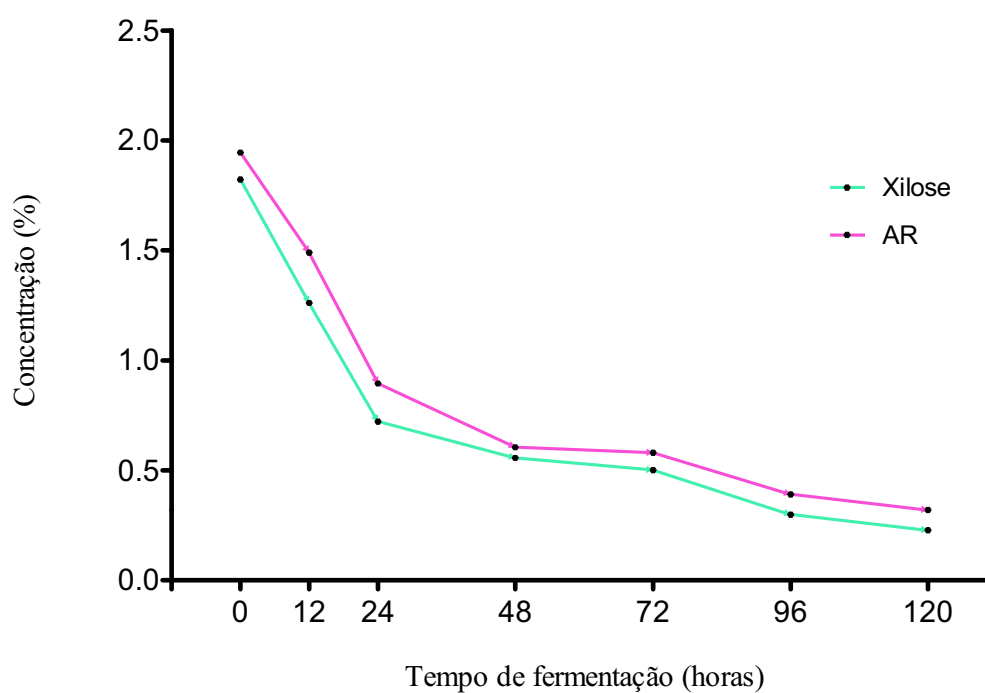


Figura 23 – Avaliação da média do consumo dos açúcares redutores e xilose durante fermentação alcoólica de 120 horas de fermentação do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

Tabela 18 – Consumo da concentração de xilose das amostras da fermentação alcoólica de 120 horas do pré-hidrolisado com *Pachysolen tannophilus*.

Amostras	Repetições (%)			médias	Desvio Padrão
	1x	2x	3x		
0 h	1,813	1,821	1,862	1,832	0,026
12 h	1,548	1,154	1,217	1,306	0,236
24 h	0,976	0,682	0,626	0,761	0,188
48 h	0,612	0,564	0,472	0,549	0,071
72 h	0,602	0,494	0,428	0,508	0,087
96 h	0,463	0,280	0,210	0,318	0,130
120 h	0,353	0,202	0,204	0,252	0,086

5.3.4. Concentração de acidez e pH

A Figura 24 mostra que a maior produção de ácidos orgânicos totais ocorreu principalmente nas primeiras 48 horas de fermentação, no período de tempo que a levedura consumiu quase toda a concentração de açúcares e do próprio etanol produzido, sendo esta diferença significativa (TUKEY, $p < 0,05$). Após 72 horas de fermentação, a produção dos ácidos orgânicos não foi significativa, tendo em vista que a fonte de carbono está no seu limite mais baixo.

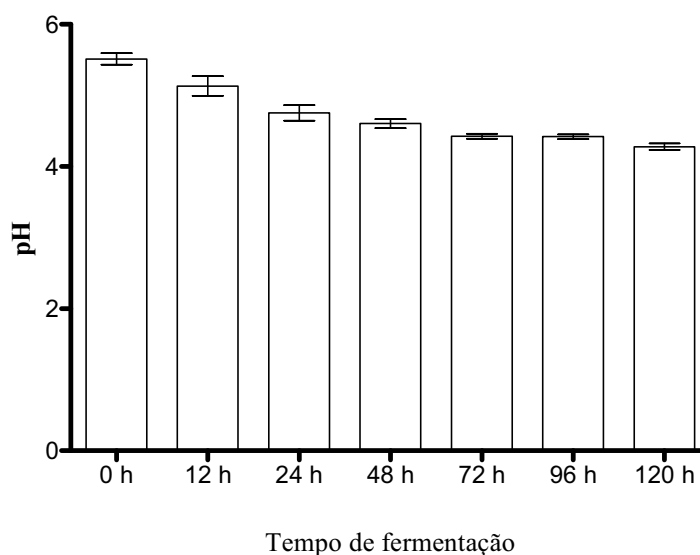


Figura 24 – Avaliação da variação de pH dos diferentes tempos de fermentação por *Pachysolen tannophilus*.

5.3.5. Viabilidade celular

Ao submeter os dados obtidos da viabilidade nos diferentes tempos de fermentação à análise de Variância, indicou que não houve diferença entre os diferentes tempos nas primeiras 72 horas de fermentação (Anova, $p > 0,05$) (figura 25). No entanto, a partir das 96 horas, houve uma queda significativa da viabilidade celular que se repetiu no tempo de 120 horas. Os resultados obtidos demonstram que isto se deve à baixa concentração de açúcares que se observada a partir do tempo de 24 horas. Neste momento, as células passam a consumir, juntamente com os açúcares que ainda restam, o etanol produzido na fermentação e passam a formar principalmente o xilitol. Quando a concentração de AR e etanol atinge níveis muito baixos, as células passam a morrer. Este dado mostra a versatilidade fisiológica desta levedura no que diz respeito ao substrato utiliza como fonte de carbono alternativa para produzir energia.

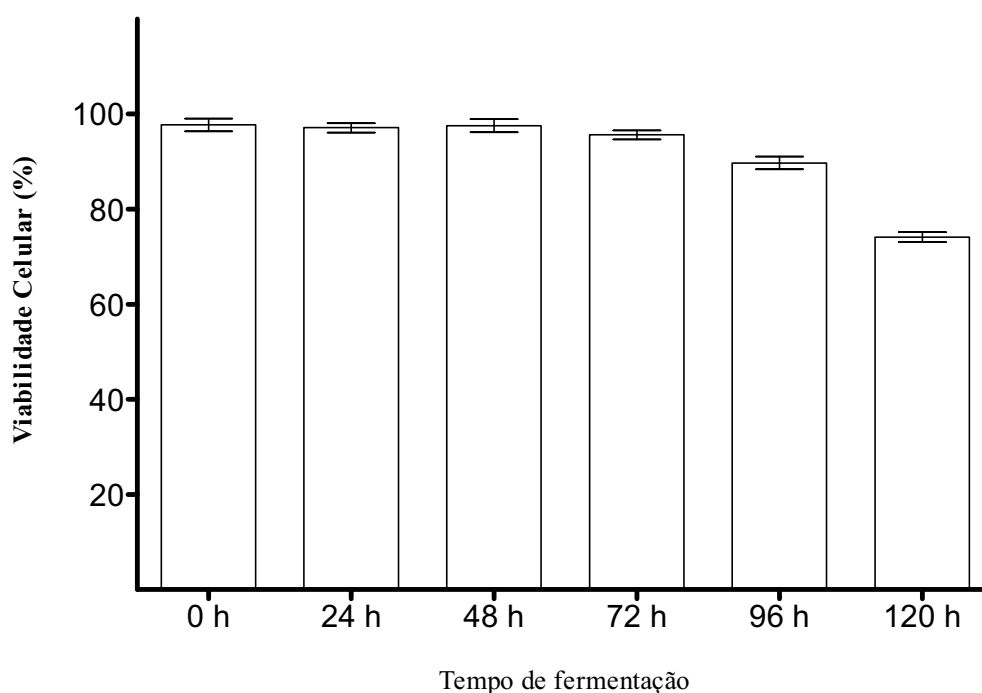


Figura 25 – Avaliação da viabilidade celular de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.

O brotamento total, em todos os tempos de fermentação, aumentou significativamente (TUKEY, $p < 0,05$). No entanto, nas primeiras 24 horas este crescimento foi um pouco mais tímido em relação aos outros tempos de fermentação. Estes resultados sugerem que, apesar do fermento se encontrar em condições que estimulam a fermentação para produção de etanol e em menor proporção xilitol, as células estavam em crescimento (Figura 26). A figura 27 mostra ainda, que existiu uma tendência de equilíbrio nas primeiras 72 horas de fermentação e não houve diferença estatística nestes tempos (TUKEY, $p > 0,05$), no entanto, apesar do brotamento aumentar a partir das 96 horas de fermentação, a viabilidade dos brotos vivos diminuiu significativamente (TUKEY, $p < 0,05$), devido a falta de uma fonte de carbono (etanol ou xilose) para a produção de energia.

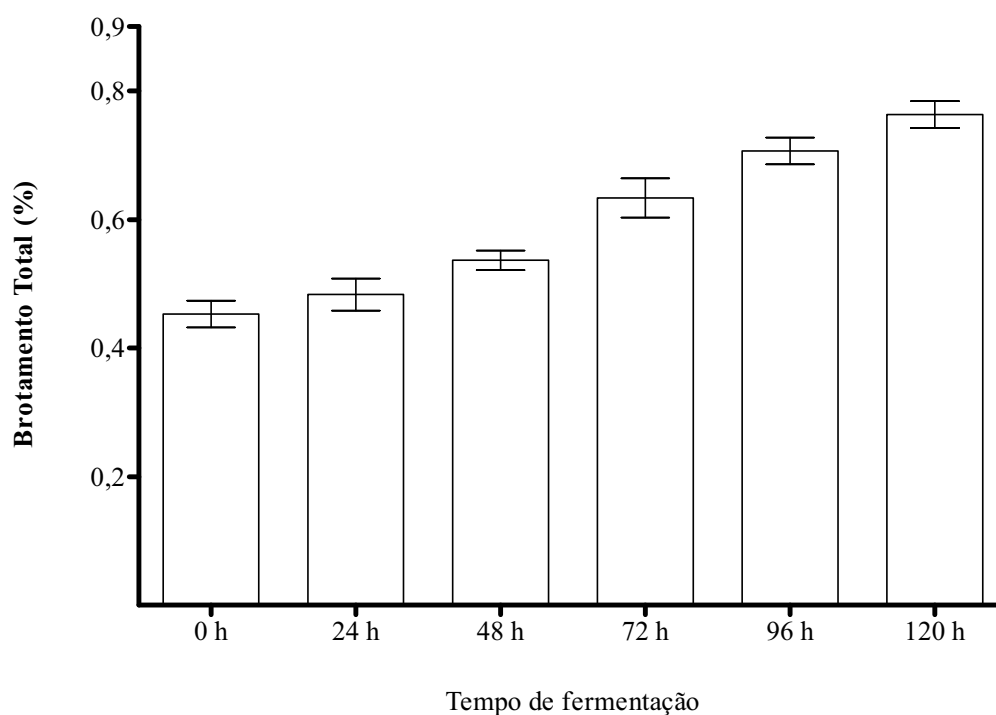


Figura 26 – Avaliação do brotamento total das células de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.

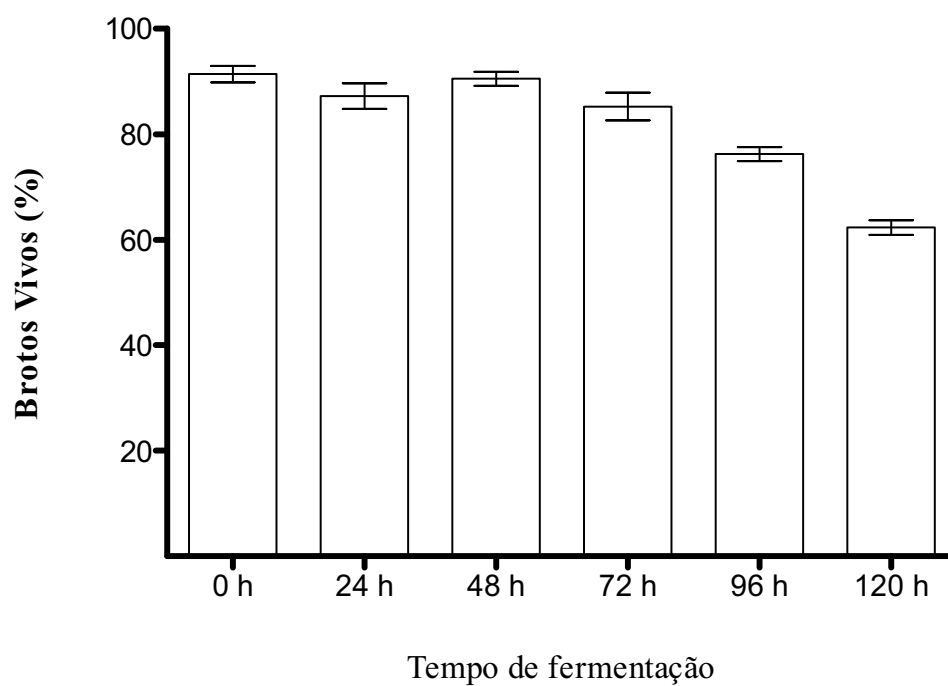


Figura 27 – Avaliação do número de brotos mortos em relação aos brotos vivos de *Pachysolen tannophilus* nos diferentes tempos de fermentação do mosto de xilose obtido da pré-hidrólise do bagaço da cana.

5.3.6. Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e HMF encontradas no mosto de xilose não eram tóxicos às células devido à neutralização, clarificação e filtração do pré-hidrolisado com CaO e pó de carvão ativado. A diminuição dos inibidores na amostra do mosto de 120 horas de fermentação em relação ao mosto de 0 horas de fermentação se deve a absorção destes compostos pelas células do fermento. De acordo com a literatura a concentração dos inibidores não é tóxica, sendo assim, a fermentação continuou normalmente.

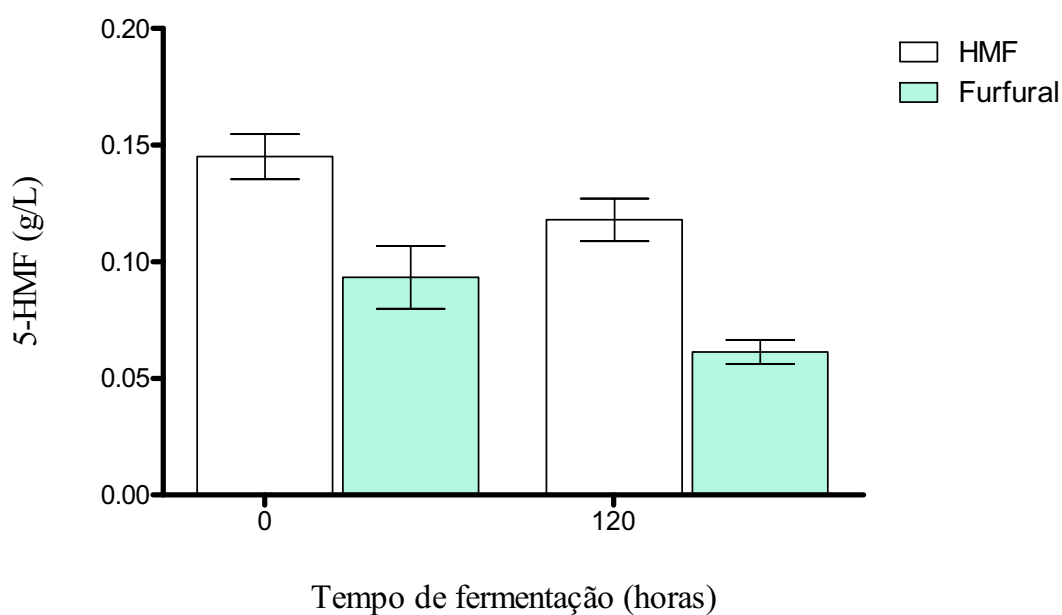


Figura 28 - Avaliação da concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) no mosto de xilose nos tempos 0 hora e 120 horas de fermentação alcoólica por *Pachysolen tannophilus*.

6. CONCLUSÕES

1. A pré-hidrólise ácida do bagaço da cana a 5 e 1,0% de H_2SO_4 , solvente organosolv, 121° a 1 atm e 60 minutos de tempo de reação é suficiente para tornar o bagaço parcialmente hidrolisado. Nestas condições foi obtida uma acentuada deslignificação (61,11%) e extração de açúcares redutores, predominantemente xilose, com relativamente baixa produção de inibidores da fermentação (furfural e HMF). A proporção do solvente organosolv utilizado para o pré-tratamento (1 acetona+1 etanol: 2 água) é eficaz na deslignificação, chegando a extrair 67,47% da lignina a $120^\circ C$ de temperatura e 2,0% de H_2SO_4 , resultando em 55% de biomassa pré-hidrolisada e 70% de extração de xilose da porção de hemicelulose.

2. A hidrólise ácida da celulose do bagaço pré-hidrolisado é mais difícil que a da pré-hidrólise, necessitando cerca de 10 vezes mais volume ácido por tempo 2,5 vezes superior para a extração expressiva de açúcares hexoses. Isto sugere que a pré-hidrólise ácida pode ser utilizada para uma posterior hidrólise enzimática, no entanto deve-se evitar a hidrólise ácida do bagaço pré-hidrolisado, tendo em vista a elevada concentração de ácido necessária e o por tempo prolongado, o que leva a produção de grande quantidade de furfural e outros inibidores da fermentação alcoólica.

3. O tratamento de clarificação e neutralização da fração solúvel de açúcares obtida da pré-hidrólise com CaO e carvão ativado é eficiente na retirada de HMF e furfural e reduz significativamente a concentração destes compostos no concentrado quando comparados com a concentração destes no pré-hidrolisado.

4. Produziu-se um caldo rico predominantemente em xilose (80g/L) utilizando o pré-tratamento ácido a partir de 500g de bagaço seco.

5. A fermentação do mosto de xilose por *P. tannophilus* nas condições utilizadas não é eficaz, pois apresenta produtividade e rendimento alcoólico inferiores à fermentação tradicional da sacarose por *S. cerevisiae*. No entanto, novos estudos devem ser realizados a fim de se encontrar opções mais viáveis de aproveitamento do caldo enriquecido em xilose obtido neste trabalho, ressaltando-se produtos de maior valor agregado que o etanol, contendo xilose em sua composição.

7. LITERATURA CITADA

ABUD, C.L. Avaliação de uma população de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química. UNESP, Araraquara/SP-Brasil, 1997.

ALMEIDA, J.R. Álcool e destilaria. **Mineogr.**, v. 5, p. 55-85. 1940.

ALMEIDA, A. Produção de Proteína Microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. 1991.

ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. **Tese de Doutorado**. ESALQ, Piracicaba/SP-Brasil, 1994.

AOAC - Official Methods of Analysis. 12º Ed. Washington, D.C., **Association of Official Analytical Chemists**, 1975.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v. 3, n. 1, p. 42-49. 1984.

ASADA, C.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F. Chemical Characteristics and Ethanol Fermentation of the Cellulose Component in Autohydrolyzed Bagasse. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.10, n. 4, p. 346-352. 2005.

BARNETT, J. A.; PAYNE R.W.; YARROW D. A guide to identifying and classifying yeasts. **Cambridge University Press**, Cambridge, England. 1979.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. **Microbiology Biotechnology**, v.21, p. 83-88, 2005.

BAILEY, J. E.; OLLIS D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2 ed., USA, McGraw-Hill. 1986.

BERGIUS, F. Notes on the Bergius- Rheinau process for the hydrolysis of wood. **Chimica nell' ndustria, nell'Agricoltura, nella Biologia e nelle Realizzazioni Corporative**, v.15, p.186-94. 1939.

BERTHELOT, CH. The hydrolysis of cellulose materials. Present state and future prospects. **Chem. Zentr. II**, p. 1059. 1943.

BONFÁ, M. R. L.; XAVIER-SANTOS, S.; CARVALHO, C. C.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Produção de Ligninases por Fungos de Degradação Branca em Resíduos Agroindustriais. **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada. Sinaferm**, 2003.

BONOMI, A. Termo de Referência - Workshop de Hidrólise de Bagaço e Palha de Cana para Produção de Etanol, **IPT**, SP, 14/12, 2006.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **Álcool e açúcar**, v.3, n.9, p.10-13. 1983.

CALSAVARA, L. P. V. Caracterização da Enzima Celobiase com Modelagem da Cinética de Hidrólise da Celobiose. **Dissertação de Mestrado**, UEM, Maringá/PR-Brasil, 1998.

CANTARELLA, M., GALLIFUOCO, A., SCARDI., V., ALFANI, F. Enzyme Stability and Glucose Inhibition in Cellulose Saccharification, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 434, pp. 39-43. 1984.

CAMPANA FILHO, S. P.; FROLLINI, E.; CURVELO, A. A. S. Organosolv delignification of lignocellulosic materials: preparation and characterization of lignin and cellulose derivatives. **Lignocellulosic-Plastics Composites**, 1st, p. 163-180, 1997.

CHAMY, R.; ILLANES, A.; AROCA, G.; NUNES, I. Acid Hydrolysis of Sugar beet Pulp as Pretreatment for Fermentation. **Bioresource Technology**, n. 50, p. 149, 1994.

CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A. Evaluation of Pretreatment of Biomass of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Solar Energy Research Institute Technical Library**, 1985.

CYSEWSKI, G.R.; WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1421-1430, 1978.

COREY, A. J.; MOORE, T. R. The saccharification of wood for ethanol production. **Pulp & Paper Magazine of Canada**, n. 45, p. 167-70, 1944.

CURVELO, A. A. S.; PEREIRA, R. Kinetics of ethanol-water delignification of sugar cane bagasse. **International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, 8th, Helsinki**, n. 2, p. 473-478. 1995.

CUZENS, JOHN C.; MILLER, JAMES R. Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, n. 10, p. 285-290. 1997.

DA ROSA, M. R.; DA SILVA CURVELO, A. A. 1997. Organosolv delignification of wheat straw. **Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Proceedings**, 5th, Curitiba, n. 6, p. 224-231. 1997.

DEBUS, D.; METHNER H.;SCHULZE D.; DELLWEG H. Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**. v. 17, p. 287-291, 1983.

DEHAAS, G. G.; LANG, C. J. Delignification with ketones and ammonia. **Tappi**, v. 5, n. 57, p. 127-30. 1974.

DEKKER, R. F. H. Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letter**. v. 4, p. 411-416. 1982.

DELGENES, J.P., MOLETTA, R., NAVARRO, J.M. Effects of lignocelluloses degradation Products on ethanol fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.19, p.220-225. 1996.

DI LUCCIO, M.; SMITH, B. D.; KIDA, T.; BORGES, C. P. E ALVES, T. L. M. Separation of fructose from a mixture of sugars using supported liquid membranes. **Journal of membrane science**, v.174, n.2, p.217-224, 2000.

DOMINGUEZ, J.M.; GONG, C.S. AND TSAO, G.T. Pretreatment of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolyzate for Xylitol Production by Yeast. **Applied Biochemical Biotechnology**, n. 57/58, p. 49. 1996.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). W. J. **Microbiology Biotechnology**, v.22, p.177-182, 2006.

DUARTE, H. C. Hidrólise de Bagaço de Cana com Ácido Clorídrico Concentrado. **Tese de Doutorado**. IQ, UNICAMP, Campinas, Brasil. Biblioteca Central, 1989.

DUARTE, M.C.T. *Pachysolen tannophilus*: Otimização da produção de biomassa e etanol. **Dissertação de mestrado**. UNESP, Rio Claro/SP-Brasil, 1987.

EBERTS, T.J.; SAMPLE, R.H.; GLICK, M.R.; ELLIS, G.H. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol. **Clinical Chemistry**, v.25, p.1440-1443, 1979.

ELANDER, R.; HSU, T. Processing and Economic Impacts of Biomass Delignification for Ethanol Production. **Applied Biochemical Biotechnology**, n. 51/52, p. 463, 1995.

EVTYUGIN, D. V.; DEINEKO, I. P. 1994. Low-molecular weight reaction products from oxygen- acetone delignification of wood. **Koksnes Kimija**, n. 3, p. 46-52, 1994.

FANTA, G.F.; ABBOTT, T.P.; HERMAN, A.I.; BURR, R.C. AND DOANE, W.M. Hydrolysis of Wheat Straw Hemicellulose with Trifluoroacetic Acid: Fermentation of Xylose with *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Bioengineering**, n. 26, p. 1122, 1984.

FERNANDES, P. H. S. Sacarificação enzimática de materiais celulósicos em dióxido de carbono supercrítico. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.120. 1998.

FERNANDEZ, J.; ACUNA, L.; VILLAR, J. C. Delignification of bagasse in forced-recirculation digesters. **Investigacion y Tecnica del Papel**, v; 32, n. 126, p. 772-84. 1995.

FERRARI, M.D.; NEIROTTI E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol Production from Eucalyptus Wood Hemicellulose Hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.753-769, 1992.

FINGUERUT, J. Workshop de Hidrólise de Bagaço e Palha de cana para produção de Etanol, IPT, SP, 14 de dezembro, 2006.

FOUAD, B.; JOVER, J.; GONZALEZ, E. Hydrolysis of bagasse with sulfuric acid in obtaining bioethanol. **Ingenieria Quimica**, v. 37, n. 425, p. 240-248. 2005.

FOGEL, R. Otimização da hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e utilização do hidrolisado na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. **Dissertação de Mestrado**. UFRJ, Rio de Janeiro/RJ-Brasil, 2004.

GHOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolyzate I. Batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n.8, p. 1387-400. 1979.

GHOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolyzate II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, n. 8, p. 1401-20. 1979.

HAGGLUND, E. Recent developments in the H.övrddot.agglund-Bergius wood saccharification process (the Rheinau process). **Teknisk Tidskrift**, n. 63, p. 65-72. 1933.

HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 28-29, p.131-44. 1994.

HARRIS, E. E.; BEGLINGER, E. Madison wood-sugar process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 38, 890-5. 1946.

HILST, A. G. P. Processo de hidrólise ácida rápida de material lignocelulósico e reator de hidrólise. **Patente PI 9600672-2 A, INPI**. 1997.

IMAI, M. IKARI, K. SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 79-83, 2004.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology**. v. 27, p. 1-32. 1983.

JEFFRIES, T.W.; FADYAND, J.H.; LIGHTFOOT, E.N. Effect of Glucose Supplements on the Fermentation of Xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.XXVII, p. 171-176. 1985.

JOHNSON, S.L.; BLISS, M.; MAYERSOHN, M.; CONRAD. K.A. Phloroglucinol-based colorimetry of xylose in plasma and urine compared with a specific gas-chromatographic procedure. **Clinical Chemistry**. v.30, p.1571-1574. 1984.

JORGENSEN, H; MORKEBERG, A.; KROGH, K.B.R.; OLSSON, L. Production of Cellulase and hemicellulase by three *Penicillium* species: effect of substrates and evaluation of cellulase adsorption by capillary electroforesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v 36, p. 42-48, 2005.

KIM, J.S.H., SUK I.; LEE, Y.Y. Bed-shrinking flow-through reactor in dilute acid hydrolysis of cane bagasse cellulose. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 432-436, 2002.

KINDSIGO, M.; KALLAS, J. Degradation of lignins by wet oxidation: model water solutions. **Estonian Academy Science Chemical**, v.3, n. 55, p.132–144. 2006.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces sp.* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology Bioengineering**, v.37, p. 528-536, 1990.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, USA**, 2001.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 367-380. 2002.

LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 24, p. 2601-2604, 1982.

LEE, H.; JAMES, A. P.; ZAHAB, D.M.; MAHMOURIDES, G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER R. Mutants of *Pachysolen tannophilus* with Improved Production of Ethanol from D-Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1252-1258. 1986.

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Editora Savier, 1984.

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica – Componentes Moleculares das Células*. São Paulo: Editora Edgard Blücher. 1976.

LUO, C.; BRINK, D. L. E.; BLANCH, H. E. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolysate to ethanol. **Biomass and bioenergy**, v.22, n.2, p.125-138, 2002.

MACEDO, I. Avanços científicos em biotecnologia podem estimular indústria alcoolquímica. **Alcoolbrás**, v. VIII, n. 103, p. 48-50. 2006.

MACHADO, G.O. Preparação e caracterização de CMC e CMC grafitizada. **Dissertação de Mestrado** – Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos/SP-Brasil, 2000.

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

MALESZKA, R., SCHNEIDER R. H. Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on D-xylose. **Applied Environmental Microbiology** v. 44, p. 909-912, 1992.

MCKRACKEN L. D; GONG C. S. D-Xylose metabolism by mutant strains of *Candida sp.* **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology**, n. 27, p. 33-55. 1983.

MARTIN, C. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n. 3, p. 274-282. 2002.

MARTINS, L.F. Caracterização do complexo celulásico de *P. Echinulatum*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR-Brasil, p.119. 2005.

MARTIN, C. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology and Biotechnolog**, v.81, p.1669–1677, 2006.

MARTON J.M.; FELIPE M.G.A.; SILVA J.B.A.; PESSOA JR A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, v. 3, p.45-53, 2003.

MATOS, Z. R. Avaliação das condições de hidrólise ácida na fermentação de xilose em xilitol. **Dissertação de Mestrado**. Faenquil. Lorena/SP-Brasil, 2001.

MENDONÇA, R.M.T. A biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelos fungos *Punctularia artropurpurascens* e *Wolfiporia cocos* como um pré-tratamento para o processo de deslignificação. **Organosolv-masat**, 1997.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatmentof lignocellulosic biomass. Laboratory of Renewable Resources Engineering. **Bioresource Technology**, v.96, p.673–686. 2005.

MOZHEIKO, L. N.; SERGEEVA, V. N. Comparison of sulfuric acid-treated lignins obtained by the Riga hydrolysis method under various condition. **Kimijas Serija**, n. 2, p. 231-5. 1967.

MOZHEIKO, L.N.; SERGEEVA, V.N.; JAUNZEMS, V. Nature of a unhydrolyzed by sulfuric acid of slightly putrified peat obtained under conditions of hydrolysis by the Riga method. **Khimiya Drevesiny**, n. 1, p. 87-92. 1968.

MUURINEN, E. Organosolv pulping, a review and distillation study related to peroxyacid pulping. **Department of Process Engineering, University of Oulu**, Finland, 2000.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.94-100. 2004.

NADA, A.M.A.; FAHMY, Y.; ABO-YOUSEF, H.E. Kinetic study of delignification of bagasse with butanol-water organosolv pulping process. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.57, n.8, p.471-476. 1998.

NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; OLIVA J. M.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameter of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment . **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 301-308, 2003.

NEIRINCK L.; R. MALESZKA R.; SCHNEIDER H. The requirement of oxygen for incorporation of carbon from D-xylose and D-glucose by *Pachysolen tannophilus*. **Archive of Biochemical Biophysics**, v.22, p. 13-21. 1984.

NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p.375-380. 1944.

OCHA, G.J.M. Deslignificação do bagaço de cana assistida por oxigênio. **Tese de Doutorado**. USP, São Carlos/SP-Brasil, v.1, p.136. 2000.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.697-699. 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. **Tese de Doutorado**, UNICAMP-Campinas/SP, p.183, 1995.

OLIVERIO, J.L.; HILST, A.G.P. DHR - Dedini Hidrólise Rápida (Dedini Rapid Hydrolysis) - revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p.168-172, 2004.

PALOMEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Tricoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

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, n.1, p.25-40, 1998.

PARAZZI, C. Fermentação alcoólica com leveduras flocculantes. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". Rio Claro/SP-Brasil, 164p, 1995.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and *Pinus taeda* wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v.36, n.1, p.31-39. 2005.

PATEL, D. P.; VARSHNEY, A. K. The effect of presoaking and prehydrolysis in the organosolv delignification of bagasse. **Indian Journal of Technology**, v.27, n.6, p. 285-288, 1989.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S.; Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Department of Biotechnology /FAENQUIL**, Lorena/SP, Brazil. 1997.

PLANES, R. L. Kinetic study of the prehydrolysis of bagasse with diluted acids. **Revista CENIC, Ciencias Fisicas**, v.5, n.2, p.153-167. 1974.

PURCHASE, B. S.; WALFORD, S. N.; WAUGH, E. J. An update on progress in the production of ethanol from bagasse. **Proceedings of the Annual Congress - South African Sugar Technologists' Association**, v. 60, p. 33-36, 1986.

RABBANI, M. M. Acid hydrolysis processes for cellulosic biomass. **Ingenieria Quimica**, v.21, n.245, p.139-146. 1989.

RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F.; MCMILLAN, J. D. E WOOLEY, R. J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and microbial technology**, v.27, n.3-5, p.240-247, 2000.

ROCHA, G. J. M. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. São Carlos: IQSC/USP, **Tese de Doutorado**, 2000.

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

ROSSEL, C.E.V.; et. al. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. **International Sugar Journal**, v.107, n.1275, p. 192-195. 2005.

ROSSEL, C.E.V. Workshop de Hidrólise de Bagaço e Palha de cana para Produção de Etanol. **IPT**, SP, 14 de dezembro. 2006.

SANO, Y.; SASAYA, T. Studies on phenorganosolv pulping. I. Delignification of woods by modified organosolv pulping. **Mokuzai Gakkaishi**, v.31, n.10, p.836-42. 1985.

SCHNEIDER, H.; MAHMOURIDES, G.J; LABELLE, L.; LEE H.; MAKI N.; MCNEILL H.J. Correlation between limitation of growth of *Pachysolen tannophilus* on D-xylose with the formation of ethanol and other products. **Biotechnology Letter**, v.7, p.361-364. 1985.

SCHNEIDER, H.; WANG P.Y.; CHANY.K.; MALESZKA R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letter**, v.3, p.89-92. 1981.

SCHNEIDER, H.; MALESZKA R.; NEIRINCK L.; VELIKY I.A.; WANG P;Y.; CHANG Y.K. Ethanol production from D-xylose and several other carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and other yeasts. **Advanced Biochemical Engineering Biotechnology**. v.27, p.57-71. 1983.

SCHUCHARDT, U.; JOEKES, I.; DUARTE, H. C. Hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid: separation of the acid by pervaporation. Evaluation of the Bergius process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.41, n.1, p.51-60. 1988.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v.24, n.2, p.247-251. 2001.

SHIMIZU, Y.; HUKUMORI, Y. 1995. TAKAI, M.; HAYASHI, J. A basic research on enzymic saccharification of cellulosic biomass (II). Pretreatment of bagasse by alkali-oxygen. **Sen'i Gakkaishi**, v.40, n.9, p.359-364, 1984.

SILVA, J.B.A. Utilization of the Hydrolysate of Eucalyptus Hemicellulose for Production of Microbial Protein. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, n. 38, p. 147, 1995.

SILVA, F.T. Obtenção de Insumos Químicos a partir do Aproveitamento Integral do Bagaço de Cana. **Tese de Doutorado**. IQ, UNICAMP, Campinas, Brasil, 1995.

SLININGER, P. J.; BOTHAST R.J.; VAN CAUWENBERGE J.E.; KURTZMAN C.P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Bioengineering**, v.24, p.371-384, 1982.

SODERSTROM, J. PILCHER, L. GALBE, ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, p. 475-486, 2003.

SOUSA, M.F.B.; SCHUCHARDT, U.; RODRIGUES, J.A.R. Separation and identification of sugarcane bagasse compounds by “Organosolv” process. **Ciência e Cultura**, v.38, n.1, p.181-8. 1986.

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

TAHERZARDEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based ethanol. **BioResources**, v.2, n.4, p.707-738, 2007.

TAKAHASHI, D. F. Produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar empregando *Escherichia coli* recombinante. **Tese de Doutorado**, USP, São Paulo, Brasil, 1997.

THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B.; SCHMIDT, A. S. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.606–615. 2003.

VERDE, M. V. Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena/SP-Brasil, 1999.

VILLAR, J. Effect of an acid catalyst on prehydrolysis of sugarcane bagasse, leaf trash and pith at low liquid/solid ratios. Cuba. **Revista sobre los Derivados de la Cana de Azucar**. v.18, n.1, p.61-65. 1984.

YOKOYA, F. OLIVA-NETO, P. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.6, p.38-39. 1991.

WENZL, H. F.J. Chemistry and technology of acid wood hydrolysis. II. Technical processes used in wood hydrolysis. **Holzforschung**, n. 8, p. 103-16, 1954.

WINKLER, M.A. Genetically-Engineered Proteins and Enzymes from Yeast: Production Control, Ed. Wiseman, A., Ellis Horwood, pp. 96-146, 1991.

WINKLER, M.A. HandBook of Enzyme Biotechnology, Ed. Wiseman, A. Ellis Horwood, p. 9-30, 1995.

ZHENG, Y. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v.14 n. 6, p.890-896, 1998.