

CHRISTIANE REIS FONSECA

Uso combinado de processos de separação visando a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientador:
Prof. Dr. Luís Fernando Figueiredo Faria

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
Janeiro, 2012

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

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

Fonseca, Christiane Reis

Uso combinado de processos de separação visando a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico. / Christiane Reis Fonseca. –ed. reimpr., corr.– 2012. 149 p: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.

Orientador: Luís Fernando Figueiredo Faria.

1. D-Xilose 2. Hidrolisado hemicelulósico 3. Membranas de separação 4. Bagaço de cana-de-açúcar 5. Resinas de troca iônica. I. Título.

547.455.526 – CDU

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Camila e Ruy, e ao meu irmão, Renan, por me ajudarem nesta conquista e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder paz, saúde e paciência para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Fernando Figueiredo Faria pela orientação, confiança e amizade que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À Prof.^a Dr.^a Inês Roberto, do departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – USP, por disponibilizar seu laboratório para realização dos testes fermentativos.

Aos meus pais, Camila e Ruy, ao meu irmão Renan e minha cunhada Júlia, por todo o apoio, paciência e incentivo. Sem vocês essa caminhada com certeza teria sido muito mais difícil. Agradeço pelos conselhos, conversas e paciência quando a minha já estava esgotada.

Ao meu namorado, Eder, por todo o amor, por sempre acreditar no meu potencial e por me encorajar a conquistar meus objetivos.

Aos meus amigos de laboratório: Leonardo, Tamires, Katia, Aline, Thiago, Guilherme, Larissa e Paulo. Obrigada pela amizade e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos da Prof.^a Dr.^a Inês Roberto que me receberam com extrema cordialidade tanto no laboratório como no congresso em que fomos juntos, em especial à Daniela Cortez que com muita paciência me ajudou a realizar os ensaios fermentativos.

À minha amiga Ester. Obrigada pelas conversas, risadas e ansiedades compartilhadas. A sua presença tornou o dia a dia de trabalho muito mais prazeroso.

Às minhas amigas Karen e Noêmia. Agradeço por poder contar com vocês em todos os momentos e pela amizade sincera e verdadeira que vocês sempre demonstraram ter por mim mesmo à distância.

Aos meus amigos Katia e Thiago por disponibilizarem sua casa para que eu terminasse com maior tranquilidade este trabalho. Obrigada por sempre me apoiarem.

À minha companheira de república Thaís pela companhia e amizade.

A todos os colegas da Escola de Engenharia de Lorena que sempre foram cordiais e que sempre tornaram minha estada na universidade mais agradável.

A todos que torceram e me ajudaram a conquistar este objetivo.

Ao departamento de Engenharia Química pela oportunidade de realização deste mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

"...E nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro."

Albert Einstein

RESUMO

FONSECA, C. F. **Uso combinado de processos de separação visando a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico.** 149p. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

A presença de compostos inibidores ao metabolismo de microrganismos é a principal dificuldade encontrada para utilização dos hidrolisados hemicelulósicos para produção de etanol e xilitol. Compostos derivados das degradações da lignina, da celulose e hemicelulose são liberados durante a hidrólise ácida da biomassa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de diferentes tratamentos de destoxificação de forma combinada, visando a purificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol e xilitol. Os tratamentos utilizados foram: coagulação/floculação de impurezas coloidais, separação por membranas de microfiltração e ultrafiltração e resinas de troca iônica, sendo o material de partida foi um hidrolisado de bagaço recém-obtido. O tratamento de coagulação/floculação foi otimizado utilizando planejamento de experimentos do tipo fatorial e na melhor condição promoveu reduções de 53,3% em compostos fenólicos, 34,8% de furfural, 3,7% de HMF, 4,2% de ácido acético e 67,6% da área espectral. Na sequência, o hidrolisado tratado na etapa anterior foi submetido a testes de microfiltração e ultrafiltração. Para esta etapa os melhores resultados foram obtidos utilizando membranas de 100 kDa em polietersulfona. Com este tratamento foi possível reduzir em 11,9% os compostos fenólicos, 23,8% de furfural, 21,5% de HMF e 21,4% de área espectral. Após o tratamento com membranas o hidrolisado foi percolado em resinas de caráter catiônico e aniônico utilizadas em série possibilitando a eliminação de 34,8% de compostos fenólicos, 38,5% de furfural, 74,7% de HMF, 55% de ácido acético e 10,3% da área espectral. Ao final, a combinação de todas as tecnologias de separação estudadas possibilitou remoções maiores que 97% para compostos fenólicos, furfural e HMF o que resultou numa redução da área espectral em 99,3%. O hidrolisado purificado foi concentrado e submetido a testes fermentativos preliminares para produção de etanol e xilitol. Estas bioconversões apresentaram rendimentos de 0,58 g/g em xilitol e 0,29 g/g em etanol por D-xilose consumida, que equivalem a 86% e 83% dos rendimentos obtidos a partir dos meios sintéticos, respectivamente. Estes resultados indicaram que a purificação obtida através do uso combinado da coagulação/floculação, separação por membranas e resinas de troca iônica foram bastante satisfatórios principalmente considerando a fermentabilidade obtida a partir deste substrato em comparação ao meio sintético.

Palavras chave: D-xilose. Hidrolisado hemicelulósico. Membranas de separação. Bagaço de cana-de-açúcar. Resinas de troca iônica.

ABSTRACT

FONSECA, C. F. **Combined use of separation aimed at detoxification of hemicellulosic hydrolyzate.** 149p. 2011. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena- Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

The presence of inhibitory compounds in the metabolism of microorganisms is the main difficulty for the use of hemicellulosic hydrolyzate for ethanol and xylitol production. Compounds derived from lignin, cellulose and hemicellulose degradation are released during the biomass acid hydrolysis. This study aimed to evaluate the use of different detoxification treatments in combination, aimed at purifying the hydrolyzed hemicellulosic sugarcane bagasse. The treatments were: coagulation / flocculation of colloidal impurities, separation by microfiltration and ultrafiltration membrane and ion exchange resins, and the starting material was a newly obtained hydrolyzed bagasse. The treatment of coagulation / flocculation was optimized using factorial experiments design of the kind that in the best condition promoted reductions of 53.3%, 34.8%, 3.7%, 4.2% and 67.6% in phenolic compounds, furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid and spectral area, respectively. Next, the hydrolyzate treated in the previous step was tested for microfiltration and ultrafiltration. For this step the best results were obtained using a 100 kDa membrane in polyethersulfone. With this treatment were obtained reduction of 11.9%, 23.8%, 21.5%, 21.4% in phenolic compounds, furfural, hydroxymethylfurfural and spectral area, respectively. After membrane treatment the hydrolyzate was percolated through resins with anionic and cationic character used in series enabling the elimination of 34.8%, 38.5%, 74.7%, 55% and 10.3% of phenolic compounds, furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid and spectral area, respectively. At the end, the combination of all separation technologies studied was able to remove greater than 97% of phenolic compounds, furfural and hydroxymethylfurfural which resulted in a reduction of 99.3% in spectral area. The purified hydrolyzate was concentrated and subjected to preliminary fermentative testing for the ethanol and xylitol production. These bioconversions had income of 0.58 g/g in xylitol and 0.29 g/g in ethanol by D-xylose consumed, equivalent to 86% and 83% of ethanol and xylitol yield obtained from the synthetic medium, respectively. These results indicated that the purification achieved through the combined use of coagulation/flocculation, membrane separation and ion exchange resins were very satisfactory, especially considering the fermentability obtained from this substrate compared to the synthetic medium.

Keywords: Xylose. Hemicellulosic hydrolyzate. Membranes separation. Sugarcane Bagasse. Ion exchange resins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formação das cadeias de celulose pela união das moléculas de D-glicose.	27
Figura 2 – Açúcares constituintes das hemiceluloses.	28
Figura 3- Modelo de estrutura de Lignina	29
Figura 4- Precursores da lignina.	30
Figura 5- Esquema do processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar	32
Figura 6- Modelo Molecular do Etanol (C ₂ H ₅ OH).....	33
Figura 7– Evolução da produção brasileira de etanol.....	36
Figura 8– Modelo molecular do xilitol (C ₅ H ₁₂ O ₅).....	36
Figura 9– Estrutura molecular da Quitosana	50
Figura 10 – Fórmulas estruturais do tanino..	51
Figura 11 – Comparação entre os processos de separação	53
Figura 12– Diagrama esquemático de um processo de separação de misturas utilizando membranas.	53
Figura 13– Diferentes morfologias de membranas sintéticas.....	55
Figura 14 – Modos operacionais em membranas:	58
Figura 15– Estrutura superficial e interna de uma resina aniônica.	62
Figura 16- Reator piloto utilizado para a obtenção do hidrolisado.....	67
Figura 17– Processo de separação por membranas a serem utilizados.....	70
Figura 18 – Sistema de permeação por membranas utilizado e respectivo módulo de membranas.	70
Figura 19– Diagrama de Pareto em função dos efeitos das concentrações de compostos fenólicos para o planejamento fatorial fracionado.....	85
Figura 20– Diagrama de Pareto em função dos efeitos para área espectral para o planejamento fatorial fracionado.	86
Figura 21– Efeitos principais em função das concentrações de compostos fenólicos para o planejamento fatorial fracionado.....	89
Figura 22– Efeitos principais em função da área espectral para o planejamento fatorial fracionado.....	89
Figura 23 - Superfície de resposta para variável compostos fenólicos em função do teor de quitosana e pH a partir do DCCR.	94

Figura 24- Curvas de contorno para compostos fenólicos em função do teor de quitosana e pH.....	94
Figura 25- Superfícies de resposta para a variável compostos fenólicos do teor de PAC em relação ao pH a partir do DCCR.....	95
Figura 26 - Curvas de contorno para compostos fenólicos em função do teor de PAC e do pH.	95
Figura 27- Superfície de resposta para variável compostos fenólicos a partir do DCCR.....	96
Figura 28- Curvas de contorno para os compostos fenólicos em função do teor dos coagulantes.	97
Figura 29 – Permeabilidade hidráulica e do hidrolisado em membranas de microfiltração.	99
Figura 30 – Permeabilidade hidráulica e do hidrolisado na membrana da ultrafiltração.	101
Figura 31 – Aspecto Visual do hidrolisado original e dos tratamentos realizados.	102
Figura 32-Variação do fluxo do permeado no processo de ultrafiltração.	103
Figura 33 – Variação da condutividade e do pH para resina R1(catiônica forte) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.	107
Figura 34 – Variação da condutividade e do pH para a resina R2(aniônica forte) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.	108
Figura 35 – Variação da condutividade e do pH para resina R3 (catiônica fraca)durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.	109
Figura 36 – Variação da condutividade e do pH para resina R4 (aniônica fraca)durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.	110
Figura 37- Redução relativa de compostos fenólicos ao longo do tratamento por resinas.....	113
Figura 38-Redução relativa do furfural ao longo do tratamento por resinas.	113
Figura 39- Redução relativa do HMF ao longo do tratamento por resinas.	114
Figura 40 – Redução relativa do ácido acético ao longo do tratamento por resinas.....	116
Figura 41 – Redução do indicativo de cor nos processos de purificação.	117
Figura 42 – Análise visual dos hidrolisados percolados por resina.	117
Figura 43- Concentração de cátions presentes em cada etapa de purificação por resinas.....	119
Figura 44 - Concentração de ânion presentes em cada etapa de purificação por resinas.....	121

Figura 45 – Remoção dos compostos inibidores e da área espectral em cada etapa da purificação.	123
Figura 46 – Variação da concentração de cátions durante os processos de purificação do hidrolisado.	124
Figura 47- Variação da concentração de ânions durante os processos de purificação do hidrolisado.	125
Figura 48 - Comparação entre o hidrolisado original e o hidrolisado final purificado.	125
Figura 49 – Consumo de D-xilose, formação de xilitol e crescimento de células em função do tempo em meio sintético.	127
Figura 50 – Consumo de D-xilose e ácido acético, formação de xilitol e crescimento de células em função do tempo em hidrolisado suplementado.	127
Figura 51 – Consumo de D-xilose, formação de etanol e crescimento de células em função do tempo em meio sintético.	131
Figura 52 – Consumo de D-xilose e ácido acético, formação de etanol e crescimento de células em função do tempo em hidrolisado suplementado.	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos	26
Tabela 2 – Produção de cana-de-açúcar no Brasil.....	30
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do xilitol.....	38
Tabela 4 – Diferentes tipos de processos de separação por membranas.....	57
Tabela 5 – Classificação de Resinas de troca iônica	60
Tabela 6–Variáveis de controle do Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	68
Tabela 7– Variáveis do segundo planejamento experimental (DCCR).....	68
Tabela 8 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}	69
Tabela 9– Matriz experimental do Delineamento Composto Central Rotacional	69
Tabela 10- Soluções utilizadas para regeneração das resinas de troca iônica.....	73
Tabela 11– Composição do bagaço de cana-de-açúcar.....	81
Tabela 12- Composição e características físicas do hidrolisado hemicelulósico original	82
Tabela 13– Condições experimentais do planejamento fatorial fracionado e teor de compostos fenólicos e área espectral.....	85
Tabela 14– Determinação dos valores de t e do p-valor de cada termo para a resposta teor de compostos fenólicos no primeiro tratamento estatístico.....	86
Tabela 15– Determinação dos valores de t e do p-valor de cada termo para a resposta área espectral no primeiro tratamento estatístico.....	87
Tabela 16– Condições experimentais segundo tratamento estatístico e teor de compostos fenólicos e área espectral ao final de cada tratamento.....	91
Tabela 17– Determinação dos valores de t e do p-valor de cada termo para a resposta teor de compostos fenólicos no segundo tratamento estatístico.....	92
Tabela 18- Determinação dos valores de t e do p-valor de cada termo para a resposta área espectral no segundo tratamento estatístico.....	92
Tabela 19-ANOVA para variável de resposta Compostos Fenólicos.....	93
Tabela 20-ANOVA para variável resposta Área Espectral.....	93
Tabela 21 – Características do hidrolisado tratado por coagulação/floculação escala ampliada.....	98

Tabela 22– Características do hidrolisado após permeação em membranas de micro e ultrafiltração.	101
Tabela 23 – Características das Resinas de Troca Iônica.	105
Tabela 24 – Características dos hidrolisados ao final de cada etapa de purificação por resinas a partir do hidrolisado ultrafiltrado.	111
Tabela 25 – Concentrações dos íons analisados durante processos por resinas.	118
Tabela 26 – Parâmetros por cada etapa de purificação.	122
Tabela 27 – Hidrolisado concentrado três vezes.	126
Tabela 28 – Parâmetros fermentativos dos experimentos com meio sintético e hidrolisado purificado para obtenção de xilitol.	129
Tabela 29 – Parâmetros fermentativos dos experimentos com meio sintético e hidrolisado purificado para obtenção de etanol.	134

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
aw	Atividade de água
CaO	Óxido de cálcio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCCR	Delineamento central composto rotacional
DVB	divinilbenzeno
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HMF	Hidroximetilfurfural
HNO ₃	Ácido nítrico
MF	Microfiltração
NaOH	Hidróxido de Sódio
PAC	Policloreto de alumínio
PEI	polieterimida
PES	polietersulfona
PSM	Processos de separação por membranas
Qp	Produtividade volumétrica
UF	Ultrafiltração
VL	Volume de Leito
Y _{p/s}	Conversão de substrato em produto
Y _{P/X}	Conversão de células em Produto
Y _{X/s}	Conversão de substrato em células
η	Eficiência

SUMÁRIO

1	Introdução	23
2	Revisão Bibliográfica	25
2.1	Biomassa Lignocelulósica.....	25
2.1.1	Celulose.....	27
2.1.2	Hemicelulose	27
2.1.3	Lignina	29
2.2	O bagaço de cana-de-açúcar.....	30
2.3	Obtenção do etanol e xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico.....	31
2.4	Produtos de bioconversão: etanol e xilitol	33
2.4.1	Etanol	33
2.4.2	Xilitol	36
2.5	Inibidores do metabolismo microbiano.....	39
2.5.1	Compostos Fenólicos	40
2.5.2	Furfural e HMF	41
2.5.3	Ácido Acético.....	42
2.5.4	Íons metálicos.....	44
2.6	Métodos de tratamento do hidrolisado hemicelulósico.....	45
2.6.1	Ajuste de pH.....	46
2.6.2	Coagulação e Floculação de impurezas coloidais.....	47
2.6.3	Processos de separação por membranas.....	52
2.6.4	Resinas de troca iônica.....	59
3	Objetivos.....	64
3.1	Objetivo Geral.....	64
3.2	Objetivos Específicos.....	64
4	Material e Métodos	65
4.1	Materiais e Equipamentos	65
4.2	Obtenção do Hidrolisado hemicelulósico original.....	67
4.3	Coagulação/Floculação do hidrolisado hemicelulósico original.....	68
4.4	Tratamento do hidrolisado coagulado/floculado por Membranas	70
4.5	Caracterização das resinas de troca iônica	71
4.5.1	Determinação de Massa Específica.....	71

4.5.2	Determinação de massa específica úmida	71
4.5.3	Determinação do volume de inchamento	71
4.5.4	Determinação de umidade original.....	71
4.6	Tratamento com resinas de troca iônica	72
4.7	Concentração do hidrolisado purificado.....	74
4.8	Testes fermentativos do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar purificado	74
4.8.1	Microrganismos e preparo dos inóculos.....	74
4.8.2	Meios de Fermentação.....	75
4.9	Métodos Analíticos.....	75
4.9.1	Determinação do teor de carboidratos	75
4.9.2	Determinação do teor de furfural e HMF	76
4.9.3	Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.....	76
4.9.4	Determinação de lignina solúvel	77
4.9.5	Determinação do teor de cinzas.....	78
4.9.6	Determinação de íons	78
4.9.7	Determinação da área espectral	79
4.9.8	Determinação da concentração celular	79
4.9.9	Determinação dos parâmetros fermentativos	79
4.9.10	Determinação das permeabilidades hidráulica e do hidrolisado	80
5	Resultados e Discussão	81
5.1	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	81
5.2	Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico.....	82
5.3	Coagulação/Floculação Seletiva de impurezas coloidais	83
5.3.1	Planejamento experimental fatorial fracionado.....	84
5.3.2	Planejamento experimental do tipo DCCR	90
5.4	Processos de separação por membranas	98
5.5	Resinas de troca Iônica.....	104
5.5.1	Caracterização das Resinas de Troca Iônica	105
5.5.2	Variação do pH e condutividade para a série de resinas	106
5.5.3	Variação dos teores de carboidratos, dos compostos inibidores e da área espectral utilizando resinas.....	110
5.5.4	Variação da composição iônica do hidrolisado com o uso de resinas	118
5.6	Avaliação global dos Processos Combinados de Purificação	121

5.7	Testes Fermentativos.....	126
5.8	Bioconversão de D-xilose em xilitol por <i>Candida guilliermondii</i>	126
5.9	Bioconversão de D-xilose em etanol por <i>Pichia stipitis</i>	130
6	Conclusão.....	135
7	Sugestões para trabalhos futuros.....	137
	Referências.....	138

1 Introdução

O Brasil é um dos países agrícolas mais importantes do mundo. Entre os vários produtos estão o café, soja, mandioca, milho, frutas, cana-de-açúcar, etc., e este último, tem sido um dos mais produzidos nas últimas décadas (SOCCOL et al, 2010). Devido a esta grande produção existe uma crescente preocupação com a parcela subutilizada da cana-de-açúcar, ou seja, o bagaço.

Estudos comprovaram que o bagaço de cana-de-açúcar apresenta grande potencial de reaproveitamento devido a sua composição química (celulose, hemicelulose e lignina) uma vez que através de vários tratamentos químicos ou biológicos, é possível extrair pentoses e hexoses (MOSIER et al., 2005).

A alta proporção destas pentoses, principalmente a D-xilose, na fração hemicelulósica de vários resíduos, juntamente com sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção para utilização em processos de bioconversão. Pesquisas relacionadas com a obtenção de xilitol e etanol por via biotecnológica a partir de fontes lignocelulósicas têm sido intensificadas.

As elevações do preço do petróleo e o aumento da preocupação com questões do meio ambiente vêm estimulando a busca por alternativas. Desta maneira, as energias renováveis vêm ganhando grande espaço, pois possuem a capacidade de substituir, pelo menos em parte, os combustíveis fósseis além de serem menos poluentes. Entretanto, os biocombustíveis ainda possuem dificuldades de competir com o mercado de combustíveis fósseis, visto que os custos de produção destes ainda são baixos e já possuem um mercado consolidado (SOUZA, 2006).

A utilização dos hidrolisados hemicelulósicos para produção de etanol e xilitol a partir da D-xilose é dificultada pela presença de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida da biomassa. Devido às altas

temperaturas e condições ácidas empregadas neste procedimento furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos alifáticos e compostos fenólicos são produzidos atuando de maneira negativa na fermentação, afetando o crescimento celular, reduzindo a atividade enzimática e biológica das células microbianas.

A fim de minimizar a toxicidade do hidrolisado de bagaço de cana muitos métodos tem sido propostos para transformar compostos inibidores em compostos inativos ou para reduzir a concentração destes. A destoxificação do hidrolisado é importante para que a fermentação ocorra de maneira eficiente (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Dentre os métodos utilizados destacam-se a coagulação/floculação, os processos de separação por membranas e as resinas de troca iônica. A coagulação/floculação é uma técnica que apresenta baixo custo, fácil operacionalidade e resultados de separação expressivos capazes de justificar seu uso como pré-tratamento a uma técnica de custo mais elevado (NORONHA et al; 2010). Os processos com membranas vêm se destacando nos últimos anos como operação de separação que apresenta vantagens importantes, em destaque: reduzido gasto energético, úteis na manipulação de substâncias termolábeis e fácil ampliação de escala (sistemas modulares) (FARIA, 2000). Já as resinas de troca iônica são polímeros capazes de remover contaminantes iônicos de difícil remoção a partir de soluções diversas. Além disso, são reutilizáveis podendo sua vida útil se estender por vários anos (ALEXANDRATOS, 2009).

O presente trabalho teve por objetivo estudar o uso combinado de diferentes tecnologias de separação visando a purificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, através de: a) coagulação/floculação de impurezas coloidais; b) processos de separação por membranas; c) resinas de troca iônica. Ao final, testes preliminares de fermentabilidade foram realizados a fim de comprovar a eficiência da purificação proposta.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Biomassa Lignocelulósica

Biomassa lignocelulósica constitui uma das principais fontes de matéria orgânica do planeta representando mais de 60% da biomassa total. Ela é proveniente da agroindústria e seus resíduos e de atividades de exploração vegetal (ARISTIDOU; PENTILA, 2000). Esta biomassa renovável é considerada como um material bruto atrativo não só para combustíveis, mas também para a produção de produtos químicos e outros materiais mais nobres, devido à sua disponibilidade e baixo custo (CHENG et al., 2008; KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009; XAVIER et al., 2010).

Visando a obtenção destes produtos muitos materiais lignocelulósicos têm sido estudados como, por exemplo, resíduos de culturas (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, palha de cevada), madeira, resinosas (pinheiros), resíduos de celulose (jornal, papel de escritório e de resíduos de papel reciclado), biomassa de herbáceas (feno de alfafa, gramíneas, grama) e resíduos sólidos urbanos (SANCHEZ; CARDONA, 2008; KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009). Alguns exemplos de materiais lignocelulósicos e suas respectivas composições estão apresentados na Tabela 1.

Paralelamente, existe um crescente interesse industrial em substituir os petroquímicos por outros produtos de base biológica, a fim de atingir uma economia sustentável (YANG, 2007; SANCHEZ; CARDONA, 2008). O uso indiscriminado de combustíveis fósseis desde o século passado levou o mundo ao cenário atual no qual emissões de CO₂ na atmosfera vêm causando excessivas mudanças climáticas (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2009).

Tabela 1 – Composição Química parcial de alguns resíduos lignocelulósicos

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

O aumento dos preços do petróleo e a capacidade limitada das fontes deste, visto que se trata de um recurso não renovável, aumenta o interesse na busca de fontes renováveis de energia e também novas tecnologias capazes de produzir biocombustíveis de forma rentável (SCORDIA; COSENTINO; JEFFRIES, 2010; XAVIER et al., 2010).

Os chamados biocombustíveis de “primeira geração”, essencialmente aqueles produzidos a partir de sementes ou grãos, contribuem para o aumento dos preços dos alimentos em todo o mundo, resultando em perturbação social em muitos países. Esta é uma das razões pela crescente busca biotecnológica para geração de novas fontes de energia os chamados bicombustíveis de “segunda geração”, especialmente a partir de resíduos agrícolas (XAVIER et al.,2010).

O potencial de aproveitamento destes resíduos agrícolas está na composição química desta biomassa lignocelulósica que possui basicamente três componentes principais: celulose (40-50%), hemicelulose (25-35%) e lignina (15-25%) (ARISTIDOU; PENTILA, 2000; PENG et al., 2009), sendo que a celulose e a hemicelulose devem ser reduzidas a açúcares fermentescíveis capazes de serem transformados em etanol e produtos de maior valor como xilitol, xilanas, hidrogênio e enzimas (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

2.1.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo encontrado amplamente na natureza, além de ser a substância orgânica mais abundante e renovável encontrada no planeta (Figura 1). Ela está presente tanto em plantas superiores como em algas e bactérias. Esse polímero linear é formado de D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e devido a essa linearidade das cadeias, as moléculas adjacentes formam as microfibrilas insolúveis em água (FENGEL; WEGENER, 1989). As pontes de hidrogênio inter e intramoleculares mantêm as regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente ao ataque tanto por enzimas como por compostos ácidos (SUN et al., 2009).

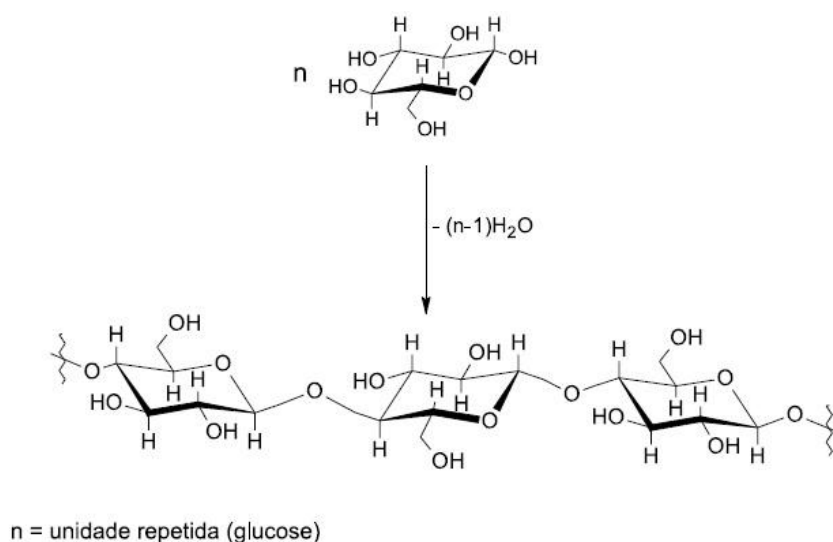


Figura 1- Formação das cadeias de celulose pela união das moléculas de D-glicose (SJÖSTRÖM, 1993).

2.1.2 Hemicelulose

O termo hemicelulose se refere a polissacarídeos de massas moleculares relativamente baixas, os quais estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas em um estágio anterior à lignina. Enquanto a celulose, como substância química, contém como unidade fundamental exclusivamente a β -D-glicose, as hemiceluloses são polímeros em cuja composição podem aparecer, condensadas em proporções variadas,

diversas unidades de açúcares, como apresentado na Figura 2 (FENGEL; WEGENER, 1989).

A cadeia principal poder ser um homopolímero, como é o caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas. Algumas unidades podem conter grupos laterais, tais como L-arabinose, D-galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e acetil.

Observa-se, novamente na figura 2, que algumas unidades monoméricas possuem apenas cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, enquanto outras contam com seis deles sendo, então, denominadas hexoses.

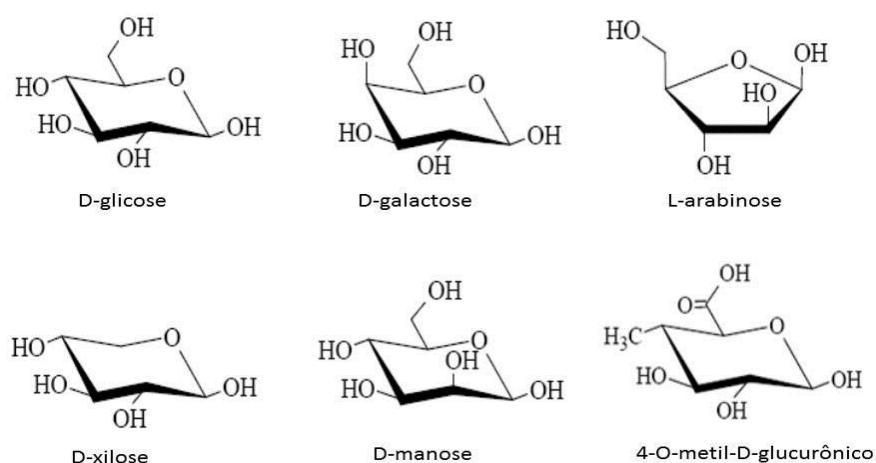


Figura 2 – Açúcares constituintes das hemiceluloses. Adaptado de Pitarello (2007)

Os tipos de hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e glucomananas sendo que as xilanas são as mais abundantes. As xilanas são os principais componentes da parede celular secundária que constituem cerca de 20-30% da biomassa de madeira dura e plantas herbáceas. Em algumas gramíneas, a xilana pode representar até 50% (EBRINGEROVA; HROMADKOVA; HEINZE, 2005).

2.1.3 Lignina

Após a celulose, a lignina é a segunda matéria-prima mais abundante na natureza ela é capaz de aumentar a resistência mecânica das plantas e também tem a função de unir as fibras de celulose. A lignina é típica de tecidos de plantas superiores, como gimnospermas e angiospermas, e atua no transporte de líquidos e na resistência mecânica.

A lignina representa de 10 a 30% dos materiais lignocelulósicos e é formada a partir de três precursores através de reações de desidrogenação, formando macromoléculas (Figuras 3 e 4).

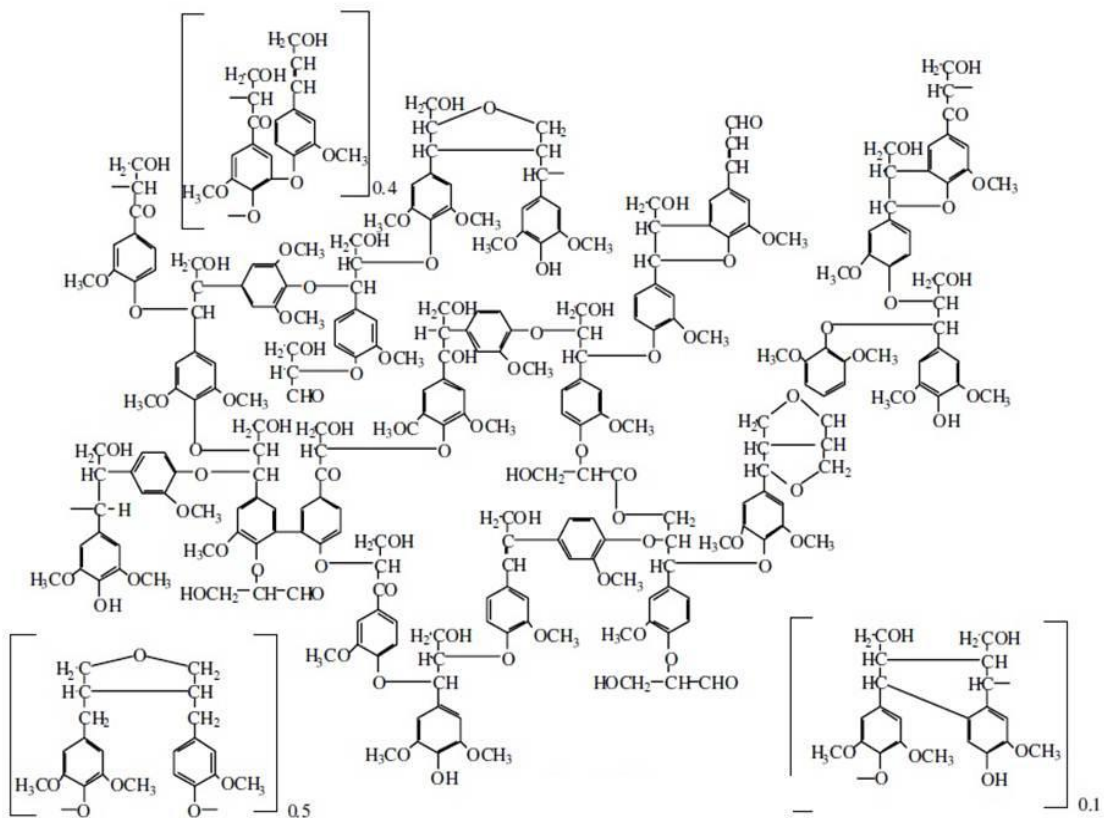


Figura 3- Modelo de estrutura de Lignina proposta por Nimz (1974, FERRAZ, 2001)

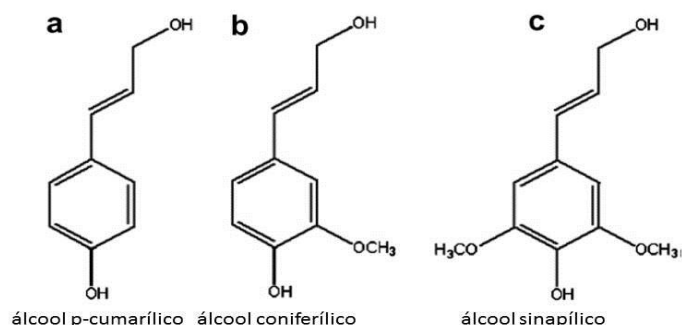


Figura 4- Precursores da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2 O bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é um país de grandes dimensões com uma área de 851 milhões de hectares com 54% de área preservada, incluindo a floresta amazônica. De toda a área disponível para agricultura (340 milhões de hectares) atualmente, só 0,9% é ocupado por cana-de-açúcar como cultura energética, ainda assim, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com aproximadamente 624 milhões de toneladas (safra 2010/2011) sendo a região centro-sul (Tabela 2) responsável por aproximadamente 90% da produção nacional (SOCCOL et al., 2010; CONAB, 2011).

Tabela 2 – Produção de cana-de-açúcar no Brasil.

Regiões	Safras (mil t)					
	05/06	06/07	07/08	08/09	09/10	10/11*
Centro/Sul	337.714	372.285	431.113	504.962	542.824	560.547
Norte/Nordeste	49.727	53.250	64.609	64.099	59.384	63.358
Total	387.441	425.535	495.723	569.062	602.209	623.905

Fonte: ÚNICA, 2011; * CONAB, 2011

O principal material lignocelulósico com potencial de utilização para produção de etanol e outros produtos, especialmente em países tropicais, é o bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo fibroso obtido depois da extração do suco da cana-de-açúcar. (PANDEY et al., 2000; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

A produção brasileira de bagaço de cana de açúcar na safra 07/08 foi estimada em aproximadamente 186 milhões de toneladas (SOCCOL et al., 2010). Seguindo as mesmas proporções propostas por estes autores é possível estimar que a produção de bagaço da safra 10/11 foi de 234 milhões de toneladas. A maior parte deste resíduo é utilizada nas usinas como fonte de energia alternativa (geração de vapor e eletricidade), porém ainda existe um excedente deste material capaz de gerar problemas ambientais (SUN et al., 2004, CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Diante destes problemas ambientais que podem ser gerados pelo excedente de bagaço de cana-de-açúcar, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de utilizar esta matéria prima para produção de etanol e produtos de alto valor agregado utilizando bioconversões.

2.3 Obtenção do etanol e xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico

Em geral os processos que aproveitam o bagaço de cana-de-açúcar incluem diversas etapas, tais como: pré-tratamento, separação sólido-líquido, destoxificação da fração hemicelulósica (parte líquida) e hidrólise da celulose (parte sólida), fermentação de hexoses e pentoses, separação e purificação e tratamento de efluentes; ocorrendo variações dependendo do produto final como apresentado na Figura 5.

Muitos métodos de pré-tratamentos vêm sendo estudados para diferentes materiais lignocelulósicos. Entre eles estão hidrólise ácida, hidrólise enzimática, explosão a vapor e a extração por soluções alcalinas (MUSSATO; ROBERTO, 2004; ALVIRA et al., 2010;

MABEE; SADDLER, 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Para o bagaço de cana-de-açúcar destaca-se a hidrólise branda com diferentes tipos de ácidos (CHENG et al., 2008; PATTRA et al., 2008; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

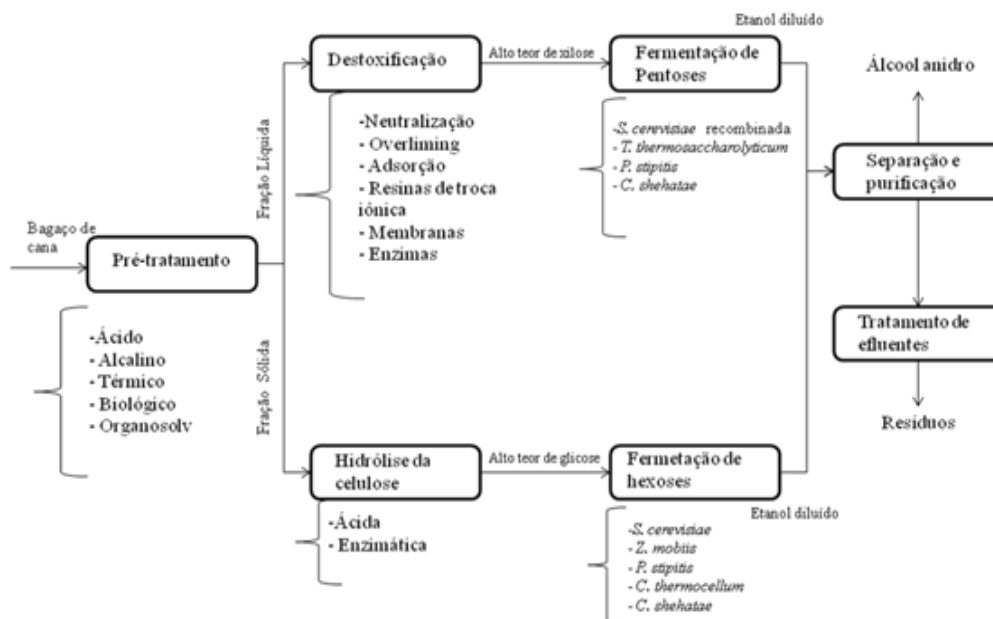


Figura 5- Esquema do processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar (Adaptado de CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Durante o pré-tratamento com ácidos diluídos a hemicelulose é mais facilmente hidrolisada do que a celulose. Portanto, a celulose e a fração de lignina permanecem quase inalteradas na fase sólida podendo também ser utilizadas (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

O hidrolisado obtido é constituído de monossacarídeos (D-xilose, L-arabinose, D-glicose), oligômeros, polissacarídeos, ácido acético e produtos da decomposição dos monossacarídeos (furfural e HMF). As proporções destes compostos variam de acordo com as condições operacionais (GÁMEZ et al., 2006).

Alguns dos compostos obtidos na fração líquida são inibidores de crescimento de microrganismos e devem ser reduzidos a fim de se obter bons resultados durante a

fermentação. Por esta razão, o hidrolisado hemicelulósico oriundo do pré-tratamento deve ser destoxificado (CHANDEL et al., 2007).

2.4 Produtos de bioconversão: etanol e xilitol

2.4.1 Etanol

O etanol (Figura 6) é obtido através da fermentação alcoólica e suas aplicações estão em diversos setores como, por exemplo, bebidas, materiais de limpeza e principalmente como combustível. O estudo da fermentação visando a produção de etanol vem ganhando espaço devido ao aumento da demanda nos últimos anos, em especial, no Brasil onde é muito utilizado como combustível em motores à explosão (SILVA, 2007).

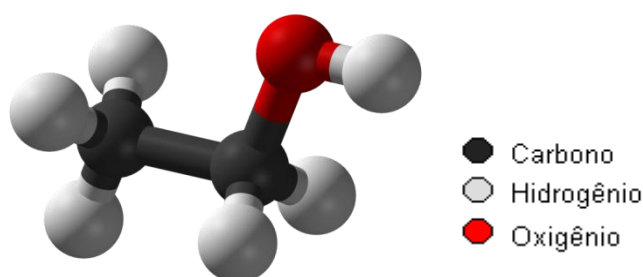


Figura 6- Modelo Molecular do Etanol (C_2H_5OH).

Atualmente, o Brasil tem mais de 80% de seus veículos movidos a etanol e até mesmo motores de pequenas aeronaves estão sendo desenvolvidos.

Com a crescente instabilidade dos preços do petróleo e a dependência de fornecimento dos países do oriente médio, esta demanda por etanol tende a ser realidade para outros países que também decidiram direcionar a política energética para utilização de biocombustíveis.

De acordo com Soccol et al, (2010) o sistema brasileiro de agroenergia de cana-de-açúcar é considerado o mais eficiente. Desde o início do século passado, o Brasil começou a usar etanol como combustível. A crise do petróleo e os baixos preços do açúcar na

década de 70 empurraram o Brasil para o início de uma estratégia para contornar essa situação. O governo brasileiro pretendia evitar uma diminuição no consumo de energia a fim de manter o crescimento econômico através da substituição do petróleo importado por fontes internas o mais rápido possível.

O Proálcool foi criado em 1975, no governo do presidente Ernesto Geisel, quando o fornecimento de energia se tornou prioridade. Este programa foi a resposta à primeira crise do petróleo, bem como ao problema da flutuação do preço do açúcar (SOCCOL et al., 2010).

No processo de implantação do programa, devem ser destacadas duas fases: a primeira que abrange 1975 até 1978, que correspondeu ao uso da mistura álcool-gasolina, uma mistura de 20%, à implantação de destilarias anexas e ao envolvimento da indústria automotiva para a produção de carros a álcool. Foi nessa fase que ocorreu o processo de modernização.

A segunda fase, de 1980 a 1983, o governo brasileiro continuou subsidiando a expansão da capacidade industrial de cana, produzindo álcool hidratado em larga escala. Paralelamente, a indústria automobilística começou a produzir carros movidos somente a álcool.

A credibilidade do Proálcool começou a cair devido a uma combinação de fatores como o aumento rápido nos automóveis de passageiros movidos a álcool, a estagnação da produção de etanol, que foi causada pela baixa de preços do etanol pagos aos produtores de cana e a incerteza política.

Entre 1989 e 1990, o Proálcool sofreu sua maior crise, quando a oferta de etanol foi afetada, pois a cana produzida foi desviada para produção de açúcar devido aos preços internacionais favoráveis e das condições de procura. Tornou-se então necessária à importação de etanol para atender a demanda dos carros movidos por esse combustível.

Durante a década de 1990, com a extinção dos incentivos do governo o setor sucroalcooleiro foi totalmente desregulamentado, eliminando assim o controle da produção e comercialização, a garantia de preços e o monopólio federal sobre as exportações de açúcar (RICO; MERCEDES; SAUER, 2010; SOCCOL et al., 2010; BRASIL, 2011).

No ano 2000 foi criada Comissão Interministerial do Álcool (CIMA), pelo decreto 3.546 de 17 de julho de 2000, no âmbito do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, com o objetivo de deliberar sobre as políticas relacionadas com as atividades do setor sucroalcooleiro, considerando, entre outros a adequada participação dos produtos da cana-de-açúcar na Matriz Energética Nacional, os mecanismos econômicos necessários à auto sustentação setorial e o desenvolvimento científico e tecnológico (RICO; MERCEDES; SAUER, 2010).

A partir disto, a indústria automobilística brasileira foi revitalizada com a introdução dos veículos bicompostíveis, em março 2003 (HIRA; OLIVEIRA, 2009).

Recentemente, a produção brasileira de cana-de-açúcar vem aumentando, sendo que a safra 2009/2010 de cana-de-açúcar terminou com alta de 7% na produção de etanol em relação à safra anterior cuja produção totalizou 27,60 bilhões de litros (CONAB, 2011).

A produção de etanol vem crescendo a cada ano como é mostrado na Figura 7. Além do volume destinado às exportações é importante ressaltar o aumento da produção de carros bicompostíveis que gerou um aumento no consumo interno nos últimos anos.

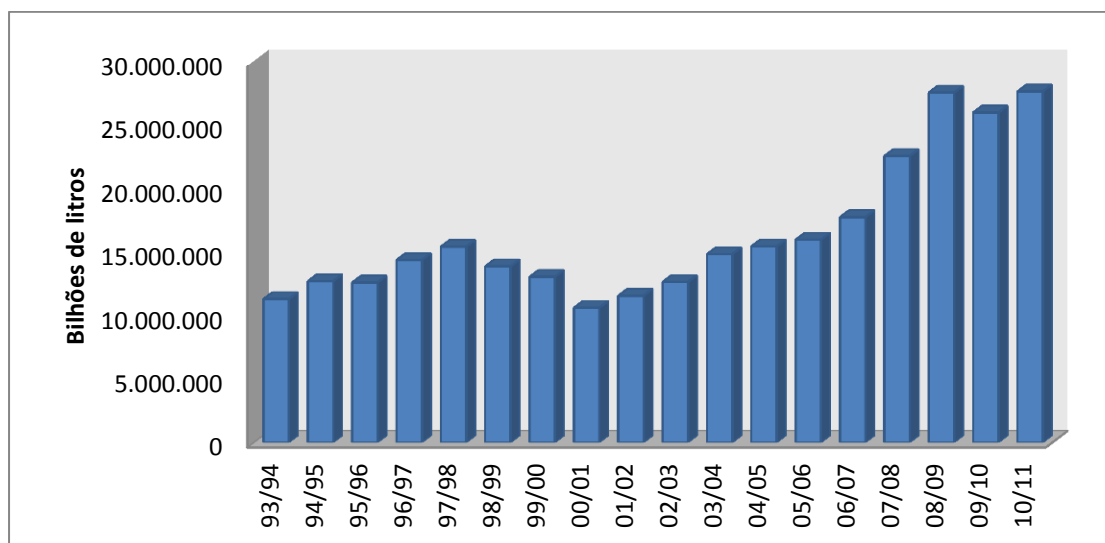


Figura 7– Evolução da produção brasileira de etanol.

2.4.2 Xilitol

O xilitol é um poliol de cinco carbonos (Figura 8) que tem o teor calórico (2,4 cal/g) muito menor que a sacarose (4 cal/g), mas com o poder adoçante bem parecido, é insulina independente quando metabolizado em humanos e por isso tem sido usado em alimentos de baixas calorias e alimentos para diabéticos, bem como em xaropes, complementos vitamínicos e tônicos (ARANDA-BARRADAS et al., 2010). O xilitol está presente em muitas frutas e plantas como ameixa, morango, pera, framboesa e couve-flor (MATILLA; KANGASMA; KNUUTTILA, 2005).

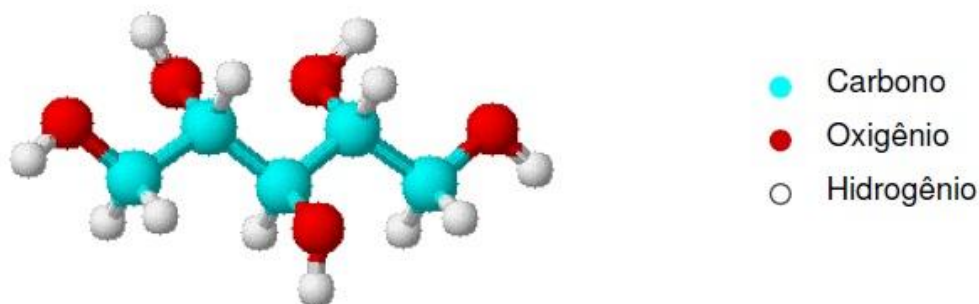


Figura 8– Modelo molecular do xilitol ($C_5H_{12}O_5$)

O xilitol pode ser classificado como um edulcorante nutritivo ou calórico, denominação esta dada pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos para qualquer edulcorante que possua mais de 2% de valor calórico de sacarose por unidade equivalente de capacidade adoçante. Por ser um poliol (açúcar álcool) se diferencia pela ausência de grupos aldeídicos e cetônicos em suas moléculas, pois sofreu uma redução desses grupos a álcool passando de uma estrutura cíclica a linear. Os polióis apresentam importantes propriedades para a indústria de alimentos, tais como: ausência de reações de escurecimento do tipo *Maillard*, maior estabilidade química, maior resistência à cristalização, maior afinidade por água e menor susceptibilidade à fermentação em relação aos açúcares que não sofrem reação de redução dos grupos aldeídicos e cetônicos (MAIA et al., 2008).

Segundo estes mesmos autores outra característica interessante do xilitol é o seu valor negativo de calor de dissolução ($-34,8$ cal/g), o que lhe confere um agradável efeito refrescante quando utilizado em alimentos. Possui boa solubilidade em água conforme Tabela 3, além de ser um excelente agente redutor de atividade de água (aw), pois suas hidroxilas se ligam facilmente a esta substância, o que confere uma maior conservação dos produtos. Outras características físico-químicas do xilitol estão na Tabela 3.

Sua descoberta ocorreu no ano de 1891 pelos químicos Emil Fisher e Gabriel Bertrand, obtido na forma de xarope a partir da reação da D-xilose (açúcar obtido da madeira) com amálgama sódica (liga de mercúrio e sódio) (LIMA; BERLINK, 2003). Em 1975 a Finnish Sugar Co. Ltd. (Helsinque, Finlândia) começou a primeira produção em larga escala, produzindo acima de três mil toneladas por ano. Neste mesmo ano foi lançada na Finlândia e depois nos Estados Unidos uma goma de mascar à base de xilitol (HYVONEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982).

Tabela 3- Propriedades físico-químicas do xilitol (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982).

<i>Propriedades</i>	<i>Características</i>
Massa molar	152,15 g/mol
Sabor	Doce
Odor	Inodoro
Aparência	Pó cristalino branco
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	216 °C
pH (solução 5%)	5-7
Viscosidade (solução 10% à 20 °C)	1,03cp
Solubilidade (30 °C)	68g/100g de solução
Densidade (solução 10%)	1,03 g/cm ³
Calor de dissolução	-34,8 cal/g (efeito “refrescante”)
Valor calórico	2,4 kcal/g
Índice de refração (solução 10% à 25 °C)	1,3471
Estabilidade	Estável a 120°C
Higroscopicidade	Em umidade relativa alta o xilitol é mais higroscópico que a sacarose.

O xilitol tem sua importância destacada, principalmente por ser independente no metabolismo humano e anticariogênico. Além disso, o xilitol foi listado como um dos materiais de maior valor agregado produzido a partir da biomassa (KIM et al., 2010).

Nos últimos anos, outras propriedades do xilitol no campo da saúde foram estudadas, tais como a remineralização de pequenas lesões nos dentes, prevenção da otite e outras infecções de vias aéreas superiores sendo essas propriedades exploradas pela indústria farmacêutica. Atualmente no mercado a produção de xilitol situa-se entre 20.000 e 40.000 toneladas por ano com um valor econômico que se encontra entre 90 e 340 milhões de dólares (ARANDA-BARRADAS et al., 2010).

A produção industrial de xilitol nos dias de hoje é baseada na desidrogenação da D-xilose em um processo níquel catalítico que é de alto custo devido ao elevado gasto energético, cujo rendimento não passa de 50 a 60%. Assim, algumas alternativas de obtenção como os processos biológicos que utilizam microrganismos que assimilam D-xilose têm sido amplamente estudadas, especialmente aquelas que envolvem leveduras

Candida (MUSSATTO; ROBERTO, 2008; KIM et al., 2010). Esta rota alternativa é de interesse pelo fato de requerer pouca energia e ser muito específica. Contudo, os rendimentos e eficiência de produção ainda são reduzidos. Vários estudos a partir de diferentes materiais hemicelulósicos ricos em D-xilose continuam sendo realizados com o objetivo da utilização destas frações como substratos de maneira mais rentável (MUSSATTO; ROBERTO, 2008).

2.5 Inibidores do metabolismo microbiano

Um aspecto importante na produção biotecnológica de etanol ou xilitol é o fato de que durante a fase de pré-tratamento (hidrólise ácida) do resíduo agroindustrial, além da liberação dos açúcares, é comum ocorrer a formação de compostos tóxicos provenientes da degradação de hexoses e pentoses, como HMF e furfural, ou da lignina, como compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos. Também é comum a liberação de substâncias da própria estrutura lignocelulósica como o ácido acético ou dos equipamentos utilizados na hidrólise como íons ferro, cromo, níquel e cobre. Estes compostos, quando presentes no hidrolisado, são inibidores potenciais do metabolismo microbiano afetando o estágio de fermentação (TAMANINI; HAULY, 2004; BENITO et al, 2009).

Os tipos de compostos e a concentração deles dependem tanto do tipo de material como das condições empregadas no processo. Além disso, variáveis de fermentação como condições fisiológicas das células, concentração de oxigênio dissolvido e pH são também associados a toxicidade dos compostos, em alguns casos acentuando seus efeitos tóxicos. Os compostos tóxicos podem estressar os microrganismos fermentativos afetando a eficiência da utilização dos açúcares e reduzindo a formação do produto (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

O efeito biológico de certos compostos pode ser reforçado pela presença de outros compostos no meio, ou seja, a concentração máxima que o microrganismo suporta de cada inibidor não pode ser estabelecida, pois a inibição depende de outros fatores, tais como, o tipo de microrganismo, a sua adaptação ao meio, o tipo de processo fermentativo empregado, o número de inibidores no meio e seu efeito sinérgico (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004; MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Autores como Zaldivar; Martinez e Ingram (2000) e Nigam (2001) através de experimentos em meios sintéticos e hidrolisados de diferentes fontes lignocelulósicas chegaram à conclusão que o efeito de inibição desses compostos é maior quando eles estão combinados.

2.5.1 Compostos Fenólicos

Uma grande variedade de compostos (aromáticos, poli-aromáticos, fenólicos e aldeídos) é liberada da lignina durante o processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos. Os compostos fenólicos têm um efeito inibitório considerável sobre a fermentação de lignocelulósicos e atuam na célula causando ruptura e perda da integridade das membranas biológicas, afetando assim sua capacidade de barreira seletiva. Em consequência disso, tanto o crescimento celular quanto a assimilação de açúcar são reduzidos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; KLINKE et al., 2004).

Parajó; Domínguez e Domínguez (1998) relataram que os produtos de degradação da lignina são mais tóxicos para os microrganismos que o furfural e o HMF, mesmo quando suas concentrações são baixas.

Ao investigar a bioconversão de D-xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* FTI20037 Villa et al. (1998) verificaram a influência de diferentes concentrações de fenol (0,1 e 4 g/L) e constataram que o fenol em baixas concentrações (0,1 g/L) não afetou o

consumo de D-xilose. Contudo, o crescimento da célula e a produção de xilitol em concentrações elevadas foi extremamente inibitório.

No entanto, Felipe et al.(1999) relataram que para a mesma levedura (*C.guilliermondii*) FTI20037 cultivada em meio sintético a presença de 0,05 g/L de fenol fez com que o consumo de D-xilose fosse reduzido em 16%. Parâmetros como redução na concentração celular, alterações morfológicas e perda de viabilidade celular foram observados na presença de fenol.

2.5.2 Furfural e HMF

O furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) são formados a partir da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, quando estes açúcares ficam expostos a altas temperaturas (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Os efeitos inibitórios de furfural e HMF em leveduras foram analisados por diversos autores que constataram que esse efeito depende da concentração destes compostos no meio. Estas substâncias causam danos ao crescimento das células, redução da atividade enzimática e biológica, quebra do DNA, inibição de proteínas e inibição da síntese do RNA (LIU; GORSICH; SLININGER, 2005).

Dependendo da sua concentração no meio de fermentação o furfural pode inibir as células e afetar a taxa de crescimento específico e rendimento celular por ATP. Quando da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, Roberto et al. (1991) observaram que as concentrações de furfural inferiores a 0,5 g/L, tiveram um efeito positivo sobre o crescimento da célula, enquanto que em concentrações acima de 2 g/L inibiram o crescimento celular completamente.

Delgenes; Moletta e Navarro (1996) mostraram que concentrações de furfural de 0,5, 1,0 e 2,0 g/L reduziram o crescimento de *P.stipitis* em 25%, 47% e 99%, respectivamente. Nigam (2001) verificou que a concentração de 0,25 g/L no meio de

fermentação não foi suficiente para reduzir o rendimento e a produtividade do etanol, mas uma concentração como 1,5 g/L afetou significativamente o crescimento do microrganismo. O rendimento do etanol e sua produtividade reduziram 90,4% e 85,1%, respectivamente.

Quanto ao HMF, composto tóxico originário da degradação das hexoses, Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000) informaram que seu efeito inibitório é semelhante ao do furfural, causando um atraso no crescimento. Entretanto, o HMF é considerado menos tóxico que o furfural e sua concentração no hidrolisado é normalmente baixa devido a três fatores principais: baixa quantidade de hexose na hemicelulose, condições empregadas nos processos hidrolíticos e alta reatividade deste composto (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Delgenes; Moletta e Navarro (1996) constataram que o crescimento celular da *P.stipitis* foi reduzido em 43%, 70% e 100% quando as concentrações de HMF no meio foram de 0,5, 0,75 e 1,5 g/L respectivamente.

Martinez et al. (2000) observaram que a produção de etanol por *Escherichia coli* em hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar foi afetada pelos furanos (HMF e furfural) só quando suas concentrações foram superiores a 0,9 g/L.

2.5.3 Ácido Acético

O ácido acético é um importante composto que é liberado a partir da hidrólise dos grupos acetila, os quais estão presentes na cadeia ramificada da hemicelulose. O seu poder inibitório está relacionado a sua forma não dissociada (pKa 4,75) que pode difundir através da membrana citoplasmática das células e afetar o metabolismo celular. Isto mostra a forte dependência do pH no meio de fermentação. Uma vez no interior da célula o ácido acético se dissocia e atua reduzindo o pH intracelular resultando na diminuição do gradiente de prótons através da membrana, desajustando a produção de energia, afetando o transporte de

nutrientes e as diferentes catálises enzimáticas (LIMA et al, 2004; GRZENIA; SHELL; WICKRAMASINGHE, 2008; WICKRAMASINGHE; GRZENIA, 2008).

Segundo Felipe et al. (1995) a toxicidade do ácido acético na conversão de D-xilose em xilitol tem sido constatada quando este está presente em concentrações acima de 3g/L. Nesta condição, o catabolismo celular não pode gerar ATP suficiente, visto que as leveduras são capazes de regular seu pH interno através da ATPase situada no plasma da membrana. Quando ocorre a diminuição do pH atividade da ATPase é aumentada resultando em uma dissipação de ATP prejudicial (KUSUMEGI; YOSHIDA; TOMIYAMA, 1998).

A quantidade de ácido acético produzido durante os pré-tratamentos também depende da biomassa lignocelulósica utilizada. Em geral, uma biomassa herbácea produz menos ácido acético que uma biomassa lenhosa. Assim, no passado, a remoção de ácido acético a partir de biomassa herbácea, após o pré-tratamento não era considerada necessária (WICKRAMASINGHE; GRZENIA, 2008). Entretanto, Maiorella; Blanch e Wilke (1983) indicaram que pequenas concentrações como 0,25 g/L poderiam afetar o crescimento celular evidenciando a importância da remoção do ácido acético.

De acordo com Cho et al. (2010) muitos trabalhos têm mostrado que o ácido acético isoladamente ou em mistura com outros inibidores é prejudicial para o crescimento celular e fermentações realizadas por *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia stipitis*. *Pichia stipitis* é capaz de fermentar uma variedade de açúcares para etanol, inclusive a D-xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico. Estes autores ainda destacam que o crescimento celular e a produção de etanol utilizando esta levedura foram fortemente afetados pela presença de ácido acético, tanto em meio sintético como no hidrolisado obtido de biomassa, onde a concentração de ácido acético era de 7,1 g/L.

Guo et al. (2008) verificaram em seus estudos que a levedura *Pichia stipitis* foi severamente inibida pelo ácido acético mostrando que a produção de etanol foi diminuída em concentrações acima de 2 g/L. Díaz et al. (2009) mostraram que a presença de 6 g/L de ácido acético causou 82% de redução na taxa de crescimento específico por esta cepa.

Cheng et al. (2009) evidenciaram o poder inibitório do ácido acético sobre a conversão da D-xilose em xilitol por *Candida tropicalis* cultivada em meio sintético contendo diferentes níveis do ácido. O consumo de D-xilose não foi afetado até a concentrações menores que 2 g/L. Quando o ácido acético atingiu 4 g/L a concentração final de xilitol foi 72% menor que no meio sem adição de ácido acético.

Lima et al. (2004), concluíram que o ácido acético presente no meio em pH ~ 5,0 não afetou significativamente o metabolismo dos açúcares nem a formação de xilitol por *Candida guilliermondii*, pois este pH está acima do valor do pKa de 4,75 do ácido acético. Resultado semelhante foi relatado por Felipe et al. (1995) que verificou que o pH acima de 5,0 não influenciou o crescimento celular e a formação de xilitol. Resultados semelhantes também foram observados por Sene et al. (1998) que com o aumento do pH inicial, relataram favorecimento do crescimento celular, da produção de xilitol e das atividades enzimáticas foram favorecidos.

O fato de que o ácido acético pode ser usado pelas leveduras como nutriente adicional para o crescimento pode explicar seu parcial consumo durante o processo de fermentação, como foi observado também por Felipe et al., (1997) e Morita e Silva (2000).

2.5.4 Íons metálicos

Traços minerais ou metais são transportados através da membrana celular por mecanismos ativos ou passivos e diferentes tipos de toxicidade têm sido demonstrados para os cátions Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+ , NH_4^+ e ânions Cl^- , SO_4^{-2} , HPO_4^- em *Saccharomyces cerevisiae*.

O magnésio é importante para muitas funções metabólicas e fisiológicas em leveduras e bactérias (KLINKE et al., 2004). Já os íons de metais pesados (ferro, cromo, níquel e cobre) originários da corrosão dos equipamentos de hidrólise possuem uma estreita faixa de concentração ótima para os microrganismos e em concentrações mais elevadas inibem as enzimas nas vias metabólicas do microrganismo (MUSSATO; ROBERTO, 2004; KLINKE et al., 2004).

2.6 Métodos de tratamento do hidrolisado hemicelulósico

Alguns procedimentos de purificação incluindo métodos biológicos, físicos e químicos tem sido propostos para remover ou transformar os compostos inibitórios em compostos inativos. A eficácia de cada método de purificação depende tanto do tipo de hidrolisado hemicelulósico como da espécie do microrganismo empregado, pois cada tipo de hidrolisado possui um grau de toxicidade e cada espécie de microrganismo tem um diferente tipo de tolerância para os compostos inibidores (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Alguns métodos como neutralização, tratamento com hidróxido de cálcio, adsorção por carvão ativado, resinas de troca iônica (MAGACHO, 2009; CARVALHEIRO et al., 2005), coagulação/floculação (FONSECA; FREITAS; FARIA, 2010) e tratamento usando lacase (CHANDEL et al., 2007) são conhecidos por remover compostos tóxicos de hidrolisados hemicelulósicos.

No processo de neutralização é comum a adição de substâncias químicas que neutralizam os ácidos dos hidrolisados formando sais. Estes sais têm baixa solubilidade e são normalmente removidos por filtração. Concentrar os hidrolisados por evaporação é usual para aumentar a concentração de açúcar. Nesta operação, além de pequenas quantidades de água, compostos inibidores voláteis são removidos (CARVALHO; ALMEIDA; SILVA, 2002).

Em geral, antes de escolher um método de destoxificação ou uma sequência de métodos, é importante identificar os principais inibidores presentes no hidrolisado. Estas informações ajudam não só a escolher um método de baixo custo e eficiente, como também a estabelecer as melhores condições de hidrólise a fim de minimizar a formação de tais compostos. Além disso, o método de destoxificação deve ser economicamente viável, fácil de integrar ao processo e capaz de remover os inibidores seletivamente (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

2.6.1 Ajuste de pH

Este ajuste consiste na utilização de álcalis para a elevação do pH, inicialmente ácido, a valores apropriados para a atividade microbiana. Esta alteração resulta na precipitação de componentes tóxicos como íons de metais pesados, acetatos, taninos, terpenos e compostos fenólicos (FRAZER; McCASKEY, 1989).

De acordo com Cardona; Quintero e Paz (2010) o tratamento do hidrolisado hemicelulósico com hidróxido de cálcio até pH 10 ou maior e em seguida sua reacidificação a pH 5,5 – 6,5 com ácido sulfúrico tem sido efetivo na destoxificação do hidrolisado, pois remove parte dos compostos inibitórios, como o furfural e o HMF.

Este tipo de tratamento também é usado de maneira combinada com outros métodos como, por exemplo, a adsorção em carvão ativo visando a destoxificação de hidrolisados (MUSSATO; ROBERTO, 2004). No entanto, este procedimento causou perda parcial dos açúcares fermentescíveis.

No entanto, Chandel et al. (2007) mostraram que o tratamento com o carvão ativo causou a redução de cerca de 38,7% de furanos, 57% de compostos fenólicos e 46,8% de ácido acético. Além disso, o tratamento com hidróxido de cálcio removeu cerca de 45,8% de furanos e 35,87% de fenólicos.

De acordo com Roberto et al. (1991) o ajuste de pH com uma combinação de ácidos e bases é um tratamento de baixo custo que fornece bons resultados. Ao ajustar o pH do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana a um valor de 10 com hidróxido de cálcio e posterior redução para 6,5 com ácido sulfúrico, esses autores obtiveram a remoção parcial de compostos fenólicos e outros inibidores.

Millati; Niklasson e Taherzadeh (2002) experimentando alterações de pH também observaram o decréscimo na concentração de furfural, HMF, em 30% na concentração de compostos fenólicos, mas a concentração de ácido acético permaneceu inalterada.

2.6.2 Coagulação e Floculação de impurezas coloidais

Os termos coagulação e floculação são utilizados como sinônimos, uma vez que significam o processo integral de aglomeração das partículas. Mas pode-se dizer que a coagulação é o processo pelo qual o agente coagulante é adicionado à água, reduzindo as forças que tendem a manter separadas as partículas em suspensão, e a floculação é a aglomeração dessas partículas por meio do movimento do fluido, de modo a formar partículas maiores que possam sedimentar ou flotar (RITCHER; AZEVEDO NETTO, 2003).

As partículas suspensas são classificadas por classes e faixas de tamanho. As coloidais compreendem de 1 nm – 100 nm, as dispersas de 0,0001 mm - 0,1 mm, as coaguladas de 0,1 mm - 1,0 mm e as floculadas de 1,0 mm - 10,0 mm (MORAES, 2004).

Geralmente as partículas coloidais presentes em soluções aquosas apresentam os maiores problemas quando se visa a remoção de cor e turbidez. Isso se deve às propriedades eletrocinéticas dos coloides e também às características consequentes da dimensão reduzida das partículas (SPINELLI, 2001). Segundo Azevedo et al. (1979) o conhecimento das propriedades fundamentais dessas partículas possibilita melhor compreensão do processo de coagulação e floculação.

Para que ocorra o processo de coagulação/floculação é necessário a redução do Potencial Zeta por íons ou coloides de cargas opostas o que corresponde a um dos dois mecanismos básicos que levam a coagulação, o outro é a ortocinética, em que as micelas se agregam e formam flocos que aglomeram as partículas em suspensão. O Potencial Zeta corresponde à medida do potencial elétrico entre a superfície externa da camada compacta que se desenvolve ao redor da partícula e do meio líquido no qual ela está inserida. (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; AZEVEDO et al., 1979). Como ocorrem interações entre o coagulante e a água espécies hidrolisadas são formadas, sendo necessária a presença de um agente físico para que processo de coagulação seja eficiente. Este agente tanto para a realização da coagulação como da floculação é a agitação da água na etapa de mistura, podendo ser mais ou menos intensa. De maneira geral, denominada de mistura rápida, quando aplicada à coagulação, e mistura lenta quando aplicada à floculação (AZEVEDO NETTO; RICHTER, 1998).

Na floculação ocorre a agregação das partículas em suspensão em função das forças de Van Der Waals. A formação de flocos pode ocorrer de maneira espontânea apenas pelos sucessivos choques entre as várias partículas presentes, desde que o sistema possua energia disponível para tal decorrente de sua agitação. Entretanto, uma agitação muito intensa pode fazer com que os flocos formados se desagreguem espontaneamente (CARDOSO et al., 2008).

Segundo Koblitz (1998) para que a coagulação aconteça é necessária a presença de um agente alcalinizante no meio reacional. Os reagentes mais utilizados são o óxido de cálcio, hidróxido de cálcio ou carbonato de sódio. Alguns auxiliares de floculação podem ser aplicados a fim de tornar o floco mais denso, facilitando a decantação.

Vários agentes coagulantes químicos são conhecidos e amplamente utilizados em todo o mundo. O sulfato de alumínio é o coagulante mais usado no tratamento de água

potável, pois possui facilidade de transporte e de manejo, seu custo é baixo e é produzido em várias regiões brasileiras. O sulfeto ferroso é muito útil para tratar águas que apresentam pH elevado e o cloreto férrico produz bons flocos em amplo intervalo de pH (SPINELLI, 2001).

Outro coagulante importante é o policloreto de alumínio (PAC), que contém em sua formação de 10 a 25% de Al_2O_3 , como ingrediente ativo. O PAC oferece algumas vantagens técnicas sobre os coagulantes tradicionalmente usados: é capaz de flocular em qualquer faixa de pH, apresenta maior eficiência em comparação ao sulfato de alumínio na remoção de coloides com menor gasto de reagentes e gera menor resíduo de alumínio no produto final (KOBELITZ, 2008).

Recentemente, muita atenção tem sido dada ao uso extensivo de coagulantes à base de alumínio no tratamento de água. Além da grande quantidade de lodo produzido, o alto nível de alumínio remanescente na água tratada tem preocupado a saúde pública (HUANG; CHEN; PAN, 2000). Vários estudos biológicos e epidemiológicos têm levado à evidência de que o uso de quantidades elevadas de alumínio no tratamento de água pode causar a doença de Alzheimer. Esta doença letal se desenvolve devagar e progressivamente, afetando a memória e outras funções cognitivas, causando uma desordem cerebral, além de outros múltiplos sintomas e complicações (FLATEN, 2001; LLOPIS; DIEZ, 2002; CAMPBELL, 2003).

Nos últimos anos vários trabalhos foram desenvolvidos no sentido da utilização de coagulantes poliméricos alternativos aos coagulantes químicos. Estes trabalhos inicialmente preocuparam-se em substituir ou auxiliar os coagulantes convencionais com o intuito de melhorar a etapa de coagulação/floculação, tanto pela qualidade dos flocos produzidos, quanto pela ausência de metais do lodo gerado (MORAES, 2004).

Os coagulantes/floculantes naturais tem demonstrado vantagens em relação aos químicos, especificamente em relação à biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo índice de produção de lodos residuais (MORAES et al., 2008).

Entre os coagulantes/floculantes naturais encontra-se a quitosana (Figura 9), um produto natural derivado da desacetilação da quitina, um biopolímero abundante encontrado no esqueleto de animais marinhos como caranguejos, camarões e lagostas (GUIBAL;ROUSSY, 2007).

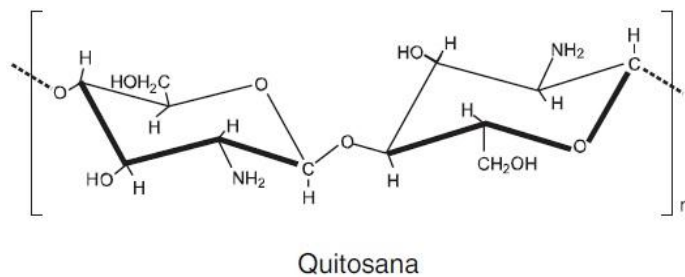


Figura 9– Estrutura molecular da Quitosana

Embora seja mais cara do que o PAC a quitosana é tanto coagulante como floculante, ou seja, apresenta alta densidade de carga catiônica, longas cadeias de polímeros e precipitação facilitada. A quitosana tem a vantagem de não ser tóxica, ser biodegradável, não corrosiva e segura de se manusear. Se comparada com o PAC não é poluente, pois não produz resíduos de alumínio (RENAULT et al., 2009).

Estes mesmos autores estudaram a coagulação/floculação de efluentes de uma indústria de papelão em uma estação de tratamento biológica, usando uma lagoa aerada, comparando o PAC comercial e a quitosana dissolvida em ácido acético como agentes coagulantes/floculantes e constataram que com quitosana, o processo foi mais eficiente do que com o PAC. A quitosana reduziu o DQO em 80% e a turbidez em mais de 85%, além de remover cores residuais e levar a uma diminuição significativa na quantidade dos metais presentes no efluente.

A presença de grupos amino nas cadeias poliméricas permite que a quitosana atue como polieletrólito catiônico em $\text{pH} < 6,5$ e apresente uma alta densidade de cargas, que se adsorvem facilmente nas superfícies carregadas negativamente (KIMURA, 2001).

Como a quitosana é efetiva na coagulação, nenhuma desvantagem é conhecida, podendo ser uma substituta promissora dos produtos sintéticos (KAWAMURA, 1991).

Outro coagulante natural que é bastante utilizado é o tanino vegetal. Estes são compostos polifenólicos encontrados em uma grande variedade de plantas superiores, com características adstringentes e podem ser definidos como substâncias orgânicas de extratos vegetais capazes de precipitar proteínas (DA SILVA, 1999).

O esquema básico da molécula de tanino é apresentado na Figura 10.

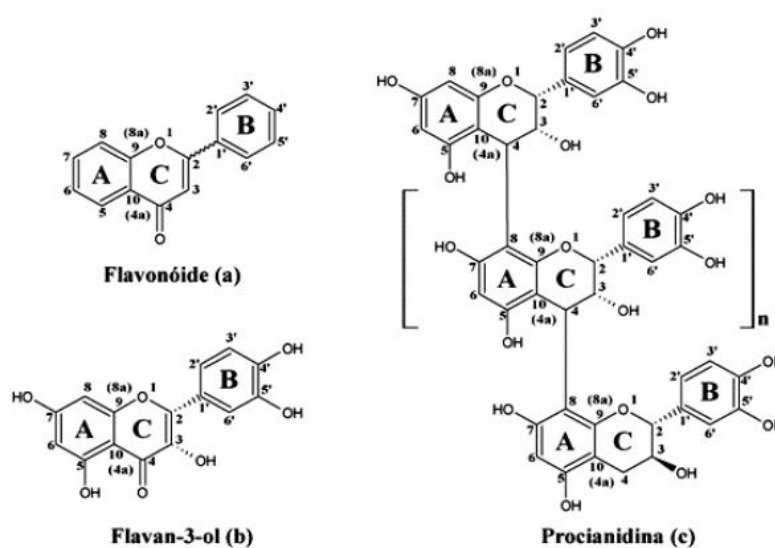


Figura 10 – Fórmulas estruturais do tanino. Adaptado de Queiroz, et al. (2002).

A utilização de taninos catiônicos em substituição aos tradicionais agentes coagulantes minerais ou sintéticos teve início há mais de cinquenta anos. Há mais de vinte anos produtos com estabilidade e desempenho satisfatórios foram encontrados (comparáveis aos minerais, como o sulfato de alumínio) e, ainda nos últimos anos, produtos que apresentam uma relação custo/benefício têm entrado no mercado aumentando significativamente os volumes comercializados (CRUZ, 2004; DA SILVA, 1999).

Outra característica importante é a sua biodegradabilidade para que após sua utilização, o produto se incorporasse aos lodos gerados durante o processo de coagulação/floculação/sedimentação, e acabe sendo degradado pelos processos biológicos que normalmente ocorrem nas etapas posteriores aos tratamentos de efluentes. Essa característica é facilitada pela presença de açúcares na composição original dos taninos, originados da planta e incorporados ao produto durante o processo de extração (CRUZ, 2004).

2.6.3 Processos de separação por membranas

No início da década de 70, em adição aos processos clássicos de separação, como destilação, filtração, absorção, troca iônica, centrifugação, extração por solvente, cristalização e outros, surgiu uma nova classe de processos denominados processos de separação com membranas (PSM) que utilizam membranas sintéticas como barreiras seletivas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Na Figura 11 é possível observar a comparação entre os métodos por membranas e os métodos convencionais.

As membranas são definidas como uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte dos componentes presentes nas fases.

Os PSM têm sido utilizados nos mais diferentes setores da atividade industrial e podem ser classificados de acordo com a força motriz utilizada no processo. As técnicas empregam com maior frequência o gradiente de pressão como força motriz. Outros processos utilizam o gradiente de concentração, elétrico ou pressão parcial como força motriz.

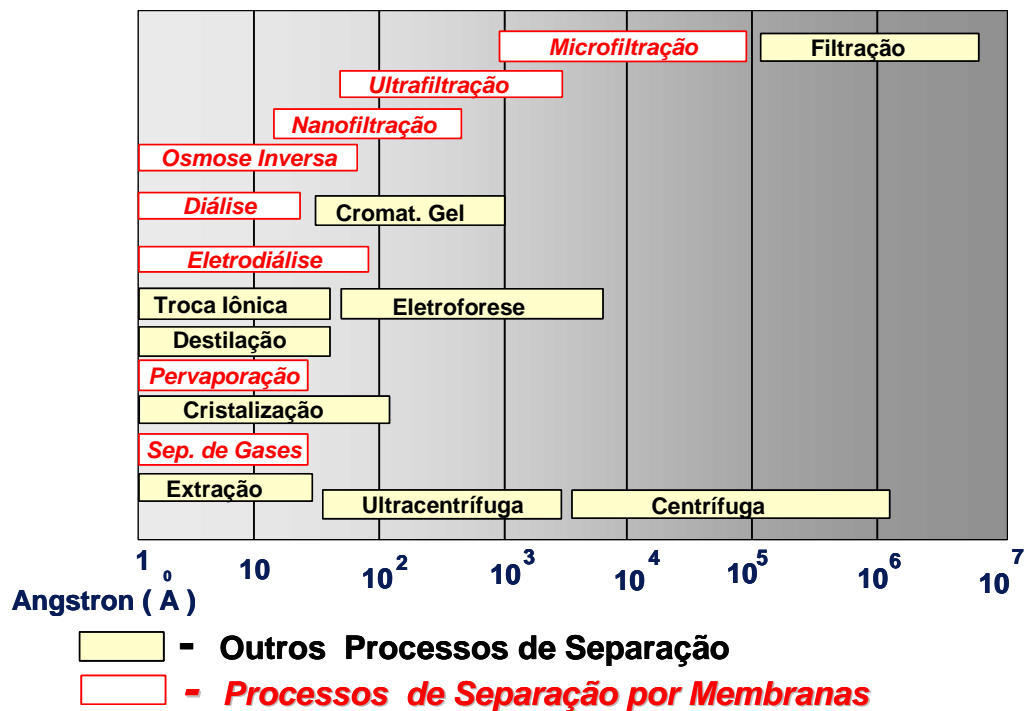


Figura 11 – Comparação entre os processos de separação (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Em uma membrana, o material que permeia através dela é denominado permeado e a fração retida é chamada concentrado, como pode ser visto pela Figura 12.

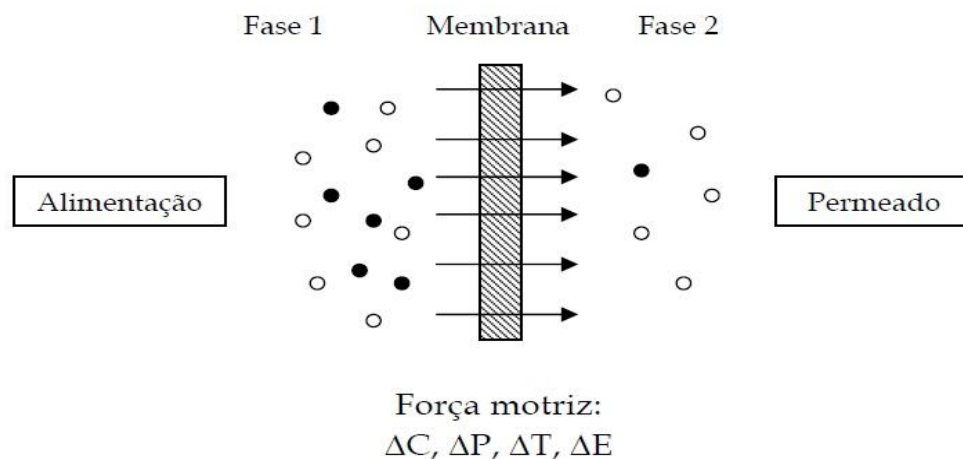


Figura 12– Diagrama esquemático de um processo de separação de misturas utilizando membranas (MULDER, 1996).

A morfologia da membrana e a natureza do material que a constitui são algumas das características que vão definir o tipo de aplicação e a eficiência na separação.

Em função das aplicações a que se destinam as membranas apresentam diferentes morfologias. Em geral, as membranas são classificadas em duas categorias principais: densas e porosas. As características da superfície da membrana que estão em contato com a solução a ser separada é que vão definir a utilização de uma membrana densa ou porosa. A Figura 13 apresenta as morfologias mais comuns de membranas.

Além do fato das membranas serem classificadas como densas ou porosas, podem ser classificadas de acordo com seu material constituinte e sua simetria ao longo da membrana. Assim, elas podem ser:

Homogêneas: constituídas por um único material;

Heterogêneas: constituídas por mais de um material;

Simétricas ou Isotrópicas: apresentam as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura;

Assimétricas ou Anisotrópicas: apresentam gradiente de porosidade na direção perpendicular a sua superfície.

Com relação à geometria, as membranas podem ser planas ou cilíndricas. As primeiras membranas sintetizadas foram planas, contudo os módulos de permeação com esse tipo de membrana, em alguns casos apresentam custos elevados ou não atendem os requisitos técnicos suficientemente. As membranas do tipo tubular apresentam facilidades hidrodinâmicas e processam suspensões com elevado teor de sólidos. Já as membranas de fibras ocas têm como principais vantagens maior relação entre área de membrana e volume do equipamento e o fato de ser auto-sustentável, o que possibilita trabalhar sob pressão sem a necessidade de suporte adicional (MULDER, 1996).

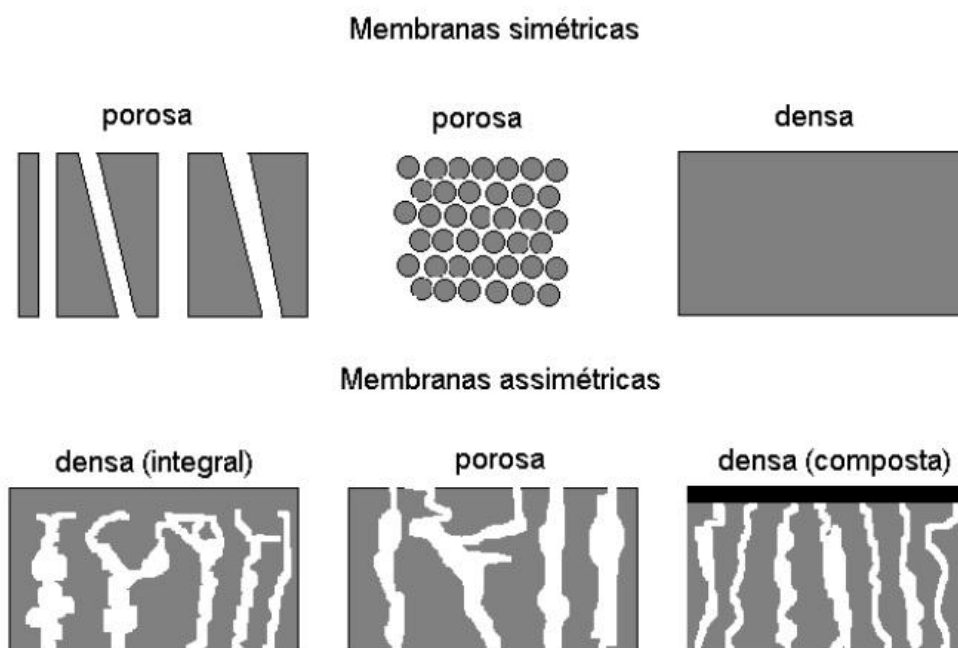


Figura 13– Diferentes morfologias de membranas sintéticas (MULDER, 1996).

Em função da força motriz utilizada para transporte das espécies através da membrana e dos aspectos morfológicos da membrana é possível caracterizar os diferentes processos de separação. Em membranas porosas, onde as espécies presentes devem ser inertes ao material da membrana, estas são transportadas tanto de maneira convectiva (fluxo viscoso) como difusiva em função do tipo de força motriz utilizada. Por exemplo, processos com membranas porosas onde a força motriz é unicamente a diferença de pressão, o transporte é especificamente convectivo, como a microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração. Por outro lado, se a força motriz for a diferença de concentração (diálise) o transporte das espécies ocorre por difusão através dos poros (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Já em membranas densas o transporte depende da afinidade das diferentes espécies a serem separadas com o material da membrana (etapa termodinâmica) e da difusão das mesmas através do filme polimérico (etapa cinética). Exemplos de processos em que a

força motriz é caracterizada pela diferença de concentração em membranas densas podem ser citados: osmose inversa, pervaporação e permeação de gases. Nestes casos, o fluxo permeado é sempre de natureza difusiva, uma vez que a membrana não apresenta poros na interface com a alimentação (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). A classificação dos processos de separação por membranas pode ser observada na Tabela 4.

Dentre os PSM, a microfiltração é um processo que utiliza membranas porosas e o gradiente de pressão como força motriz para a retenção de partículas com diâmetros entre 0,1 e 10 μm , situando-se entre a filtração convencional e a ultrafiltração (BAKER, 2004; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; MULDER, 1996).

A primeira grande aplicação da microfiltração foi durante a Segunda Guerra Mundial para obtenção de água potável (BAKER, 2004). Atualmente, a microfiltração é utilizada em vários setores da indústria, como na alimentícia para a clarificação e esterilização de sucos, vinhos e cerveja, ou na farmacêutica para a concentração e esterilização de fármacos (FRANÇA NETA, 2005).

Na ultrafiltração o tamanho molecular dos solutos varia de 0,1 μm e 0,001 μm , que correspondem a aproximadamente 500 a 300.000 Daltons que se acumulam sobre a superfície da membrana. O fluxo através da membrana é controlado mediante a pressão exercida sobre o líquido a ser filtrado e pode variar de 1,0 e 7,0 bar (FELLOWS, 1994; MEMBRANE SEPARATIONS, 1999).

Tabela 4 – Diferentes tipos de processos de separação por membranas.

<i>Processo</i>	<i>Força Motriz</i>	<i>Material Retido</i>	<i>Material Permeado</i>	<i>Aplicações</i>
Microfiltração	Gradiente de pressão (0,5 – 2 bar)	Material em suspensão, bactérias. Massa molar >500x10 ³ g/mol	Água e sais dissolvidos	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilização e clarificação de vinhos e cervejas • Concentração de células • Oxigenação de sangue
Ultrafiltração	Gradiente de pressão (1 – 7 bar)	Colóides, Macromoléculas Massa molar > 5x10 ³ g/mol	Água, sais solúveis de baixa massa molecular, açúcares	<ul style="list-style-type: none"> • Fracionamento e concentração de proteínas • Recuperação de pigmentos • Recuperação de óleos
Nanofiltração	Gradiente de pressão (5 – 20 bar)	Moléculas de massa molar média entre 500 e 2x10 ³ g/mol	Água, sais e moléculas de baixa massa molecular.	<ul style="list-style-type: none"> • Purificação de enzimas • Biorreatores a Membrana • Dessalinização de águas
Osmose Inversa	Gradiente de pressão (15 – 80 bar)	Todo material solúvel ou em suspensão	Água	<ul style="list-style-type: none"> • Concentração de suco de frutas • Desmineralização de águas
Diálise	Gradiente de concentração	Moléculas de massa molecular maior que 5x10 ³ g/mol	Íons e orgânicos de baixo peso molecular	<ul style="list-style-type: none"> • Hemodiálise – Rim Artificial • Recuperação de NaOH
Eletrodiálise	Gradiente de potencial elétrico	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons	<ul style="list-style-type: none"> • Concentração de soluções salinas • Purificação de águas
Permeação de Gases	Gradiente de pressão/ Gradiente de concentração	Gás menos permeável	Gás mais permeável	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperação de hidrogênio • Separação CO₂/CH₄ • Fracionamento do Ar
Pervaporação	Pressão de vapor	Líquido menos permeável	Líquido mais permeável	<ul style="list-style-type: none"> • Desidratação de álcoois

Fonte: adaptado de Habert; Borges; Nobrega (2006).

O aumento da diferença de pressão através da membrana propicia o aumento do fluxo convectivo de soluto e de solvente, mas também intensifica o aumento de

concentração de soluto próximo a superfície da membrana, criando uma resistência ao escoamento do solvente. Esta condição é influenciada pela velocidade de escoamento, concentração de soluto na alimentação e pela temperatura. O aumento da concentração do soluto próximo à superfície da membrana é denominado de polarização de concentração.

A polarização de concentração é intrínseca ao processo de microfiltração e limita o fluxo permeado. Outro fator que reduz o desempenho do processo e sua utilização mais ampla está relacionado à redução do fluxo permeado com o tempo de operação devido à formação de incrustações (*fouling*) (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; MULDER; 1996). Este fenômeno ocorre quando as partículas carregadas pelo fluxo são depositadas na interface do filtro, ou movidas para o interior deste, constituindo uma zona de menor permeabilidade que na região do fluxo livre anterior ao filtro (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Os sistemas de microfiltração e ultrafiltração podem ser operados de duas formas distintas conforme Figura 14: a operação com filtração convencional, em que a alimentação é forçada perpendicularmente à superfície da membrana (*dead end filtration*) e a operação com filtração tangencial, em que a alimentação escoia paralelamente à superfície da membrana (*cross flow filtration*).

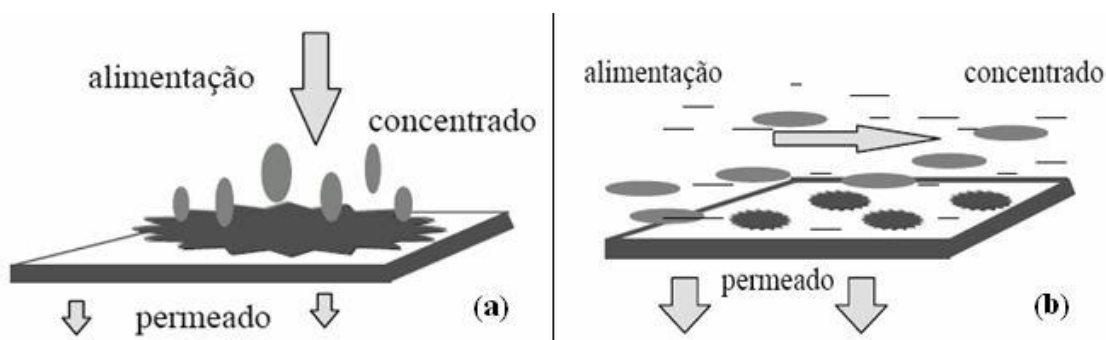


Figura 14 – Modos operacionais em membranas: (a) Convencional; (b) Tangencial Habert; Borges; Nobrega (2006).

Alguns trabalhos utilizando membranas na purificação de hidrolisados podem ser encontrados na literatura como o trabalho desenvolvido por Sjöman et al. (2008), que demonstraram os benefícios da utilização de membranas planas como uma técnica promissora para obtenção de D-xilose pura.

Wickramasinghe; Grzenia (2008) mostraram que o uso de membranas adsortivas e resinas de troca iônica visando a remoção de ácido acético em hidrolisados hemicelulósicos pré-tratados com correção de pH e carvão ativado foram eficientes reduzindo a presença deste contaminante no meio.

2.6.4 Resinas de troca iônica

Troca Iônica é a transferência de íons específicos desde uma solução aquosa pouco concentrada para outra (mais concentrada), por meio de uma resina. O processo utiliza como base o fenômeno de uma resina ser capaz de trocar seus íons, fracamente ligados, por outros provindos da solução aquosa quando a resina e a solução são colocadas em contato. Geralmente é entendido como a troca de íons de carga de mesmo sinal entre uma solução e um material insolúvel em contato com ela. O sólido (trocador de íons) contém seus próprios íons e, para que a troca se processe com rapidez necessária e de maneira extensiva, o sólido deve ter uma estrutura molecular aberta e permeável, de modo que os íons e as moléculas do solvente possam circular livremente pela estrutura (MENDHAM et al., 2002).

Dentre os trocadores de íons com aplicações especiais encontram-se as resinas de troca iônica. Para que estas resinas tenham aplicações nos processos químicos, elas necessitam apresentar propriedades em comum: insolubilidade em água e em solventes orgânicos, conter íons ativos (ou contra-íons) capazes de troca reversível com outros íons em solução e não sofrer modificação física apreciável. A resina de troca iônica é um polímero complexo cuja carga elétrica é exatamente neutralizada pelas cargas dos contra-

íons. Esses íons são cátions em um trocador de cátions e ânions em um trocador de ânions (MENDHAM et al., 2002).

Além da classificação por trocadores de íons, as resinas também são classificadas segundo seus grupos funcionais: catiônica ácido forte, catiônica ácido fraco, aniônica base forte e aniônica base fraca, conforme apresentado na Tabela 5. A definição de fraca ou forte não depende da resina, mas da natureza do íon fixado na matriz polimérica.

A capacidade de troca máxima das resinas é um parâmetro importante no processo de troca iônica e varia segundo as características das resinas, relacionando o tamanho dos poros e a área superficial com as características das soluções a serem tratadas (densidade e viscosidade). Esta capacidade é influenciada também pelos canais preferenciais que podem se formar no leito das resinas, pelo fluxo de alimentação empregado, pelas obstruções ao longo do leito e pela eficiência de regeneração (VIÑALS, 2001).

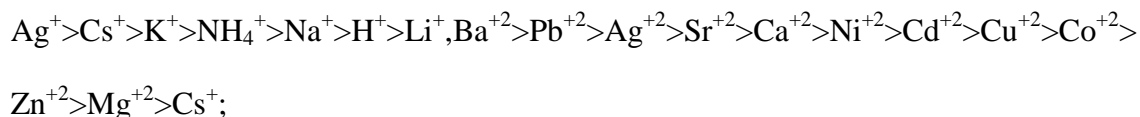
As resinas são comercializadas na forma iônica como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Classificação de Resinas de troca iônica (SOTO et al., 2011; HARLAND, 1994)

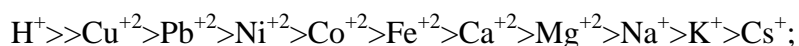
Classificação	Grupo Funcional	Forma Iônica
Catiônica ácido forte	$-\text{SO}_3^-$	$-\text{SO}_3^- \text{H}^+$, $-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$
Catiônica ácido fraco	$-\text{COO}^-$	$-\text{COO}^- \text{H}^+$
Aniônica base forte Tipo1	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ \text{Cl}^-$
Aniônica base forte Tipo2	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})^+$	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})^+ \text{Cl}^-$
Aniônica base fraca	$-\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2^+$ $-\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+ \text{Cl}^-$

A seletividade das resinas depende de fatores como a valência e o tamanho do íon trocado, a forma iônica da resina, a força iônica total da solução, o empacotamento das resinas, o tipo de grupo funcional e a natureza dos íons não trocados. A seguinte sequência representa a ordem de afinidade de diferentes resinas por íons que se encontram em soluções diluídas segundo HARLAND (1994):

- Resinas catiônicas, ácido forte (estirênica-sulfonato):



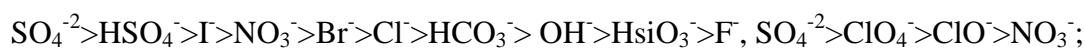
- Resinas catiônicas, ácido fraco (acrílica-carboxilato):



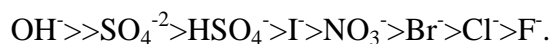
- Resinas aniônicas, base forte tipo 1 (estirênica-amônio quaternário):



- Resinas aniônicas, base forte tipo 2 (estirênica-amônio quaternário):



- Resinas aniônicas, base fraca (estirênicas-amina):



Estudos mostram a eficácia do tratamento com resinas de troca iônica o que significa uma melhora na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. (LARSSON et al., 1999; NILVEBRANT et al., 2001). Processos com resinas de troca iônica têm sido extensivamente usados para reduzir a concentração de elementos tóxicos em muitas áreas da tecnologia e são geralmente utilizadas em colunas. Elas diferem de outros processos de destoxificação devido à sua capacidade de remover compostos orgânicos e inorgânicos (LARSSON et al., 1999). Além disso, as resinas podem ser regeneradas e usadas novamente sem afetar a eficiência do tratamento, diminuindo o custo global (VILLAREAL et al., 2006).

O tratamento de neutralização e/ou purificação de hidrolisados hemicelulósicos com resinas de troca iônica, remove eficientemente não só a cor, mas também compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais que são inibidores do processo fermentativo e não apresenta o problema de perda de D-xilose parecendo ser

um método promissor para o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos (CARVALHO; ALMEIDA e SILVA, 2002).

As Resinas de troca aniônica, como a apresentada na Figura 15, têm sido largamente utilizadas para remover ácido acético de hidrolisados hemicelulósicos (CARVALHO et al., 2004; NILVEBRANT et al., 2001).

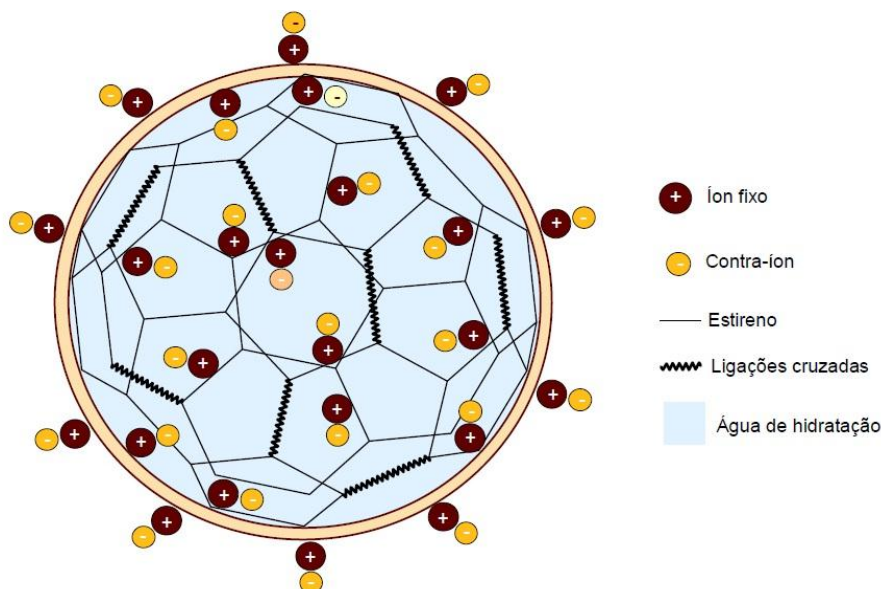


Figura 15– Estrutura superficial e interna de uma resina aniônica.

Em estudos realizados por Carvalho et al., (2004) no tratamento de bagaço de cana-de-açúcar usando quatro tipos de resinas de troca iônica (A-103 S, A-860 S, Applexion cátion e Applexion ânion) ocorreu uma remoção de 82,1% de furfural, 66,5% de HMF, 61,9% de lignina solúvel, 100% de cromo, 46,1% de zinco, 28,5 % de ferro, 14,7% de sódio e 3,5% de níquel. Os açúcares não foram removidos por este tratamento e cada resina agiu especificamente em certo tipo de composto. Resinas de troca aniônica foram muito eficientes removendo furfural, HMF e lignina solúvel tornando assim o hidrolisado apto para a fermentação pela levedura *Candida guilliermondii*.

Canilha; Silva e Solenzal (2004) também confirmaram a eficiência da utilização de resinas Purolite MN-150 (adsorção), Purolite A-860 (aniônica), Applexion (catiônica) e

Applexion (aniônica) nesta sequencia e ao compará-las com carvão ativo, utilizado no tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado tratado com carvão ativo obteve um rendimento de D-xilose a xilitol de 0,667 g/g com uma produtividade de 0,505g/L, enquanto que o hidrolisado tratado com as resinas apresentou um rendimento de D-xilose a xilitol de 0,759 g/g e uma produtividade de 0,681 g/L.h.

Martínez et al. (2007) mostraram que o hidrolisado tratado com resinas de troca iônica na seguinte ordem (MN-150 adsorção, A-860S aniônica forte, C-155S catiônica forte e A-103S aniônica fraca) forneceu um licor rico em D-xilose obtendo uma produtividade de 0,478g/L.h e um rendimento de 0,7502 g/g de xilitol.

Magacho (2009) utilizando processos de separação combinados comprovou a eficiência da utilização de uma sequência de resinas de troca iônica, as quais foram importantes na redução dos compostos inibitórios e redução da cor. Um licor rico em D-xilose foi obtido após os tratamentos combinados obtendo um rendimento de 0,68 g/g em xilitol e 0,30 g/g etanol.

Segundo os estudos comparativos entre diferentes métodos de destoxificação de Chandel et al. (2007) as resinas de troca iônica apresentaram os melhores resultados na remoção de furanos, fenólicos e ácido acético, que pode ser observado no maior rendimento do etanol produzido 0,482 g/g e a produtividade de 0,361 g/L.h.

Diante do exposto, e devido à crescente importância da obtenção de derivados de maior valor agregado a partir de bagaço de cana-de-açúcar, este trabalho visa associar as técnicas apresentadas, sendo elas, coagulação/floculação de impurezas coloidais, processo de separação por membranas e resinas de troca iônica a fim de obter um método de purificação combinado para reduzir os contaminantes capazes de afetar esta bioconversão partindo de um hidrolisado hemicelulósico.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar o uso de diferentes processos de purificação combinados visando a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar para seu aproveitamento em processos biotecnológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ A partir de um hidrolisado não concentrado (original) estudar os efeitos de diferentes agentes coagulantes/floculantes sintéticos e naturais (policloreto de alumínio, quitosana e tanino) e, com o auxílio de planejamento experimental baseado em fundamentos estatísticos, avaliar a influência do pH, temperatura e concentração dos coagulantes utilizando como variáveis de resposta a concentração de compostos fenólicos e a área espectral (indicativo de cor);
- ✓ Estudar o uso de processos de separação por membranas de microfiltração para a remoção de materiais em suspensão ainda presentes no hidrolisado e ultrafiltração para remoção de materiais de alta massa molecular que estão solubilizados no hidrolisado;
- ✓ Avaliar a eficiência do uso de resinas de troca iônica (catiônicas e aniônicas em série) para a remoção dos contaminantes residuais ainda presentes no hidrolisado tratado por membranas;
- ✓ Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar tratado pelos métodos apresentados, na produção de etanol e xilitol.

4 Material e Métodos

4.1 Materiais e Equipamentos

- Bagaço de cana-de-açúcar in natura recém-processado proveniente da Usina Açucareira Furlan S/A (Santa Bárbara D'Oeste – SP);
- Óxido de cálcio comercial;
- Acetonitrila Merck grau CLAE;
- Água ultrapura (MILLIQ®);
- Ácido Sulfúrico P.A;
- Ácido Acético Merck grau CLAE;
- Cloreto de Sódio P.A;
- Hidróxido de Sódio P.A;
- Ácido Clorídrico P.A;
- Coagulantes/floculantes:
 - Policloreto de alumínio (PAC), gentilmente cedido pela Pan-Americana S.A. Indústrias Químicas.
 - Quitosana massa molecular média (Aldrich-Sigma).
 - Tanino (Kuriflock – Kurita do Brasil Ltda.).
- Resinas de troca iônicas, gentilmente cedidas pela Rohm & Haas (Dow Chemical Company):
 - Amberlyst 15 Wet – catiônica forte na forma H^+ ;
 - Amberlite 252 Na – catiônica fraca na forma Na^+ ;
 - Amberlite IRA 96 – aniônica fraca na forma OH^- ;
 - Amberlite FPA 98 – aniônica forte na forma Cl^- .

- Reator Piloto de 360 L em aço inoxidável AISI 316;
- Membranas de microfiltração (0,2 μm) plana de polieterimida PAM membranas;
- Membranas de Ultrafiltração (100 kDaltons) plana de polietersulfona PAM Membranas.
- Agitador mecânico IKA;
- Cone imhoff;
- Balança Analítica GEHAKA AG 200;
- Balança analítica de umidade METTLER TOLEDO modelo HB43-S;
- Placa de agitação magnética/aquecimento Quimis;
- Condutivímetro Cole Parmer com 500;
- Rotaevaporador Buchi 150;
- Bomba de Vácuo GoldSun;
- Cromatógrafo Varian ProStar modelo 500, empregando detector de índice de refração Varian e detector de UV visível marca Varian;
- Colunas cromatográficas Aminex HPX 87H (300x7,8 mm, BIO-RAD) e C-18 (250x4,6mmx1,4”mm Microsorb);
- Cromatógrafo de Íons Metrohm 881 Compact IC pro;
- Espectrômetro de fluorescência de raio-x por energia dispersiva Shimadzu modelo EDX 720/800 HS;
- Espectrofotômetro Varian, Cary 50 conc;
- Espectrofotômetro Hitachi U 1800;
- Shaker Tecnal TE-420
- pHmetro – Mettler Toledo FE20/EL20.

4.2 Obtenção do Hidrolisado hemicelulósico original

A hidrólise foi realizada em um reator de aço inoxidável AISI 316 com volume 360 L, equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto (Figura 16).



Figura 16- Reator piloto utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

O reator foi operado em regime descontínuo e as condições de hidrólise foram: temperatura de 121°C; tempo de reação de 10 minutos; 100mg de ácido sulfúrico (98%) para 1g de bagaço (matéria seca) e uma proporção entre massa seca de bagaço e volume de solução ácida de 1:10. Após a hidrólise o material foi filtrado para remoção de partículas sólidas presentes no líquido. O hidrolisado foi resfriado, caracterizado e armazenado em câmara fria a uma temperatura de 4°C aproximadamente. Este material obtido foi caracterizado quanto aos valores de pH, concentração de açúcares, furfural, HMF, ácido acético, compostos fenólicos e área espectral em todas as etapas de tratamento.

4.3 Coagulação/Floculação do hidrolisado hemicelulósico original

Primeiramente, empregou-se um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} com três experimentos no ponto central. As variáveis de controle e os níveis escolhidos são apresentados na Tabela 6. Em seguida foi aplicado um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, planejamento fatorial 2^3 com 6 ensaios nos pontos axiais e três ensaios no ponto central (Tabela 7).

No planejamento experimental DCCR a temperatura de reação permaneceu constante em 40°C. Os ajustes de pH foram realizados com óxido de cálcio e o tempo de agitação foi fixado em um minuto de agitação rápida (80% da potência da placa de agitação) e quinze minutos de agitação lenta próximo de 50 rpm (KOBBLITZ, 2008). Após 24 horas sob agitação intermitente (15 de agitação por 45 de repouso) o hidrolisado foi separado da fração sedimentada.

Tabela 6–Variáveis de controle do Planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>		
	- 1	0	+ 1
pH	5	7	9
Temperatura (°C)	25	40	55
PAC (mg/L)	0	10	20
Quitossana (mg/L)	0	12,5	25
Tanino(mg/L)	0	50	100

Tabela 7– Variáveis do segundo planejamento experimental (DCCR).

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	-1,68	-1	0	1	1,68
pH	7,0	7,6	8,5	9,4	10,0
Quitossana (mg/L)	12,0	17,2	25,0	32,7	38,0
PAC (mg/L)	5,0	12,1	22,5	32,9	40,0

Na Tabela 8 é apresentada a matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , e a Tabela 9 mostra a matriz experimental do DCCR, ambas realizadas para a etapa de coagulação e floculação.

As variáveis de resposta utilizadas para todos os experimentos foram concentração de compostos fenólicos e área espectral. O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio do software MINITAB® 15.0 e do software Statistica®.

Tabela 8 – Matriz experimental do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

<i>Ensaio</i>	<i>Quitosana (mg/L)</i>	<i>Tanino (mg/L)</i>	<i>PAC (mg/L)</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	-1	-1
3	1	-1	1	1	-1
4	-1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	-1	-1
6	-1	1	1	1	-1
7	1	-1	-1	1	1
8	-1	1	-1	1	1
9	1	1	1	-1	-1
10	-1	-1	1	1	1
11	1	-1	1	-1	1
12	-1	1	1	-1	1
13	1	1	-1	1	-1
14	-1	-1	1	-1	-1
15	1	1	-1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 9 – Matriz experimental do Delineamento Composto Central Rotacional

<i>Ensaio</i>	<i>pH</i>	<i>Quitosana (mg/L)</i>	<i>PAC (mg/L)</i>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	-1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

4.4 Tratamento do hidrolisado coagulado/floculado por Membranas

Os experimentos foram realizados objetivando a determinação do melhor procedimento operacional dos tratamentos por membranas em termos de fluxo permeado e grau de purificação dos permeados (Figuras 17 e 18).

A membrana de microfiltração (MF) foi do tipo fibra oca em polieterimida (PEI) com $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro de poros e a de ultrafiltração (UF) também do tipo fibra oca em polietersulfona (PES) com ponto de corte de 100 kDaltons .

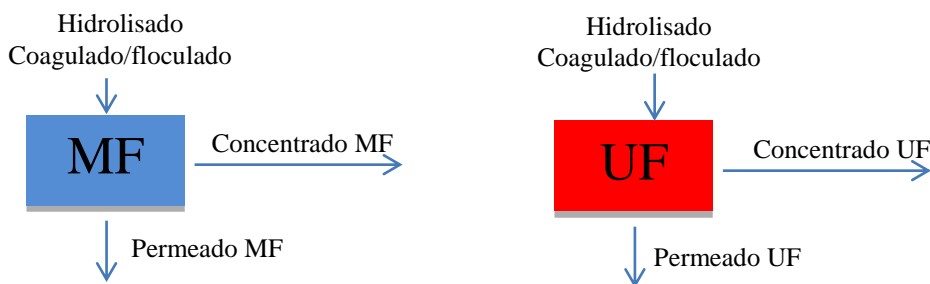


Figura 17– Processo de separação por membranas a serem utilizados (MF – microfiltração e UF – Ultrafiltração).

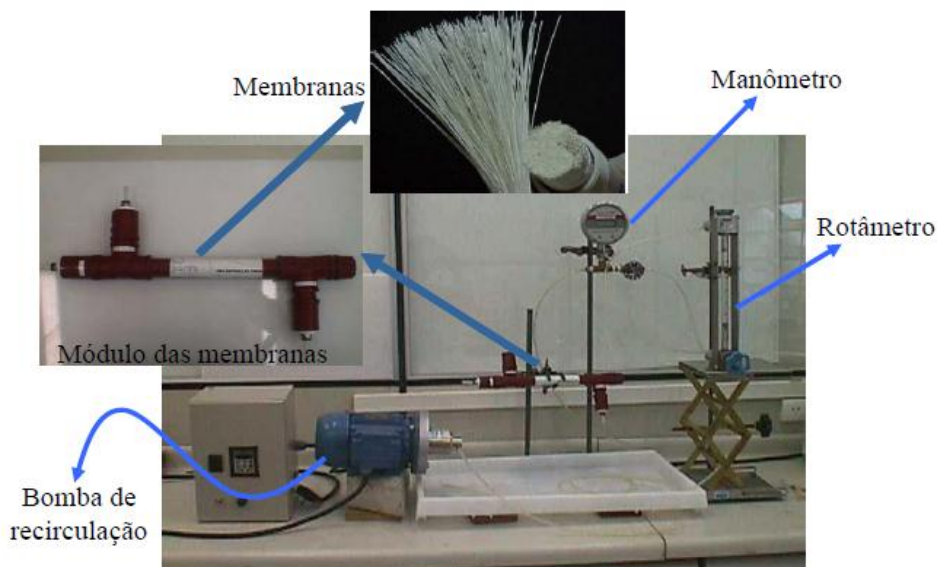


Figura 18 – Sistema de permeação por membranas utilizado e respectivo módulo de membranas.

4.5 Caracterização das resinas de troca iônica

As resinas de troca iônica utilizadas possuem estrutura macrorreticular e matriz de estireno-divenilbenzeno. A resina Amberlyst 15 (catiônica forte na forma H⁺), a Amberlite 252 (catiônica fraca na forma Na⁺), a Amberlite FPA (aniônica forte na forma Cl⁻) e a Amberlite IRA (aniônica fraca na forma OH⁻) possuem capacidade de troca de 1,70 eq.L⁻¹, 1,80 eq.L⁻¹, 0,80 eq.L⁻¹ e 1,25 eq.L⁻¹, respectivamente, de acordo com o fabricante.

4.5.1 Determinação de Massa Específica

A tara de uma proveta foi determinada e em seguida pesou-se 25 mL de cada resina determinando-se a massa específica de cada resina em kg/L.

4.5.2 Determinação de massa específica úmida

As resinas foram submetidas a um processo de inchamento em provetas de 250 mL, previamente pesadas, utilizando-se 100 mL de cada resina para 150 mL de água deionizada, por 24 horas. Após a umidificação das resinas, a água deionizada excedente foi retirada da proveta com o auxílio de pipetas, e as massas úmidas de cada resina foram determinadas em balança analítica.

4.5.3 Determinação do volume de inchamento

Em uma proveta de 250 mL foram adicionados 100 mL de resina original e 150 mL de água deionizada. O volume final ocupado pela resina foi verificado após 24 horas. Este valor indica a quantidade de água absorvida pela resina original e seu volume de expansão.

4.5.4 Determinação de umidade original

Uma massa de aproximadamente 3g de cada resina foi submetida a determinação da umidade em analisador de umidade halógeno METTLER TOLEDO modelo HB43-S. Este equipamento opera segundo o princípio termogravimétrico. Quando não há mais perda de

água e a massa permanece constante, a balança exibe a quantidade de umidade evaporada e o peso de matéria seca da referida amostra.

4.6 Tratamento com resinas de troca iônica

Seguindo a metodologia proposta por Magacho (2009) o hidrolisado tratado por membranas foi submetido ao tratamento com quatro resinas (duas catiônicas e duas aniônicas) em série, sendo elas: Amberlyst 15 Wet – catiônica forte na forma H^+ (R1); Amberlite FPA 98 – aniônica forte na forma Cl^- (R2); Amberlite 252 Na – catiônica fraca na forma Na^+ (R3); Amberlite IRA 96 – aniônica fraca na forma OH^- (R4).

O Volume de Leito (VL) utilizado para cada resina foi de 500 mL, sendo avaliado o perfil de purificação por VL. O hidrolisado percolado foi coletado em porções de 500 mL avaliando a condutividade, o pH, a concentração de açúcares e concentração de contaminantes.

Inicialmente, as resinas de troca iônica foram hidratadas com água deionizada, sendo mantidas nestas condições por 24 horas antes de serem usadas. As colunas foram alimentadas com as soluções regenerantes, água e hidrolisado de forma manual tendo como força motriz a ação da gravidade (FERREIRA et al., 2005).

O ciclo de operação para o trabalho com resinas foi realizado à temperatura ambiente e os seguintes passos foram seguidos:

1. Lavagem Preliminar I: Eliminação de partículas de impureza das resinas que foram utilizadas pela primeira vez, a uma vazão constante de 0,1 VL/min;
2. Regeneração Preliminar: Vazão constante de 0,05 VL/min da solução regenerante (Tabela 10) através do leito das resinas;
3. Lavagem Preliminar II: Eliminação do regenerante residual com água deionizada para não deixar carga adicional, a vazão constante de 0,1 VL/min;

4. Rinsagem: Após a lavagem percola-se o próprio hidrolisado na mesma vazão do tratamento numa quantidade tal que a concentração de D-xilose na saída seja aproximadamente igual à concentração da solução de alimentação. Esta etapa tem como objetivo saturar a resina com o açúcar de interesse, a fim de manter aproximadamente constante a concentração do hidrolisado.

5. Tratamento: O hidrolisado a ser tratado foi alimentado manualmente através da coluna à vazão constante de 0,05 VL/min, até alcançar o estado de equilíbrio entre os íons trocados pela resina e a solução tratada (esgotamento da resina).

6. Lavagem I: Este procedimento foi realizado com água deionizada para remover o material estranho acumulado na resina durante o esgotamento, a uma vazão constante de 0,1 VL/min e volume fixo;

7. Regeneração: Vazão constante de 0,05 VL/min da solução regenerante através do leito de resinas;

8. Lavagem II: Eliminação do regenerante residual com água deionizada para não deixar carga adicional, a vazão constante de 0,1 VL/min.

Tabela 10- Soluções utilizadas para regeneração das resinas de troca iônica.

<i>Resinas</i>	<i>Regenerantes</i>
Amberlyst 15 WET	HCl a 5%
Amberlite FPA 98	NaCl a 10%
Amberlite 252 Na	NaCl a 10%
Amberlite IRA 96	NaOH a 5%

O esgotamento da capacidade da coluna foi determinado quando mudanças significativas no pH e na condutividade do percolado não foram notadas em relação a alimentação.

4.7 Concentração do hidrolisado purificado

O hidrolisado purificado obtido foi submetido ao processo de concentração sob vácuo, a uma temperatura de $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ com o objetivo de aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis, principalmente D-xilose. Para o processo de concentração foi utilizado um rotaevaporador a vácuo. O hidrolisado purificado teve seu volume inicial reduzido três vezes. O hidrolisado concentrado foi caracterizado e utilizado nos testes de bioconversão.

4.8 Testes fermentativos do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar purificado

4.8.1 Microrganismos e preparo dos inóculos

Os experimentos foram realizados com as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037 (ATCC 201935) e *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, cedidas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) EEL-USP, obtidas a partir de culturas estoque mantidas em ágar extrato de malte a 4°C . O inóculo de células de *Candida guilliermondii* foi obtido a partir de culturas estoque, repicadas em ágar extrato de malte (incubadas por 48 horas). Uma alçada de cultura repicada foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo constituído de: 30,0 g/L de D-xilose, 3,0 g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de cloreto de cálcio di-hidratado e 20,0 v/v de extrato de farelo de arroz preparado previamente. O cultivo foi realizado em incubadora de movimento rotatório com agitação de 200 rpm, a 30°C por 24 h. As células foram recuperadas por centrifugação, lavadas em água destilada esterilizada e centrifugadas novamente com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, foi adicionada água estéril para preparar uma suspensão de células que foi utilizada como inóculo (FARIA, 2000).

Para a levedura *Pichia stipitis* uma alçada de cultura repicada foi transferida para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio e a formulação do meio de cultivo sofreu algumas alterações em sua composição: 30 g/L de D-xilose, 1,0 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, 3 g/L de fosfato ácido de amônio e 3,0 g/L de extrato de levedura (SILVA, 2007).

4.8.2 Meios de Fermentação

Os testes de fermentação foram feitos em dois substratos distintos, sendo eles: meio sintético, hidrolisado hemicelulósico concentrado e suplementado, com teor aproximado de 70 g/L de D-xilose e com os mesmos nutrientes empregados no preparo dos inóculos e distribuídos em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 100 mL de meio cada. Cada frasco foi inoculado com 1 g de células suspensas em água destilada estéril. As fermentações foram realizadas durante 196 h para *Candida guilliermondii* e 144h para *Pichia stipitis*, a 30°C e 200 rpm em agitador orbital. As amostras foram coletadas em intervalos de 24 h (MAGACHO, 2009).

4.9 Métodos Analíticos

4.9.1 Determinação do teor de carboidratos

A determinação do teor de carboidratos no hidrolisado foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As amostras foram diluídas e filtradas em membrana de 0,45µm e seguidas de cartucho Sep Pak C18 e encaminhadas ao cromatógrafo com um detector de índice de refração, empregando uma coluna Aminex HPX87H (300x7,8 mm, BIO-RAD). Como fase móvel foi empregado H₂SO₄ 0,005 mol/L com vazão de 0,6 mL/min a 45°C e volume de amostra 20 mL, assim as concentrações de D-glicose, D-

xilose, L-L-arabinose e ácido acético foram determinadas. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A conversão em equivalentes de celulose, hemicelulose e grupos acetil foi obtida pela correção das concentrações obtidas por CLAE considerando a massa seca do material inicial e os fatores de hidrólise. Os fatores de conversão de D-glicose e celobiose para celulose são 0,9 e 0,95, respectivamente. Da mesma forma, D-xilose e L-arabinose foram convertidos à hemicelulose e os fatores usados foram 0,88 e 0,88, respectivamente. Para o ácido acético a conversão utilizada foi de 0,72.

4.9.2 Determinação do teor de furfural e HMF

O furfural e HMF presentes no hidrolisado ácido foram analisados por CLAE. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em membrana de 0,45 μ m e encaminhadas ao cromatógrafo com detector de UV visível empregando uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm Microsorb), e como fase móvel, solução de acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético, num fluxo de 0,8mL/min a 30°C; volume de amostra 20 μ L. Todas as análises foram realizadas em duplicata

As concentrações de furfural e HMF foram obtidas a partir de curvas de calibração traçadas para cada componente sendo convertidos em equivalentes de hemicelulose e celulose, e os fatores de conversão aplicados foram 1,3749 e 1,2857, respectivamente (ROCHA, 2000).

4.9.3 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

Para determinação da lignina insolúvel em meio ácido foi utilizado o método Klason modificado (ROCHA et al., 1997). As frações foram secas em estufa a 105°C, com granulometria de 0,250 mm (60 mesh) para bagaço bruto. O bagaço foi extraído em sistema soxhlet empregando como solvente o etanol hidratado 92,8° INPM. O bagaço

extraído foi seco em estufa a 105°C até massa constante a qual foi determinada em balança analítica.

Uma amostra de aproximadamente 2,0 g de matéria-prima sem umidade adicionada em um béquer de 150 mL, juntamente com 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72%, e assim, submetido à hidrólise ácida a 45°C. Agitou-se a mistura com bastão de vidro por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada. A amostra foi transferida quantitativamente para um erlenmeyer de 500 mL elevando-se o volume de água para 275 mL. Para a completa hidrólise de oligômeros o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 15 min a 1,05 atm. Após a descompressão, o frasco foi retirado da autoclave e levado a temperatura ambiente (ROCHA, 2000).

O hidrolisado foi separado dos sólidos por filtração utilizando-se papel de filtro previamente tarados. O hidrolisado foi recolhido em balão de 500 mL, e o material retido contido no papel de filtro foi lavado com porções de água destilada até o volume do balão. Este balão foi armazenado para análise posterior. A lignina presente no papel de filtro (parte insolúvel) foi lavada com água destilada até que sulfatos ficassem ausentes (aproximadamente 1500 mL) e, então, secas em estufa a 105°C até se obter peso constante.

A solução foi armazenada para análises posteriores de lignina solúvel, carboidratos, furfural e HMF.

4.9.4 Determinação de lignina solúvel

Para determinação de compostos fenólicos (lignina solúvel), uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido foi alcalinizada com NaOH 6,5 mol/L até atingir pH 12,5 e diluída em balão volumétrico de 50 mL. A absorbância a 280 nm foi determinada em Espectrofotômetro Varian, Cary 50 conc, utilizando como referência água destilada pH 12,5. Determinou-se a concentração de lignina solúvel a partir da Equação 1.

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \text{ Eq (1)}$$

Onde:

C_{lig} = concentração de lignina em g.L^{-1}

$A_{\text{lig}280}$ = absorvância da solução de lignina, em 280 nm

$A_{\text{pd}280} = c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2$: absorvância, em 280nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE e ε_1 e ε_2 foram determinados por espectrometria de UV e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L/g.cm (ROCHA, 2000).

4.9.5 Determinação do teor de cinzas

Na determinação de cinzas totais foram pesados aproximadamente 2 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente tarado. Em seguida, a amostra foi calcinada lentamente até 300°C e mais 2h a 800°C, em uma mufla. Por diferença de massa, o teor de cinzas foi determinado conforme Equação 2.

$$\% \text{ cinzas} = \text{Mc/Ma} \cdot 100 \quad \text{Eq (2)}$$

Onde: % cinzas – percentual em massa de cinzas;

Mc – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);

Ma – massa da amostra seca (GOUVEIA et al., 2009).

4.9.6 Determinação de íons

Os íons Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} e Fe total foram quantificados por cromatografia de íons e espectrometria de fluorescência de raio-x.

4.9.7 Determinação da área espectral

A área espectral (indicativo de cor) foi determinada por espectrometria de UV-vísivel em um Espectrofotômetro Varian Cary Modelo 50 conc. Foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda na faixa de 400 nm até 700 nm e a área abaixo da curva gerada calculada.

4.9.8 Determinação da concentração celular

A concentração celular no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro Hitachi U 1800 e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída. As medidas foram feitas em suspensões diluídas, após centrifugação, e ressuspensão das células em água destilada (SILVA, 2007).

4.9.9 Determinação dos parâmetros fermentativos

- Rendimento em produto por D-xilose consumida: $Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S$
- Rendimento em células por D-xilose consumida: $Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S$
- Produtividade volumétrica: $Q_p = \Delta P / t$
- Eficiência: $\eta = (Y_{p/s} \text{ obtido} / Y_{p/s} \text{ teórico}) * 100(\%)$.

Sendo:

ΔP : variação da concentração de xilitol/etanol;

ΔS : variação da concentração de xilose;

ΔX : variação da concentração celular;

t: tempo de fermentação;

$Y_{p/s}$ teórico = 0,51 para o etanol e 0,917 para xilitol.

4.9.10 Determinação das permeabilidades hidráulica e do hidrolisado

A permeabilidade hidráulica em membranas de micro e ultrafiltração foram determinadas a partir da identificação do coeficiente angular da reta representativa da variação do fluxo permeado em função da pressão aplicada utilizando água microfiltrada ou ultrapura. As membranas de microfiltração foram submetidas previamente compactação.

De maneira similar, foram determinadas as permeabilidades do hidrolisado que se diferenciam apenas pela não utilização de água e sim do material em estudo.

5 Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina Furlan foi caracterizado de acordo com os métodos analíticos descritos no item 4.9 e sua composição pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11– Composição do bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes do bagaço	Concentração (%)
Celulose	39,4 ± 0,6
Hemicelulose	32,7 ± 0,7
Lignina Insolúvel	18,2± 0,6
Lignina Solúvel	2,56± 0,13
Cinzas Totais	2,82± 0,14
Extrativos	3,47± 0,46
Total	99,2 ± 2,6

Segundo Peng et al., (2009) os materiais lignocelulósicos são compostos de 40-45% de celulose, 25 a 35% de hemicelulose e 30-35% de lignina. Esta afirmativa é válida para o bagaço utilizado neste estudo, com exceção da lignina que apresentou um valor abaixo destes limites. Contudo, outros trabalhos como Pandey et al, (2000) afirmam que especificamente o bagaço de cana, dependendo da variedade pode apresentar teores de lignina mais reduzidos quando comparados a outros materiais lignocelulósicos. Nos estudos de Cardona; Quintero e Paz (2010) eles afirmam que o teor de lignina varia entre 20-30% concentração que pode ser observada no presente trabalho que possui 39,4% de celulose, 32,7% de hemicelulose e 20,8% lignina total. Diante disto é possível verificar que os teores da caracterização estão de acordo com a literatura.

No trabalho de Pandey et al. (2000) o bagaço de cana-de-açúcar apresentou um baixo teor de cinzas (2,4%) o que representa vantagem em comparação com outros materiais como palha de arroz (17,5%) e palha de trigo (11,0%), ou seja, influenciando pouco na

composição do bagaço. Pode-se observar na Tabela 11 que o bagaço utilizado neste trabalho apresentou um teor de cinzas (2,82%) similar ao apresentado por estes autores.

5.2 Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico

Duas bateladas de hidrólise ácida branda foram realizadas em escala piloto totalizando o uso de 40 kg de bagaço seco. No total foram obtidos 240 L de hidrolisado, volume estimado como suficiente para realização de todo o trabalho. O hidrolisado obtido para este estudo foi caracterizado e os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12- Composição e características físicas do hidrolisado hemicelulósico original

<i>Parâmetros</i>	<i>Hidrolisado</i>
pH	1,31
D-glicose (g/L)	1,22± 0,02
D-xilose (g/L)	22,3 ± 0,1
L-arabinose (g/L)	2,06± 0,01
Furfural (g/L)	0,50± 0,01
HMF (mg/L)	10,7 ± 0,1
Compostos Fenólicos (g/L)	3,23± 0,01
Acido Acético (g/L)	4,38± 0,01
Área Espectral (u.a.)	796± 1

O principal objetivo do pré-tratamento (hidrólise ácida) é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa. Este tipo de pré-tratamento pode ser feito com ácido diluído ou concentrado, mas a utilização de ácidos concentrados é menos atrativa devido à alta concentração de compostos inibidores formados. Além disso, a corrosão dos equipamentos aumenta os custos e reduz a utilização em escala industrial. A hidrólise pode ser realizada em altas temperaturas (180°C) durante curto tempo, ou em uma temperatura menor (120°C) e uma retenção maior (30-90 min). O principal ácido utilizado é o sulfúrico, mas existem trabalhos que investigaram a utilização de outros ácidos como o clorídrico, o nítrico (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010) e o fosfórico (GÁMEZ et al., 2006).

Além dos açúcares monoméricos (D-xilose, D-glicose e L-arabinose) e oligômeros ocorre também a formação de compostos inibidores como o furfural, HMF, ácido acético e

derivados fenólicos. É importante ressaltar que os compostos inibidores gerados durante a hidrólise com ácido diluído estão em menor concentração se comparados à hidrólise com ácidos concentrados. A presença destes compostos afeta o metabolismo dos microrganismos no estágio de fermentação (ALVIRA et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

No hidrolisado hemicelulósico a D-xilose é o açúcar predominante e a presença de D-glicose pode inibir o metabolismo da D-xilose em algumas leveduras, dependendo da concentração dessa hexose no meio de fermentação (SILVA; FELIPE; RODRIGUES, 2004; PREZIOSI-BELLOY; NOLLEAU; NAVARRO, 1997).

O hidrolisado obtido apresentou uma mistura de açúcares contendo 66,91% de D-xilose, 3,67% de D-glicose e 6,20% de L-arabinose em relação à massa seca. O possível efeito inibitório da presença de D-glicose será avaliado e discutido no item 5.7 (ensaios fermentativos).

Segundo a literatura as concentrações destes compostos variam em função da biomassa utilizada e das condições de hidrólise empregadas para que a fração hemicelulósica seja extraída (SILVA et al., 1998). A presença de compostos como furfural e HMF no hidrolisado original confirma a degradação parcial de pentoses e hexoses durante a reação hidrólise com ácido diluído.

5.3 Coagulação/Floculação Seletiva de impurezas coloidais

O hidrolisado proveniente das duas hidrólises foi homogeneizado e submetido à etapa de coagulação/floculação. Esta etapa foi dividida em duas fases com relação ao planejamento de experimentos e otimização, sendo a primeira baseada em um fatorial fracionado 2^{5-1} , com três experimentos no ponto central, totalizando 19 ensaios (Tabela 8). Na segunda fase, após análise dos resultados da primeira sequência de experimentos, foi

proposto um DCCR que consistiu em um planejamento experimental fatorial de 2^3 , com três ensaios no ponto central e seis ensaios nos pontos axiais, totalizando 17 experimentos (Tabela 9).

5.3.1 Planejamento experimental fatorial fracionado

Considerando os resultados obtidos na primeira fase, onde foram avaliadas as variações dos compostos fenólicos e área espectral (Tabela 13) em conjunto com as informações obtidas pelo tratamento estatístico (Minitab[®] e statistica) foi possível avaliar o grau de significância de cada variável de controle, para ambas as variáveis de resposta.

Em relação ao primeiro planejamento, com os resultados obtidos no teste de significância dos efeitos principais, teste de hipótese, a um nível de confiança de 95% para os compostos fenólicos e para área espectral, foram construídos os diagramas de Pareto apresentados nas Figuras 19 e 20. Na sequência, também foram estimados os valores de p-valor, responsáveis pela determinação da significância de cada variável em análise (Tabelas 14 e 15).

Analisando o diagrama de Pareto para redução dos compostos fenólicos foi observado que a variável pH e o efeito combinado das variáveis teor de quitosana e pH foram significativas, pois apresentaram valores de t calculado superiores ao t tabelado de 4,303 (grau de liberdade 2 e nível de confiança de 95%). Ainda assim, próximo do limite de confiança, a variável de controle concentração de PAC pode ser considerada como um fator influente. No entanto, para a variável resposta área espectral, não foi observada nenhum variável de controle com significância estatística, sendo as mais influentes o pH e a interação de pH com quitosana, situação semelhante à anterior.

Tabela 13– Condições experimentais do planejamento fatorial fracionado e teor de compostos fenólicos e área espectral.

Ensaio	Quitosana (mg/L)	Tanino (mg/L)	PAC (mg/L)	pH	Temp. (°C)	Compostos Fenólicos (g/L)	Área espectral (u.a)
1	25	100	20	9	55	1,26	300
2	0	100	0	5	25	2,34	489
3	25	0	20	9	25	1,91	446
4	0	0	0	9	25	2,32	452
5	25	0	0	5	25	2,50	696
6	0	100	20	9	25	2,19	384
7	25	0	0	9	55	2,21	366
8	0	100	0	9	55	2,50	196
9	25	100	20	5	25	2,29	321
10	0	0	20	9	55	1,99	334
11	25	0	20	5	55	2,42	295
12	0	100	20	5	55	2,35	990
13	25	100	0	9	25	1,82	380
14	0	0	20	5	25	2,47	827
15	25	100	0	5	55	2,55	252
16	0	0	0	5	55	2,27	923
17	12,5	50	10	7	40	1,76	172
18	12,5	50	10	7	40	1,97	636
19	12,5	50	10	7	40	1,80	321

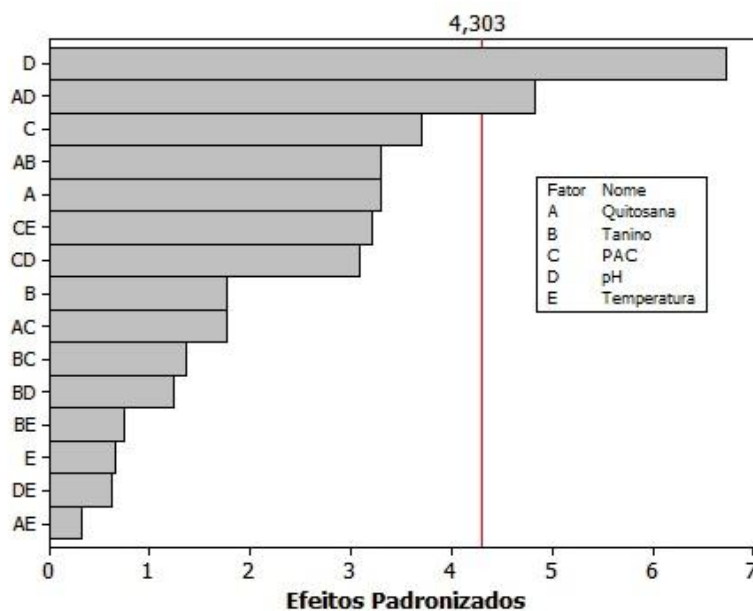


Figura 19– Diagrama de Pareto em função dos efeitos das concentrações de compostos fenólicos para o planejamento fatorial fracionado.

Ainda nos diagramas de Pareto para ambas variáveis de resposta é observado também que os efeitos secundários, principalmente onde a quitosana esteve presente,

apresentaram maior significância, evidenciando que as interações existentes durante a coagulação/floculação interferem no tratamento estatístico nos níveis escolhidos. Entre os fatores merecem destaque o pH, PAC e a quitosana.

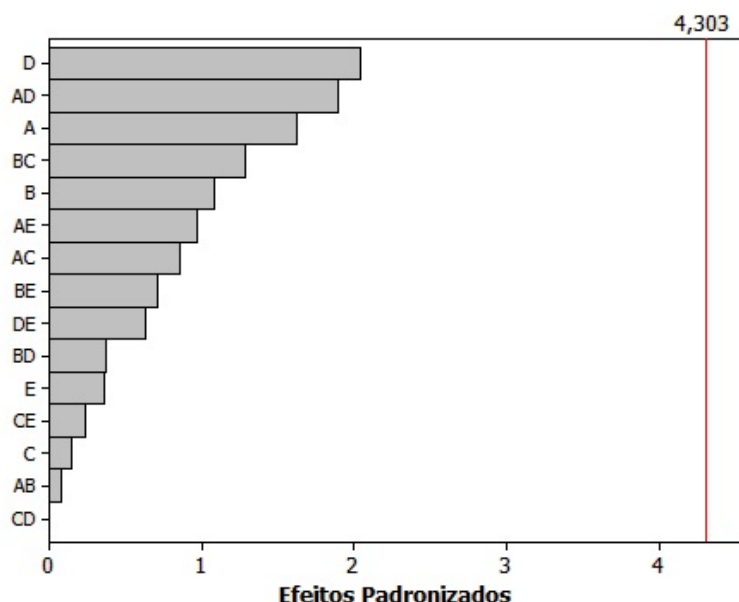


Figura 20– Diagrama de Pareto em função dos efeitos para área espectral para o planejamento fatorial fracionado.

Tabela 14– Determinação dos valores de t e do p -valor de cada termo para a resposta teor de compostos fenólicos no primeiro tratamento estatístico.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	t	p – valor
Média	2,21	0,03	79,82	< 0,0001
Quitosana	-0,09	0,03	-3,29	0,081
Tanino	-0,05	0,03	-1,77	0,219
PAC	-0,10	0,03	-3,69	0,066
pH	-0,19	0,03	-6,72	0,021
Temperatura	-0,02	0,03	-0,65	0,582
Quitosana x tanino	-0,09	0,03	-3,30	0,081
Quitosana x PAC	-0,05	0,03	-1,77	0,219
Quitosana x pH	-0,13	0,03	-4,83	0,040
Quitosana x Temp.	<0,01	0,03	0,31	0,785
Tanino x PAC	-0,04	0,03	-1,36	0,306
Tanino x pH	0,03	0,03	-1,24	0,340
Tanino x Temp.	0,02	0,03	0,73	0,541
PAC x pH	-0,09	0,03	-3,07	0,092
PAC x Temp.	-0,09	0,03	-3,21	0,085
pH x Temp.	-0,02	0,03	-0,62	0,596

Corroborando com as afirmações anteriores, na análise dos valores do teste t (Tabela 14) os únicos efeitos que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) para a variável resposta compostos fenólicos foram os fatores pH isolado e a interação pH com quitosana. A quitosana isolada não apresentou significância, no entanto sua interação com o pH foi significativa, por esta razão o parâmetro isolado não pode ser desconsiderado, como afirmado Domenech (2010). Como o teor de PAC apresentou um valor muito próximo ao limite de significância (0,066) ele também foi considerado para a adequação do modelo.

Tabela 15– Determinação dos valores de t e do p-valor de cada termo para a resposta área espectral no primeiro tratamento estatístico.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	t	p – valor
Média	478,10	59,22	8,07	0,0015
Quitosana	-96,30	59,22	-1,63	0,245
Tanino	-64,20	59,22	-1,08	0,391
PAC	9,00	59,22	0,15	0,893
pH	-121,00	59,22	-2,04	0,178
Temperatura	-21,10	59,22	-0,36	0,755
Quitosana x tanino	-4,70	59,22	-0,08	0,944
Quitosana x PAC	-50,50	59,22	-0,85	0,484
Quitosana x pH	111,90	59,22	1,89	0,199
Quitosana x Temp.	-57,50	59,22	-0,97	0,434
Tanino x PAC	75,70	59,22	1,28	0,329
Tanino x pH	22,00	59,22	0,37	0,746
Tanino x Temp.	41,70	59,22	0,70	0,554
PAC x pH	-0,20	59,22	<0,001	0,997
PAC x Temp.	13,70	59,22	0,23	0,838
pH x Temp.	-37,10	59,22	-0,63	0,595

Ainda analisando os resultados da Tabela 14, também foi obtido o coeficiente de determinação (R^2) de 98,79% e o coeficiente de correlação R de 99,39%. O coeficiente de determinação demonstrou que os fatores escolhidos (pH, temperatura, concentrações de Quitosana, PAC e tanino) para o estudo da variação de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico, foram responsáveis por 98,79% da variabilidade da resposta avaliada.

Através do coeficiente de correlação obtido conclui-se que existe uma elevada relação entre os fatores estudados e a resposta compostos fenólicos.

A variável resposta área espectral não apresentou significância estatística ($p < 0,05$), nem mesmo reduzindo o nível de confiabilidade para 90%. Estes resultados podem ser explicados considerando, como hipótese, que as substâncias orgânicas remanescentes, após tratamento e nas condições finais (principalmente o pH) mantiveram intactos seus núcleos cromóforos ou, ainda, os tornaram mais ativos, promovendo maior absorção de radiação na região do visível e, portanto, maior área espectral.

Para a área espectral e com base no tratamento estatístico realizado o coeficiente de determinação foi de 89,23% e o coeficiente de correlação igual a 94,46%. Isto demonstra uma baixa relação entre os fatores estudados e a variável de resposta em estudo, se comparado ao obtido para a variável compostos fenólicos.

Outro recurso disponível com o tratamento estatístico dos resultados é a avaliação dos efeitos principais individualizados, para cada variável resposta (Figuras 21 e 22). Através da intensidade da inclinação das retas obtidas é possível observar o quanto cada fator é significativo para o modelo dentro dos limites escolhidos. Assim, analisando a variável pH constata-se a ocorrência de maior inclinação em relação aos demais fatores e as inclinações para os fatores, e as inclinações para as concentrações de PAC e quitosana foram menos acentuadas, mas não menos significantes. Observa-se também que quanto maiores as concentrações de quitosana e PAC maiores as reduções de compostos fenólicos.

Analisando os efeitos principais para a área espectral novamente observa-se que o pH foi a variável de maior influência juntamente com a concentração de quitosana. Por outro lado, a concentração de tanino apresentou uma inclinação ligeiramente menor. Com a menor concentração de PAC ocorreu a maior redução de área espectral, mas sem

significância, visto que a inclinação foi pequena (Figura 22). Para esta variável resposta a temperatura apresentou maior influência se comparada com a redução de compostos fenólicos mostrado na Figura 21.

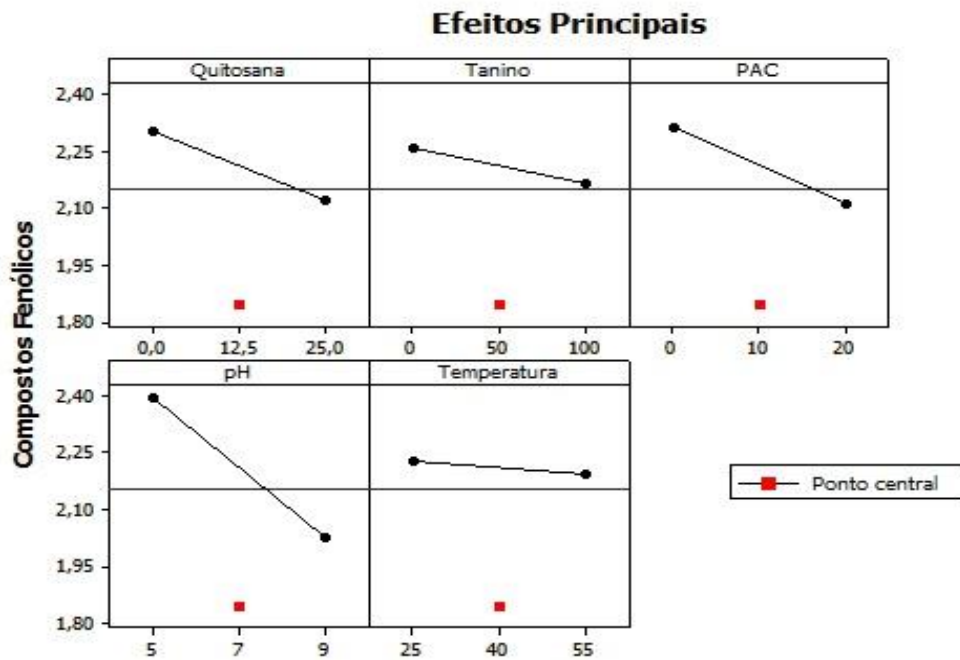


Figura 21– Efeitos principais em função das concentrações de compostos fenólicos para o planejamento fatorial fracionado.

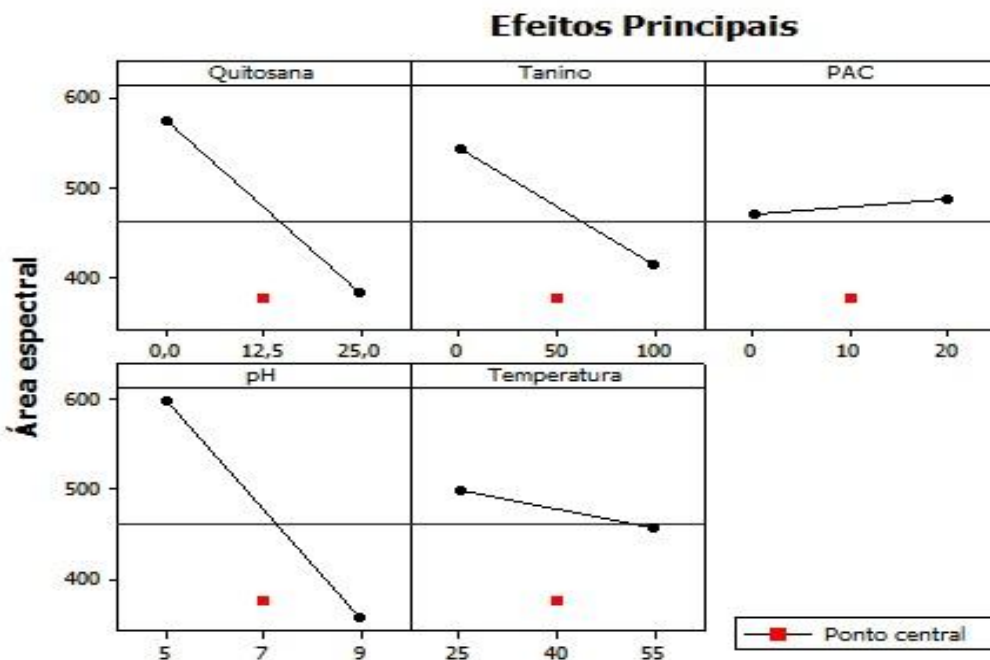


Figura 22– Efeitos principais em função da área espectral para o planejamento fatorial fracionado.

Em síntese, dos 19 experimentos realizados a partir do planejamento fatorial fracionado, o que apresentou o melhor índice de remoção de compostos fenólicos foi o ensaio um com redução de 61,0% deste contaminante, salientando que todos os fatores foram usados no nível alto. Já o ensaio que apresentou a pior remoção foi o décimo quinto com redução de apenas 21,1%. Neste experimento foram utilizados os maiores níveis de concentração de quitosana e tanino, a maior temperatura, ausência de PAC e pH reduzido.

Em relação à área espectral o melhor resultado foi obtido para o ensaio oito (excluindo o décimo sétimo, ponto central, utilizado para estimar erros), onde ocorreu uma redução de 75,4% em relação a cor, e o pior ensaio foi o décimo segundo onde a área espectral ultrapassou o valor obtido para o hidrolisado original. Isto pode ter ocorrido devido ao surgimento de novos cromóforos em função de reações com os reagentes químicos presentes, ou intensificação dos cromóforos em função de complexos formados pela incorporação dos agentes coagulantes/floculantes.

5.3.2 Planejamento experimental do tipo DCCR

Com base nos resultados obtidos no primeiro planejamento experimental foi,então, proposto o segundo planejamento do tipo DCCR como citado anteriormente, utilizando níveis mostrados na Tabela 9.

Este novo planejamento permite uma investigação mais precisa dos efeitos destas variáveis para remoção de compostos fenólicos e redução da área espectral, por consequência, abrangendo um maior numero de pontos experimentais.

Neste novo planejamento optou-se por estudar níveis de pH mais elevados que o utilizado no primeiro, pois foi verificado que o melhor pH de trabalho estava próximo de 9. Critérios semelhantes foram adotados para as variáveis de controle teores de quitosana e PAC, onde reduções de compostos fenólicos e área espectral de 61,0% e 62,0%,

respectivamente, foram obtidas nos valores elevados destas variáveis, no primeiro planejamento.

Os resultados obtidos neste novo planejamento são mostrados na Tabela 16 e é possível concluir que a melhor redução de compostos fenólicos ocorreu no ensaio 3 com uma significativa remoção também da área espectral.

Com um nível de confiança de 95% foram obtidos os coeficientes dos modelos matemáticos que descrevem as características de redução dos compostos fenólicos e área espectral em função das variações do pH e teores dos coagulantes/floculantes, também apresentado nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 16– Condições experimentais segundo tratamento estatístico e teor de compostos fenólicos e área espectral ao final de cada tratamento.

Ensaio	pH	Quitosana (mg/L)	PAC (mg/L)	Compostos Fenólicos (g/L)	Área Espectral (u.a)
1	7,61	17,3	12,1	1,72	220
2	9,39	17,3	12,1	1,75	640
3	7,61	32,7	12,1	1,32	181
4	9,39	32,7	12,1	1,44	521
5	7,61	17,3	32,9	1,67	133
6	9,39	17,3	12,1	1,65	445
7	7,61	32,7	32,9	1,70	145
8	9,39	32,7	32,9	1,65	468
9	7,00	25,0	22,5	1,81	163
10	10,00	25,0	22,5	1,66	358
11	8,50	12,0	22,5	1,61	384
12	8,50	40,0	22,5	1,54	324
13	8,50	25,0	5,0	1,61	316
14	8,50	25,0	40,0	1,91	431
15	8,50	25,0	22,5	1,69	354
16	8,50	25,0	22,5	1,68	322
17	8,50	25,0	22,5	1,78	337

Os parâmetros que apresentaram significância estatística para os compostos fenólicos ($p < 0,05$) foram a concentração de quitosana, a concentração de PAC, a concentração de quitosana ao quadrado e interação entre quitosana e PAC. Analisando os dados obtidos para área espectral foi observado que a única variável influente foi o pH.

Tabela 17– Determinação dos valores de *t* e do *p*-valor de cada termo para a resposta teor de compostos fenólicos no segundo tratamento estatístico.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i> – valor
Média	1,720	0,05	34,2	<0,001
pH	-0,008	0,01	-0,532	0,611
Quitosana	-0,035	0,01	-2,469	0,043
PAC	0,041	0,01	2,922	0,022
pH ²	-0,037	0,01	-0,400	0,701
Quitosana ²	-0,024	0,01	-2,573	0,037
PAC x PAC	<0,001	0,01	-0,060	0,954
Quitosana x pH	0,003	0,01	0,243	0,815
PAC x pH	-0,010	0,01	-0,889	0,403
Quitosana x PAC	0,033	0,01	2,992	0,020

Tabela 18- Determinação dos valores de *t* e do *p*-valor de cada termo para a resposta área espectral no segundo tratamento estatístico.

Fatores	Coefficientes	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i> – valor
Média	336,52	53,58	6,281	<0,001
pH	126,27	25,18	5,015	0,002
Quitosana	-16,38	25,18	-0,651	0,536
PAC	15,45	25,18	0,614	0,559
pH ²	-24,06	27,74	-0,867	0,415
Quitosana ²	9,13	27,74	0,329	0,752
PAC x PAC	16,19	27,74	0,584	0,578
Quitosana x pH.	-8,64	32,88	-0,263	0,800
PAC x pH	33,16	32,88	1,008	0,347
Quitosana x PAC	-24,64	32,88	-0,750	0,478

Estes resultados indicam que o valor de pH na faixa estudada pouco influencia na redução dos compostos fenólicos, contudo os agentes coagulantes foram significativos. Para área espectral apenas o coeficiente do fator pH apresentou significância, indicando que os demais coeficientes não são importantes para o modelo, havendo necessidade de melhor análise desses parâmetros.

Nesse sentido, optou-se pela utilização da análise de variância (ANOVA) que avalia numericamente a qualidade de ajuste de um modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). Estas análises estatísticas sobre os modelos quadráticos são apresentados para ambas variáveis de respostas nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19-ANOVA para variável de resposta Compostos Fenólicos.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>N° de g.L</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	0,244109	9	0,027088	0,055
Resíduos	0,053538	7	0,007693	
Falta de ajuste	0,047472	5	0,009557	0,260
Erro Puro	0,006067	2	0,003033	
Total	0,297647	16		
<hr/>				
% de variação explicada:	82,01%			
% máxima de variação explicável:	97,96%			

Tabela 20-ANOVA para variável resposta Área Espectral.

<i>Fonte de variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>N° de g.L</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>p-valor</i>
Regressão	253448	9	28160,8	0,067
Resíduos	60541	7	8648,8	
Falta de ajuste	60033	5	12006,7	0,021
Erro Puro	508	2	254,0	
Total	313989	16		
<hr/>				
% de variação explicada:	80,72%			
% máxima de variação explicável:	99,83%			

Através da ANOVA é possível considerar válido somente o modelo quadrático para compostos fenólicos, pois a falta de ajuste não foi significativa para um grau de confiança de 95% e p-valor de 0,26. A variância explicada em torno da média para este modelo foi de 82%, um valor acima do limite de 75%, ou seja, acima do qual o modelo é considerado adequado (DOMENECH, 2010).

Os resultados da ANOVA para a variável de resposta área espectral mostrou que o modelo quadrático não foi adequado, considerando o termo de falta de ajuste i significativo $p < 0,05$, apesar da variância explicada estar acima de 75%.

Com esta análise fica demonstrado que o modelo quadrático para os compostos fenólicos tem validade e é apresentado na equação 2.

$$[C.Fenólicos] = 1,72 - 0,008 \text{ pH} - 0,035 \text{ quitosana} + 0,041 \text{ PAC} - 0,037 \text{ pH}^2 - 0,024 \text{ quitosana}^2 + 0,003 \text{ quitosana} * \text{pH} - 0,010 \text{ PAC} * \text{pH} + 0,033 \text{ quitosana} * \text{PAC} \quad (\text{EQ 2})$$

A partir desse modelo matemático foram gerados os gráficos de curva de contorno para as interações entre as variáveis estão representados nas Figuras 23 a 28.

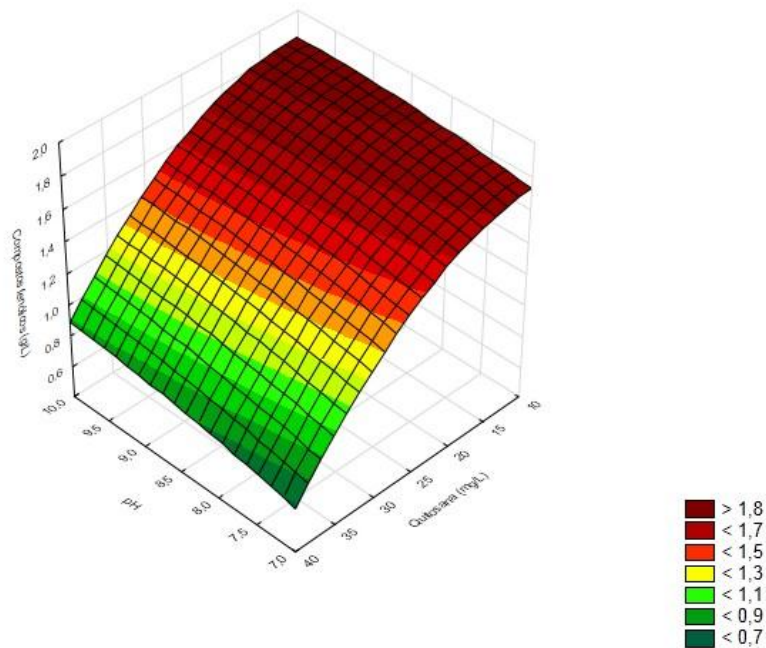


Figura 23 - Superfície de resposta para variável compostos fenólicos em função do teor de quitosana e pH a partir do DCCR.

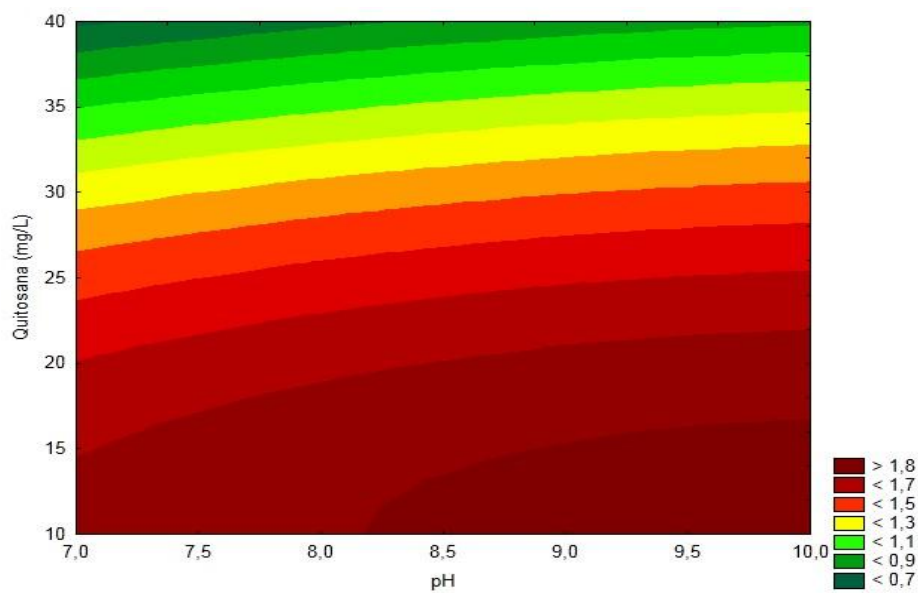


Figura 24- Curvas de contorno para compostos fenólicos em função do teor de quitosana e pH.

Considerando as curvas de contorno e curvas de superfície apresentadas é possível observar resultados expressivos com relação à redução de composto fenólicos utilizando níveis elevados de quitosana para toda faixa de pH. Diferentemente, analisando a influência do PAC observa-se que os melhores resultados são obtidos em pH elevado e altas concentrações deste coagulante.

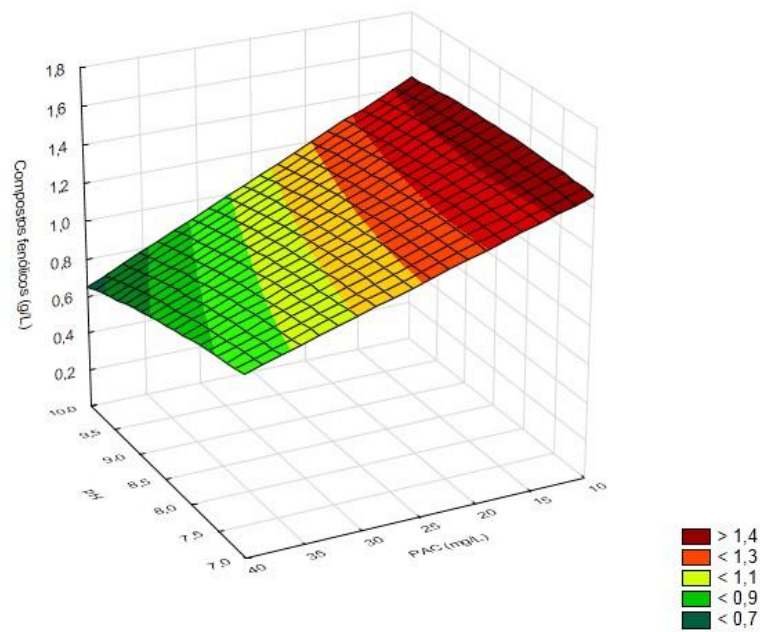


Figura 25- Superfícies de resposta para a variável compostos fenólicos do teor de PAC em relação ao pH a partir do DCCR.

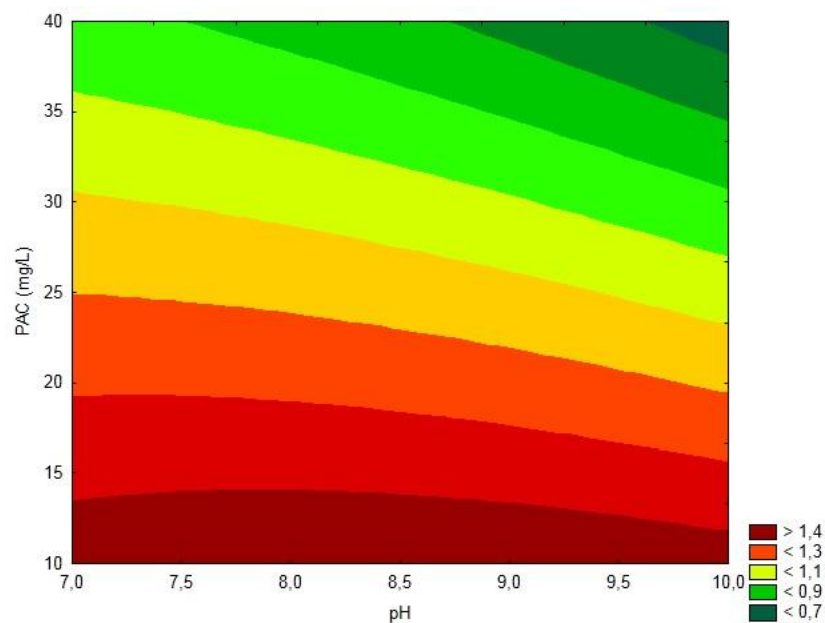


Figura 26 - Curvas de contorno para compostos fenólicos em função do teor de PAC e do pH.

Analisando as Figuras 27 e 28 onde os efeitos combinados dos dois coagulantes são indicados observa-se que os melhores resultados foram obtidos pela combinação de altos teores de quitosana e reduzidos teores de PAC.

No mesmo sentido, estudos realizados por Pan et al., (1999) em que os pesquisadores compararam a performance da quitosana e do PAC, em água bruta, numa razão mássica de 1:1, em pH 7 observaram que a quitosana e a mistura dos dois coagulantes/floculantes tiveram valores semelhantes de turbidez residual, mas valores de remoção muito superiores aos alcançados com PAC. Verificaram ainda que o tratamento com quitosana produziu flocos grandes e com velocidade de sedimentação em torno de 1,5 vezes mais rápida que PAC.

Eikebrokk e Saltnes (2001) também estudaram a utilização em conjunto do PAC e quitosana e verificaram que essa mistura se mostrou vantajosa, devido ao alto custo da PAC e ao aumento da eficiência de remoção de turbidez. Analisando-se a mistura de quitosana e PAC na proporção de 4:1, a taxa de sedimentação dos flocos resultantes foi melhor quando comparada com a quitosana e o PAC em separado.

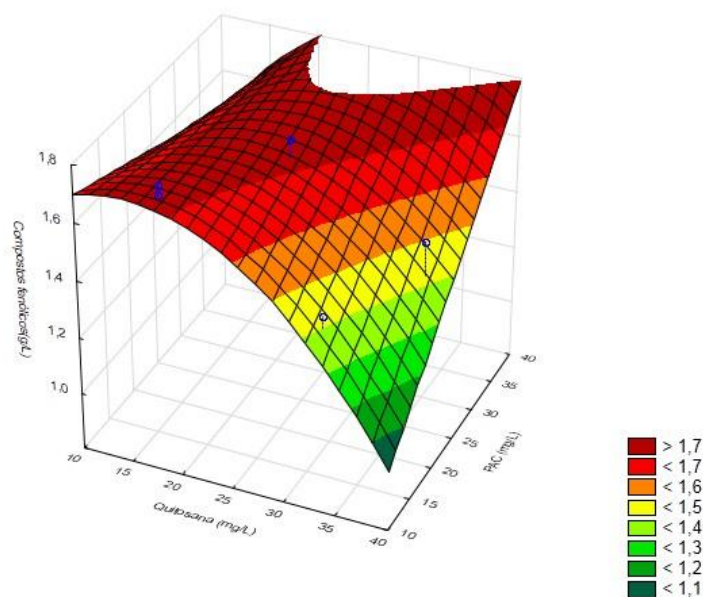


Figura 27- Superfície de resposta para variável compostos fenólicos a partir do DCCR.

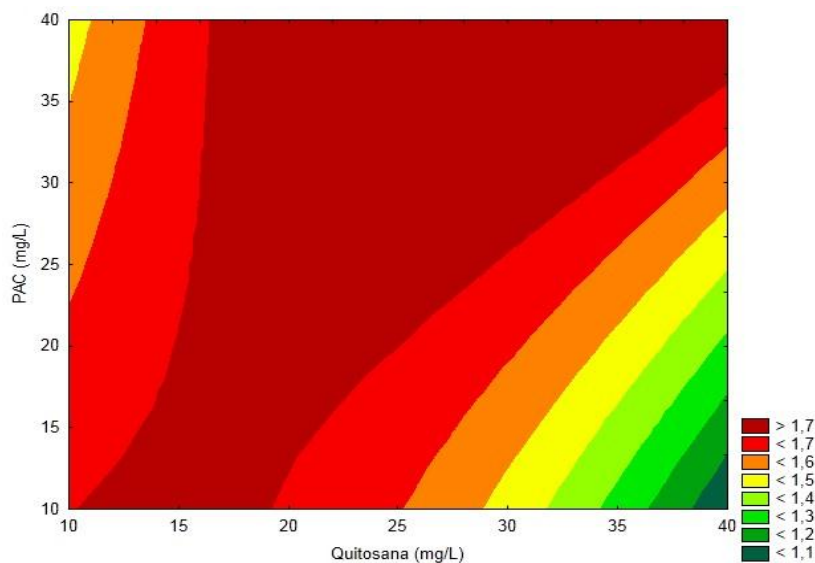


Figura 28- Curvas de contorno para os compostos fenólicos em função do teor dos coagulantes.

Concluindo e analisando individualmente os resultados dos ensaios realizados para o DCCR(Tabela 16) é possível observar o ensaio três apresentou os melhores resultados para reduções de compostos fenólicos de 59,1% e área espectral (indicativo de cor) de 77,2%, nas condições de pH 7,61, quitosana 32,74 mg/L e PAC 12,08 mg/L.

Estas condições, juntamente com os resultados obtidos coincidem com as observações dos gráficos de curva de contorno, a partir das quais foi proposta uma condição ótima para ampliação de escala da etapa de coagulação/floculação proposta neste trabalho que consistiu nos seguintes valores: pH de 7,61, concentração de 32,74 mg/L de quitosana e 12,08 mg/L de PAC, mantendo-se constante a temperatura de 40°C. Vale ressaltar que o pH próximo a neutralidade faz com que o consumo de óxido de cálcio seja reduzido e a proporção entre os coagulantes seja ambientalmente favorável, considerando a redução do uso de um coagulante químico.

Nesta condição otimizada foram realizadas algumas bateladas aumentando a escala de trabalho de 400 mL para 4000 mL, com o propósito de obter o volume necessário de hidrolisado para utilização nas etapas subsequentes. Após homogeneização do hidrolisado tratado obtido este foi caracterizado e os resultados apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Características do hidrolisado tratado por coagulação/floculação escala ampliada.

<i>Parâmetros</i>	<i>Hidrolisado Original</i>	<i>Hidrolisado Coagulado/floculado</i>
pH	1,31	7,61
D-glicose (g/L)	1,22	0,67
D-xilose (g/L)	22,3	21,9
L-arabinose(g/L)	2,06	1,79
Compostos Fenólicos (mg/L)	3,23	1,51
Furfural (g/L)	0,50	0,33
HMF (mg/L)	10,7	22,5
Ácido Acético (g/L)	4,38	4,35
Área Espectral (u.a)	796	258

Pode-se observar na Tabela 21 que a ampliação de escala da melhor condição estudada nos planejamentos experimentais foi satisfatória, pois apresentou reduções de 53,3% compostos fenólicos e 67,9% da área espectral. Nestas condições foi detectada uma perda de 1,40% de D-xilose, o carboidrato de maior interesse. Reduções semelhantes deste carboidrato foram obtidas por Parajó; Dominguez e Dominguez (1998) que observaram perdas de até 4% de D-xilose após o tratamento de hidrolisado com óxido de cálcio.

Ainda analisando os resultados da Tabela 21 é possível observar que o teor furfural foi reduzido em 34,0%. A redução do ácido acético no meio foi muito pequena, resultado semelhante ao encontrado por Felipe et al., (1993) que observaram uma pequena remoção de ácido acético apenas utilizando a correção de pH.

Com os resultados obtidos foi dada sequência ao trabalho iniciando o tratamento por membranas poliméricas de microfiltração e ultrafiltração, como proposto no item 4.4.

5.4 Processos de separação por membranas

A partir de um hidrolisado tratado por coagulação/floculação na condição otimizada foi avaliada outra tecnologia de purificação que consistiu no uso de dois tipos de membranas diferentes uma de microfiltração e outra de ultrafiltração. A membrana de microfiltração (MF) usada foi do tipo fibra oca em polieterimida (PEI) com 0,45µm de

diâmetro de poros e a de ultrafiltração (UF) também do tipo fibra oca em polietersulfona (PES) com ponto de corte de 100 kDaltons .

Para análise do desempenho das membranas inicialmente foram determinadas suas permeabilidades hidráulicas antes das permeações com hidrolisado. Neste procedimento foi utilizada água microfiltrada para MF e água ultrapura para UF a diferentes pressões de trabalho. Em seguida, a permeabilidade do hidrolisado coagulado/floculado foi determinada utilizando a mesma metodologia citada no item 4.4. O objetivo desta etapa foi determinar o valor de pressão ideal (ΔP) para condução das permeações (fluxo limite). O fluxo limite, ΔP , indica o limite em que o aumento da pressão tende a promover a perda de proporcionalidade entre ΔP e o fluxo permeado.

O estudo da permeabilidade hidráulica para as membranas de microfiltração foi realizado em módulos de bancada com densidades de empacotamento de $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$, comprimento útil de 0,26 m, número de fibras igual a 138 e área de permeação útil de $0,08 \text{ m}^2$. A permeabilidade hidráulica encontrada para membrana de microfiltração é apresentada na Figura 29.

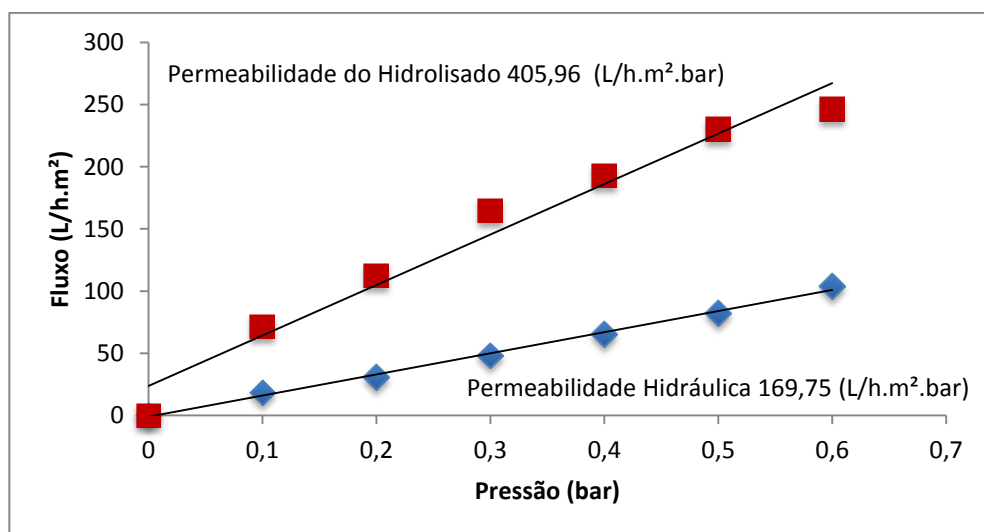


Figura 29 – Permeabilidade hidráulica e do hidrolisado em membranas de microfiltração.

Durante os experimentos de permeabilidade do hidrolisado nas membranas microfiltração de polieterimida foi observado um valor significativo de fluxo, o qual foi maior que a permeabilidade da água em 140%, fato incomum em membranas deste tipo considerando a elevada pureza da água em comparação com o hidrolisado. Uma possível explicação para esse fato pode ser a característica de hidrofiliidade do polímero da membrana. As membranas de fibra oca de polieterimida utilizadas possuem um caráter hidrofílico que em combinação com as características do hidrolisado, uma solução aquosa complexa em íons e açúcares, propiciou um sensível mobilidade da estrutura polimérica que por consequência, propiciou altos fluxos iniciais deste hidrolisado (NUNES; PEINEMANN, 1992).

A seguir, o mesmo procedimento experimental foi adotado para as membranas de ultrafiltração, utilizando água ultrapura para determinação da permeabilidade hidráulica. As membranas foram submetidas a diferentes pressões e sendo determinado o fluxo de água correspondente, assim, a permeabilidade hidráulica foi de 13,32 L/h.m².bar. O valor da permeabilidade do hidrolisado também foi determinado e o resultado obtido foi de 4,59 L/h.m².bar (Figura 30). Neste experimento, uma redução de 65,6% na permeabilidade do hidrolisado foi observada em relação à permeabilidade hidráulica e,este fato, deve estar relacionado com as características hidrofóbicas da membrana e possíveis incrustações de macromoléculas sob a superfície, materiais estes que adsorvem facilmente sobre essas membranas causando maior resistência ao fluxo. Também é possível observar na Figura 30 uma leve tendência de redução da intensidade de crescimento do fluxo acima de uma pressão de trabalho de 1,5 bar caracterizando, assim, o fluxo limite para esta membrana.

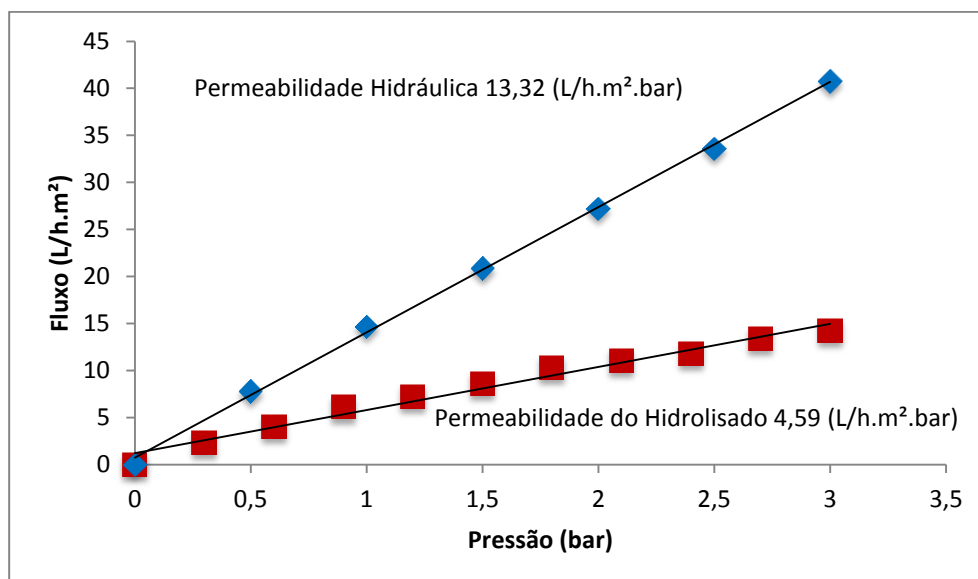


Figura 30 – Permeabilidade hidráulica e do hidrolisado na membrana de ultrafiltração.

Após as permeações por MF e UF os permeados e concentrados de cada tipo de membrana foram caracterizados e os resultados apresentados na Tabela 22. Comparando os valores encontrados para ambos os permeados, a utilização das membranas de ultrafiltração mostrou maior eficácia na remoção de compostos fenólicos potenciais inibidores a fermentação.

Tabela 22– Características do hidrolisado após permeação em membranas de micro e ultrafiltração.

<i>Parâmetros</i>	<i>Permeado MF</i>	<i>Concentrado MF</i>	<i>Permeado UF</i>	<i>Concentrado UF</i>
pH	6,43	6,43	6,43	6,43
D-glicose (g/L)	0,65	0,71	0,67	0,64
D-xilose (g/L)	21,1	22,8	22,2	21,2
L-arabinose(g/L)	1,64	1,82	1,75	1,66
C. Fenólicos (g/L)	1,40	2,45	1,13	2,36
Furfural (g/L)	0,220	0,270	0,210	0,180
HMF (mg/L)	12,60	14,80	13,80	16,30
Ácido Acético (g/L)	4,24	4,53	4,45	4,27
Área Espectral (u.a)	123	351	88	331

A UF permitiu a redução de 25,2% compostos fenólicos contra apenas 7% quando usadas membranas de MF. Com relação ao furfural e HMF os permeados de ambas as membranas apresentaram valores similares, correspondendo a remoções aproximadas de 36% e 37%, respectivamente para cada contaminante. Complementando e analisando o parâmetro área espectral para ambas as membranas foi possível observar uma redução de 65,9% no permeado de UF contra 52,3% no permeado de MF. Isto evidencia a importante redução de contaminantes em suspensão e outras macromoléculas presentes neste hidrolisado, que é claramente observado através de uma inspeção visual nestes materiais (Figura 31).

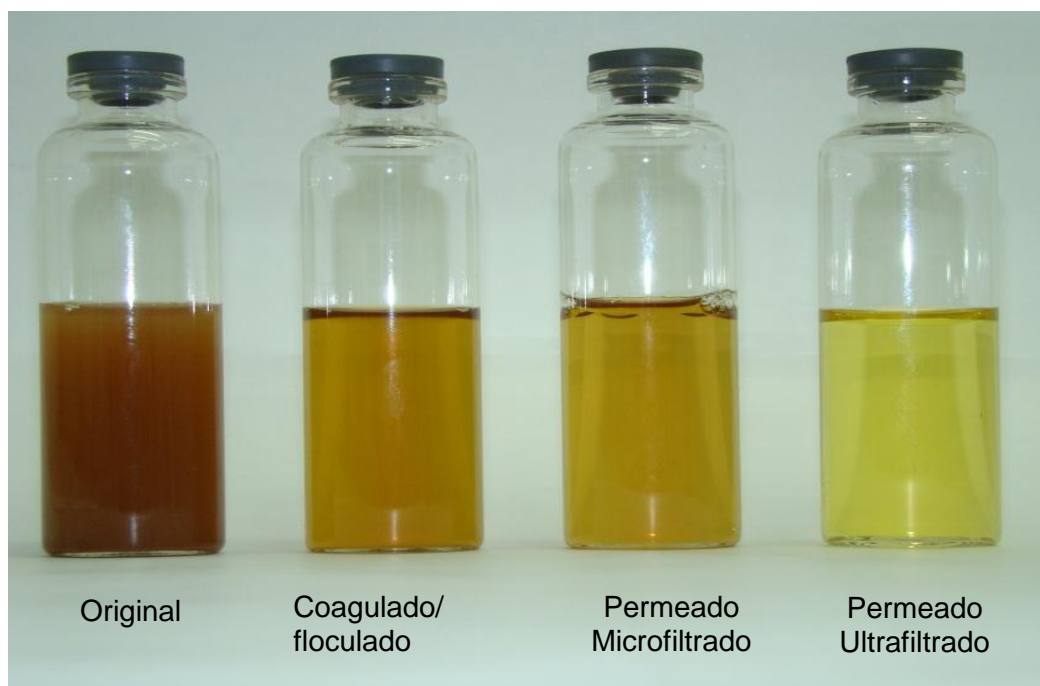


Figura 31 – Aspecto Visual do hidrolisado original e dos tratamentos realizados.

Com a análise desses resultados foi possível concluir previamente que a membrana mais eficiente foi a de ultrafiltração, contudo frente a grande diferença entre as permeabilidades do hidrolisado a favor da membrana de MF optou-se em avaliar a capacidade operacional das membranas de UF a fim de justificar a escolha desta

membrana. Neste sentido, foram realizados testes de recuperação de fluxo com sucessivas lavagens das membranas. As lavagens foram realizadas com água ultrapura seguidas de água alcalinizada com NaOH a pH 10. O limite indicativo para o início de cada lavagem foram fluxos inferiores a 3 L/h.m^2 (Figura 32). Ao todo sete ciclos de lavagens foram realizados e as taxas de recuperação variaram de 68% a 88% em função do tempo de contato entre a membrana e a solução de limpeza. Quando esta solução permaneceu por mais de 24 horas em contato e em repouso com as membranas, uma recuperação de 88% foi alcançada (lavagem 3). Em contrapartida, a lavagem realizada sem tempo extra de contato (lavagem 4) não apresentou recuperação do fluxo. As demais lavagens ocorreram com tempos de contato de aproximadamente 15 horas.

Diante destes resultados ficou comprovado a necessidade de um tempo de contato adequado entre a solução de limpeza e as membranas a fim de garantir recuperações sensíveis do fluxo, aumentando a vida útil das membranas.

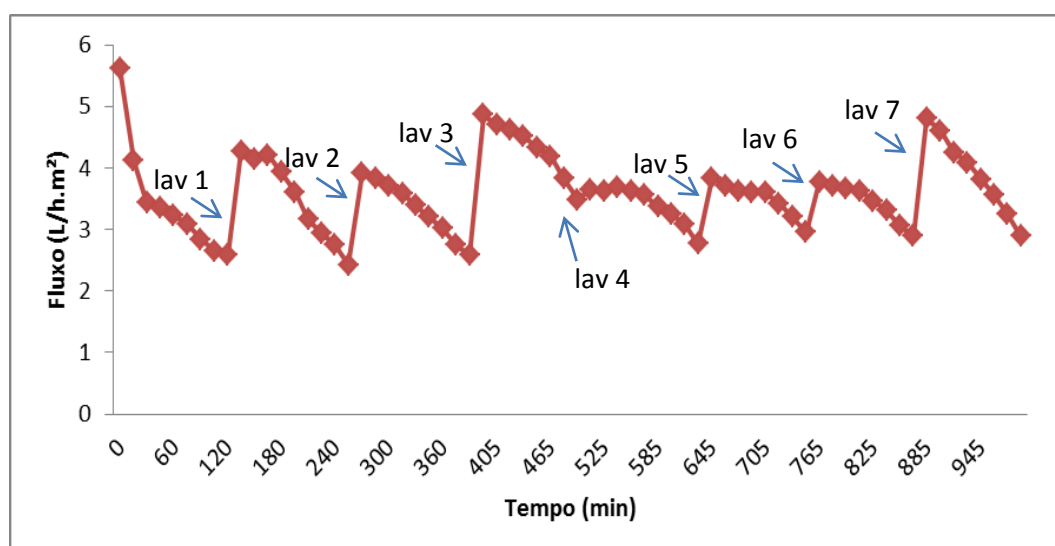


Figura 32-Variação do fluxo do permeado no processo de ultrafiltração.

Após os testes positivos de regeneração das membranas de ultrafiltração e dos respectivos fluxos permeados do hidrolisado foi possível dar continuidade aos experimentos subsequentes considerando a UF como a membrana mais adequada. Sendo assim, todo hidrolisado coagulado/floculado ainda disponível foi submetido a UF e homogeneizado conjuntamente com todos os permeados obtidos durante os testes de lavagens para recuperação de fluxo da UF.

A seguir, todo o hidrolisado coagulado/floculado e permeado por UF (aproximadamente 12 litros) foi submetido ao tratamento com resinas de troca iônica seguindo a série proposta por Magacho (2009).

5.5 Resinas de troca Iônica

Todas as resinas utilizadas foram sintetizadas a partir de uma matriz de estireno-divinilbenzeno (estireno-DVB) e a sequência de percolação adotada foi definida a partir dos estudos realizados por Magacho (2009).

Em resumo, os volumes de leite úteis percolados (hidrolisado coletado com a resina em estado pleno de atuação) obtidos com o uso da primeira resina da série foram homogeneizados e seus parâmetros avaliados. A seguir, utilizando o homogeneizado útil coletado na Resina 1 (R1) iniciou-se a percolação através da segunda resina da série (R2), e assim sucessivamente com todas as resinas da sequência. Desta forma, o hidrolisado inicial para uma resina foi o hidrolisado percolado pela resina anterior e, para a primeira resina hidrolisado inicial foi oriundo do tratamento por membranas de ultrafiltração. Ressalta-se ainda, a necessidade de gerar uma quantidade maior de hidrolisado percolado pela primeira resina, a fim de compensar as perdas por rinsagens das demais e, assim, sucessivamente para as resinas subsequentes.

5.5.1 Caracterização das Resinas de Troca Iônica

Todas as resinas utilizadas foram caracterizadas visando determinar informações importantes como, por exemplo, a capacidade de absorção de água e o volume de inchamento. Segundo Harland (1994) em resinas de matriz de estireno divinilbenzeno quanto menor a porcentagem de DVB, menores quantidades de ligações cruzadas e mais água ela é capaz de absorver. Por consequência, absorção de água superior a 50% indica um maior número de grupos funcionais presentes e, portanto, maior capacidade de troca.

A massa específica úmida possibilita avaliar de forma indireta o grau de retenção de água na estrutura polimérica da resina e os valores da caracterização são apresentados na Tabela 23.

Ainda de acordo com a Tabela 23, a resina R3 possui a menor massa específica, no entanto apresentou 67% de absorção de água em sua matriz polimérica. Assim, conclui-se que a resina R3 apresenta menor porcentagem de DVB em comparação com as outras resinas testadas. Observa-se também que a R4 apresentou um aumento de apenas 51,5% em sua massa específica original, confirmando a alta porcentagem de DVB em sua estrutura.

Tabela 23 – Características das Resinas de Troca Iônica.

<i>Resinas</i>	<i>Umidade Original [%]</i>	<i>Massa Específica [kg/L]</i>	<i>Massa Específica Úmida [kg/L]</i>	<i>Volume de Inchamento (%)</i>
Amberlyst 15 Wet (R1)	48,1	0,713	1,11	2,00
Amberlite 252 Na (R2)	42,1	0,751	1,17	2,00
Amberlite IRA 96 (R3)	57,9	0,582	0,973	3,00
Amberlite FPA 98 (R4)	66,8	0,658	0,996	0,00

O volume de inchamento referente a resina R3 apresentou o maior resultado o que demonstrou sua alta capacidade de reter água em relação às outras resinas, acentuando seu caráter hidrofílico.

5.5.2 Variação do pH e condutividade para a série de resinas

Como citado anteriormente, o hidrolisado inicial, oriundo dos tratamentos por coagulação/floculação seguido da ultrafiltração, foi submetido ao tratamento por uma série de resinas, utilizando um volume de leito (VL) de 500 mL para cada. Para as quatro resinas foi avaliado o perfil de purificação por VL de hidrolisado percolado, ou seja, coletou-se amostras do hidrolisado percolado a cada 500 mL, determinando a condutividade e o pH. Estes parâmetros são importantes, pois o esgotamento da capacidade de troca da coluna é determinado quando mudanças significativas são detectadas no pH e na condutividade do percolado. Assim, à medida que o pH e a condutividade se aproximam dos valores do hidrolisado de entrada, tem-se um indicativo da perda de capacidade de troca da resina devendo esta, então, ser regenerada (MAGACHO, 2009).

Nas Figuras 33 a 36 são apresentados os perfis de pH e condutividade durante a percolação do hidrolisado pelas resinas R1, R2, R3 e R4, respectivamente. Nota-se que na primeira resina da série (R1) o pH ácido obtido com a percolação do 1º VL foi mantido até o 10º VL, evidenciando seu caráter catiônico, liberando H^+ no meio. A partir do 11º VL a resina R1 apresentou sinais típicos de saturação, pois o pH do percolado foi de 1,54 no 10º VL para 3,72 no 11º VL. No 12º VL o pH já era de 4,74. Ao mesmo tempo, a condutividade diminuiu de 12,13 mS para 5,38 mS entre os volumes 9 e 10. Assim, devido a estes resultados optou-se por descartar o 11º e 12º volumes de leito, e foi dado início aos procedimentos de regeneração da resina. Após a regeneração e retomada do processo, observa-se nitidamente a redução do pH e o aumento da condutividade como no início do ciclo anterior, confirmando a eficiência da regeneração com HCl a 5%. Após a primeira

regeneração foram percolados mais dez volumes de leito e, no 21º VL, foi observada novamente a queda da condutividade e o aumento do pH. Com isso, os volumes 21 e 22 foram descartados e uma nova regeneração foi realizada.

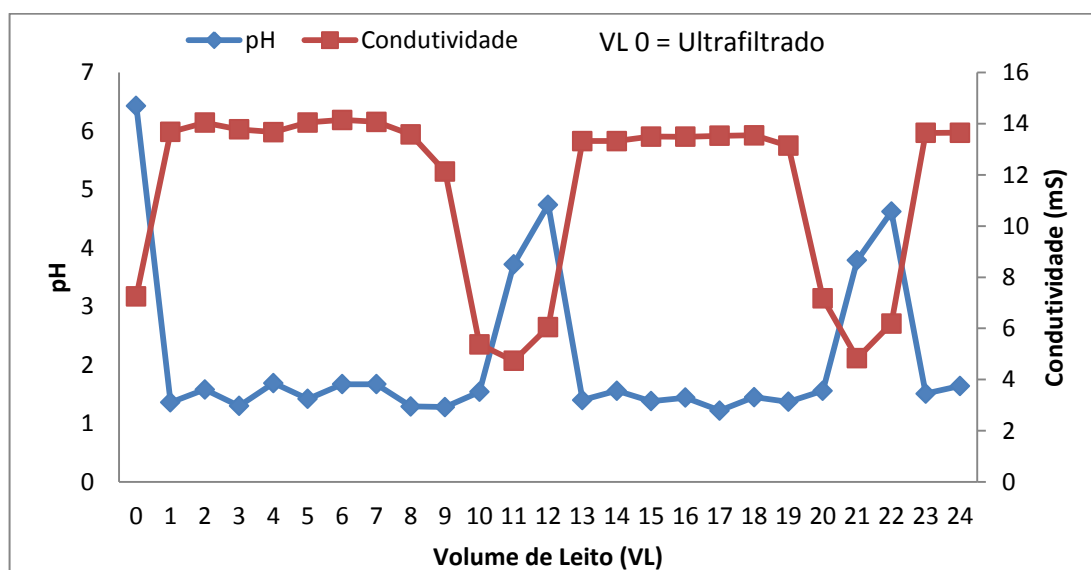


Figura 33 – Variação da condutividade e do pH para resina R1(catiônica forte) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.

Analisando os volumes de leito gerados a partir da segunda resina da série (R2) a partir da Figura 34 fica evidente que não ocorreram mudanças significativas tanto no pH como na condutividade, ou seja, tais parâmetros não evidenciaram o esgotamento da resina. Perfil semelhante de pH foi obtido por Magacho (2009) que mostrou uma tendência constante de pH próximo a 2 utilizando a mesma resina para hidrolisado concentrado. No entanto, vale ressaltar que esta resina é importante trocadora de ânions e responsável pela redução de compostos inibidores com caráter aniônico como serão mostrados no item 5.5.3.

Para esta resina o parâmetro que auxiliou na determinação do limite dos volumes úteis útil foi a área espectral (dados não apresentados) que até o 17º VL, forneceu um hidrolisado com redução de 5% neste parâmetro. Na média dos volumes de leito úteis desta resina foi possível reduzir a área espectral em 17% e os compostos fenólicos em 29% em

relação aos valores do hidrolisado logo após a R1 (Tabela 24). Ao final destes testes foram obtidos 9 litros de hidrolisado tratado.

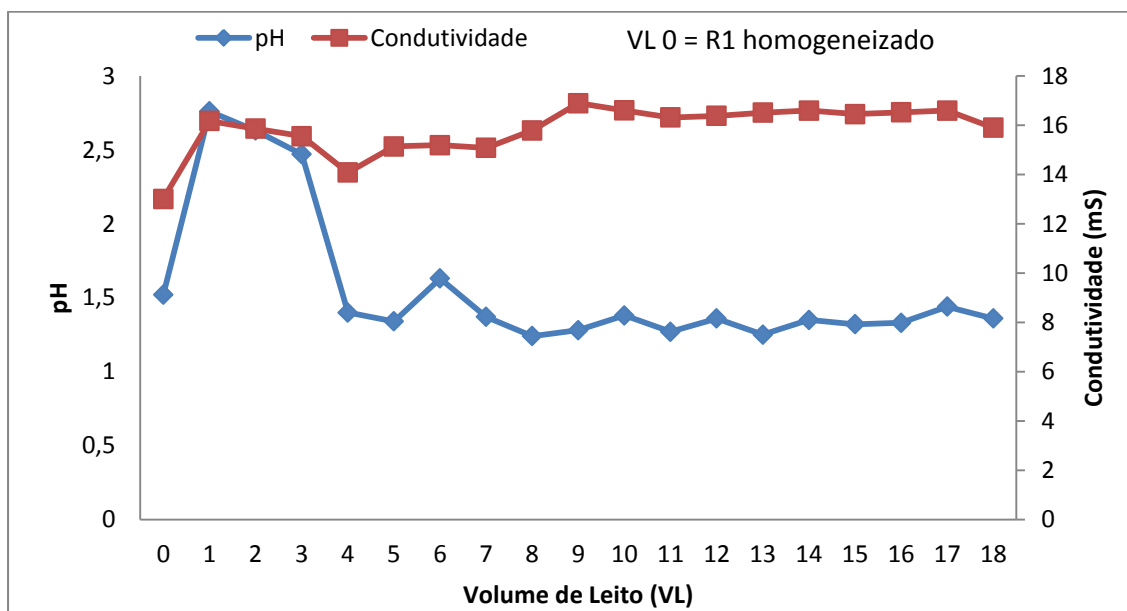


Figura 34 – Variação da condutividade e do pH para a resina R2(aniônica forte) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.

Acompanhando cada VL da terceira resina R3 é possível constatar que similarmente a segunda resina, esta apresentou maior quantidade em volumes de leito úteis em comparação com a R1. Provavelmente, este fato ocorreu porque o hidrolisado de partida para a resina R3 já havia percolado outras duas resinas, e as concentrações de alguns contaminantes já diminuíram consideravelmente. Assim pôde-se utilizar 15 volumes de leito da terceira resina da série antes da necessidade em regenerá-la, pois até este limite o pH apresentou valor inferior em relação a partida. O perfil de condutividade para esta resina apresentou uma elevação inicial e, gradativamente, foi tendo seu valor reduzido tendendo ao valor de partida ao final de 15 volumes de leito. Estes valores podem ser acompanhados através da Figura 35.

Com a conclusão dos testes da R3 foram obtidos apenas 7,5 litros de hidrolisado (15 VL úteis). Esta quantidade reduzida em relação à quantidade de partida na R1 deve-se as perdas ocorridas durante as diversas rinsagens necessárias após cada regeneração. Assim, foi possível gerar apenas 13 volumes de leito úteis na resina R4 mesmo sem ter esgotado a capacidade de troca desta última resina. Este reduzido número de volumes de leito não possibilitou avaliar com exatidão o esgotamento da R4, mas foi observado a partir do décimo terceiro volume, um indicativo de saturação devido ao declínio da condutividade aliado com o declínio do pH. Os valores de pH e condutividade para a resina 4 são mostrados na Figura 36.

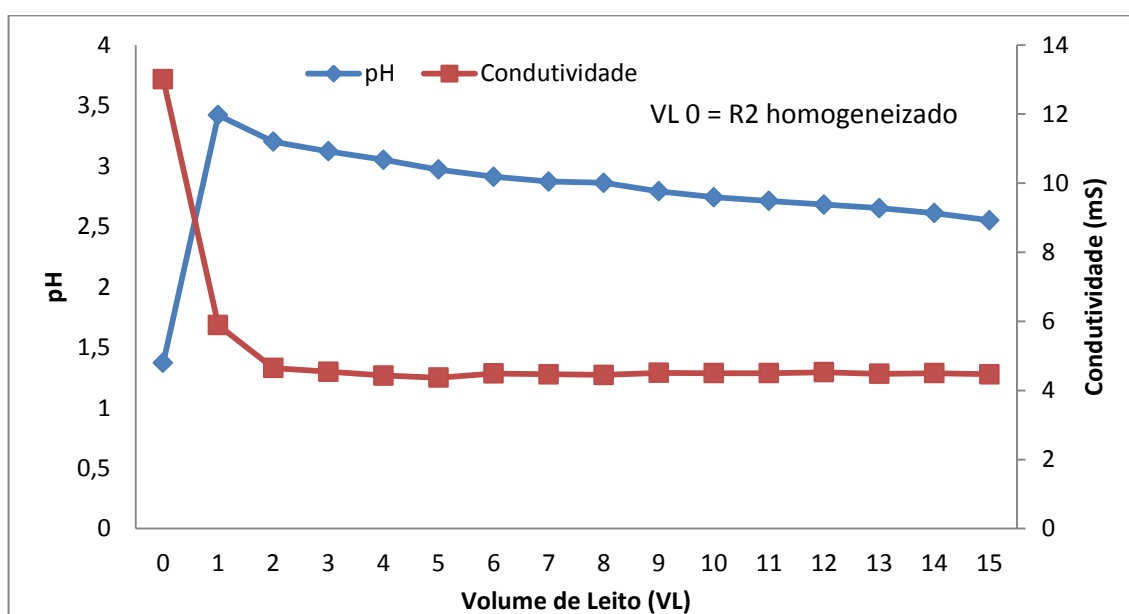


Figura 35 – Variação da condutividade e do pH para resina R3 (catiônica fraca) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.

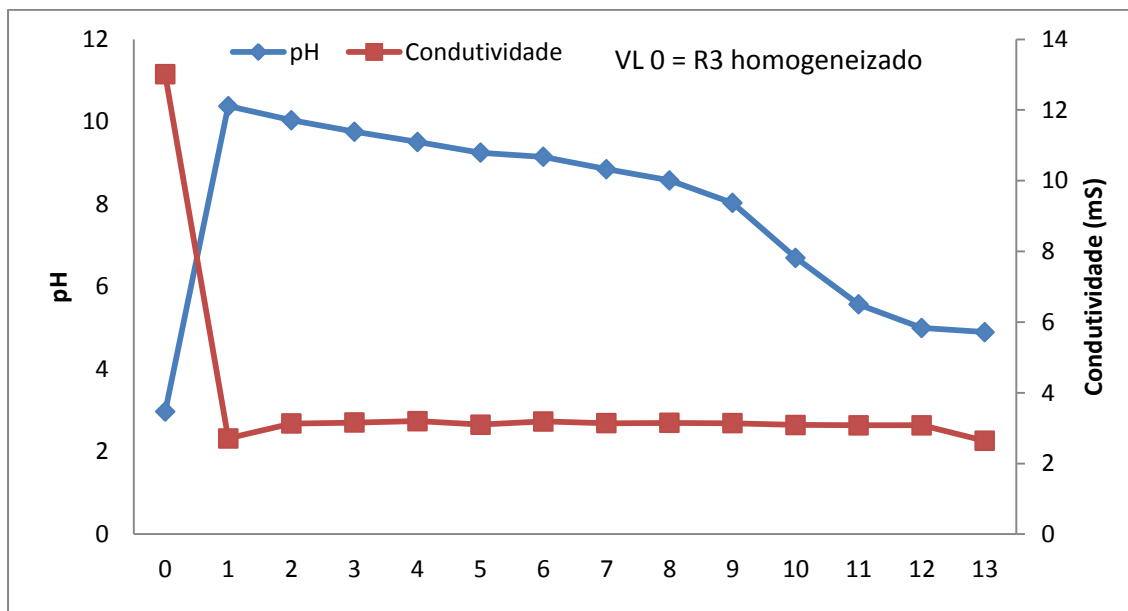


Figura 36 – Variação da condutividade e do pH para resina R4 (aniônica fraca) durante tratamento do hidrolisado com a série de resinas.

Todos os volumes de leito úteis de cada resina foram homogeneizados e caracterizados antes de serem percolados na resina subsequente. As análises referentes aos contaminantes removidos foram realizadas em cada uma dessas etapas e serão discutidas a seguir.

5.5.3 Variação dos teores de carboidratos, dos compostos inibidores e da área espectral utilizando resinas

As características do hidrolisado em cada etapa de purificação por resinas, bem como do hidrolisado ultrafiltrado, material de partida desta etapa são mostradas na Tabela 24. Inicialmente, avaliando o comportamento do pH, é possível observar que os valores variaram de acordo com as características da ação de troca iônica inerente a cada resina.

Com bases nestas características, Magacho (2009) propõe que a primeira resina a ser utilizada seja a catiônica forte, considerando a alta capacidade de ação desta resina sobre o hidrolisado ultrafiltrado, fato este comprovado pela expressiva variação de pH. De maneira similar, isto também foi observado neste trabalho mesmo utilizando um

hidrolisado de partida não concentrado, corroborado também pela elevada variação da condutividade. Essas variações citadas e mantidas por dez VL indicam a alta capacidade de ação desta resina, considerando que ela recebe um hidrolisado mais contaminado se comparado às demais. O VL subsequente (décimo primeiro) já apresentou um pH próximo a 4. Na sequência indicada por Magacho (2009) é proposto que seja utilizada por último a resina aniônica fraca (liberação de OH^- com conseqüente elevação do pH) pois nesse caso, não seriam necessários ajustes de pH para os testes fermentativos subsequentes, já que esta eleva o pH para níveis considerados ótimos (5,5 a 6,5) para as leveduras a serem utilizadas (FELIPE, 2004).

Analisando os açúcares (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) observa-se uma redução percentual mais acentuada (7,5%) da D-glicose, sendo que a D-xilose apresentou redução de apenas 3,7% após a percolação por toda a sequência de resinas. Resultados diferentes são apresentados no trabalho de Ferraz (2010) em que foi observada uma perda de 60,59% de D-xilose utilizando uma sequência de resinas diferentes, sendo elas, aniônicas A-860S (resina acrílica de troca aniônica fortemente básica), A-500PS (resina macroporosa de troca aniônica fortemente básica), na forma OH^- e a catiônica C- 150 (resina de troca catiônica fortemente ácida), na forma H^+ , nesta ordem.

Tabela 24 – Características dos hidrolisados ao final de cada etapa de purificação por resinas a partir do hidrolisado ultrafiltrado.

<i>Parâmetros</i>	<i>Ultrafiltrado</i>	<i>R1(H⁺)</i>	<i>R2(Cl⁻)</i>	<i>R3(Na⁺)</i>	<i>R4(OH⁻)</i>
pH	6,43	1,52	1,37	2,97	6,13
Condu. (mS/cm)	7,10	13,01	11,93	4,60	3,03
D-glicose (g/L)	0,67	0,64	0,63	0,62	0,62
D-xilose (g/L)	22,20	21,96	22,15	21,32	21,37
L-arabinose (g/L)	1,75	1,78	1,85	1,73	1,68
C.Fenólicos (g/L)	1,13	0,86	0,61	0,49	Nd
Furfural (g/L)	0,208	0,188	0,166	0,158	Nd
HMF (g/L)	8,00	Nd	Nd	Nd	Nd
Ác. Acético (g/L)	4,45	4,35	4,33	4,30	2,00
Área espectral*	87,75	13,93	11,54	10,61	5,52

**(u.a) unidade de área, *Nd– Não detectado.*

Em relação aos contaminantes presentes no hidrolisado hemicelulósico ocorreram reduções significativas em seus teores durante o tratamento pelas resinas.

Resultado bastante expressivo foi obtido considerando a remoção de compostos fenólicos pelas resinas (Figura 37). A análise individual das R1, R2 e R3 mostraram remoções de 23,9%, 22,1% e 10,6% respectivamente, contudo merece maior destaque a ação da R4, que foi capaz de remover 43,3% dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado ultrafiltrado.

Estudos conduzidos por Adak e Pal (2006) e Xiaoli e Youcai (2006) mostraram que a remoção de fenol do meio aquático diminuiu com o aumento no valor do pH. De acordo com os autores para baixos valores de pH (muito menor que seu $pK_a \sim 10$), compostos fenólicos são adsorvidos em sua forma molecular (C_6H_5OH) porém, quando o valor de pH aumenta (maior que pK_a) aumenta a fração aniônica do fenol ($C_6H_5O^-$). Isto explica a remoção deste composto na primeira e na terceira resina da série, pois mesmo catiônicas, o pH em ambas é muito baixo, 1,52 e 2,97 respectivamente. Já na R4, onde o pH do hidrolisado se eleva a valores entre 8 e 9, sua adsorção acontece devido à força aniônica da resina, que troca íons OH^- pelos ânions fenólicos e, assim, explica a maior remoção deste composto.

Estudos realizados por Carvalho et al. (2005) mostraram que o sistema combinado de carvão ativo e resinas de troca iônica reduziram 95% dos compostos fenólicos, enquanto que no presente trabalho foi obtida uma redução total de 99,9%.

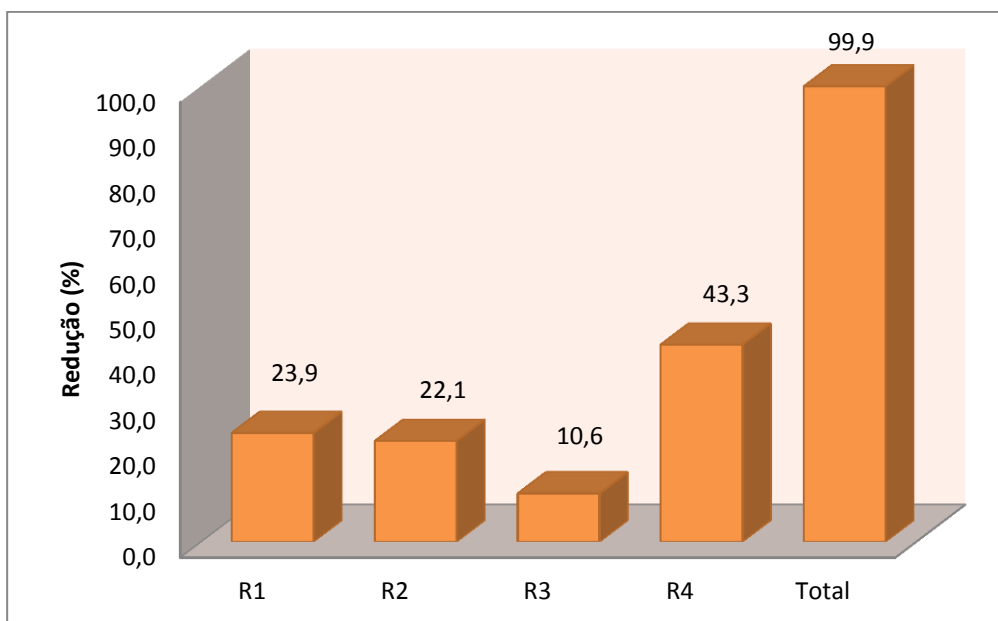


Figura 37- Redução relativa de compostos fenólicos ao longo do tratamento por resinas.

Considerando as concentrações de furfural e HMF, pode-se dizer que ocorreram remoções totais destes compostos, sendo o furfural totalmente eliminado quando percolado pela última resina e o HMF quando percolado já na primeira resina (Figuras 38 e 39).

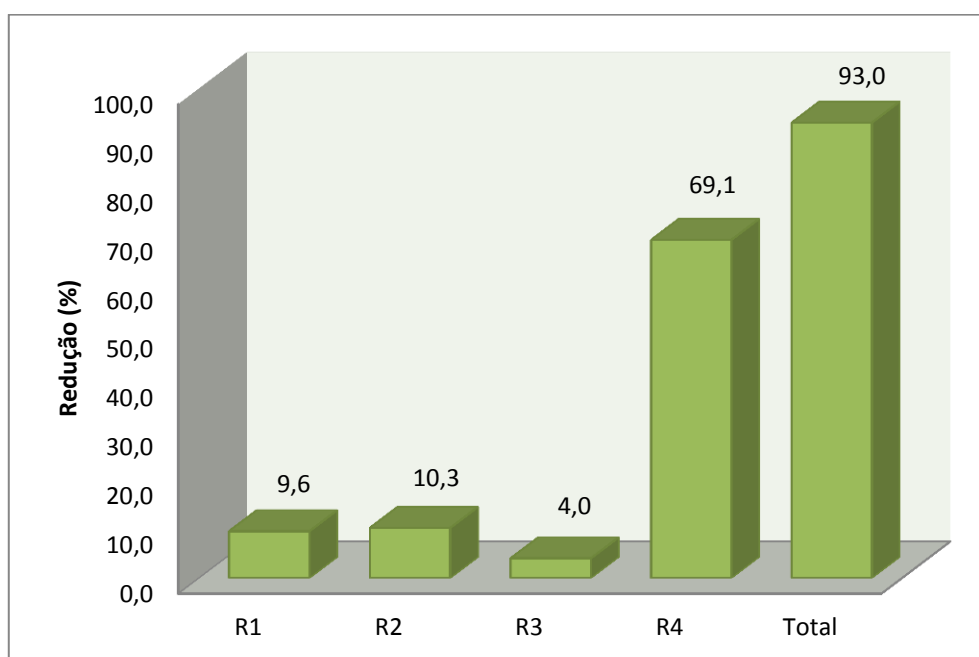


Figura 38-Redução relativa do furfural ao longo do tratamento por resinas.

A concentração de furfural oriundo da degradação das pentoses presentes no hidrolisado sofreu uma redução de 9,6% ao ser percolado pela primeira resina, como é mostrado na Figura 38. Evidentemente, o pH extremamente ácido do hidrolisado de entrada e de saída, juntamente com a percolação por uma resina catiônica forte influenciaram nesta redução. Porém, foi na R4 (trocadora de ânions) que a remoção de furfural foi mais acentuada, sendo removidos 69,1%. Estes resultados são similares aos de Larsson et al. (1999) que relataram remoção de 70% deste derivado de furano com resina trocadora de ânions.

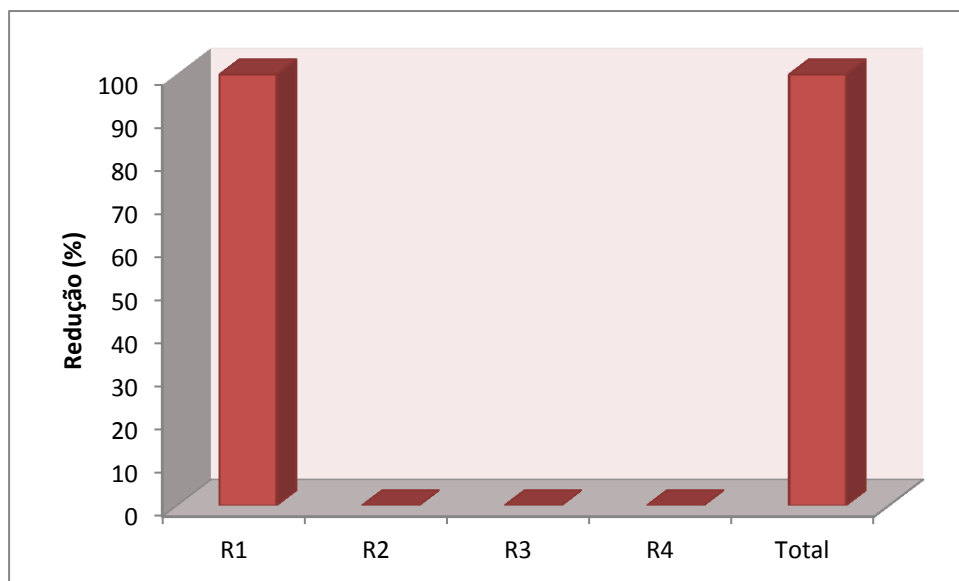


Figura 39- Redução relativa do HMF ao longo do tratamento por resinas.

Quanto à remoção de ácido acético, Carvalho et al. (2005) estudando a purificação de hidrolisados obtiveram 55% de redução deste ácido utilizando uma série de resinas aniônicas A-860S e A-500PS na forma Cl^- e passando por uma catiônica, C-150 na forma H^+ , todas as resinas fabricadas pela PUROLITE. Resultado semelhante foi obtido no presente trabalho onde 55,1% deste contaminante foi removido apresentando, ao final, um hidrolisado com 2 g/L de ácido acético; valor semelhante ao encontrado em outros

trabalhos do grupo que utilizaram os mesmos métodos de separação (DRABER; FONSECA; FARIA, 2011; MAGACHO, 2009).

Com relação ao ácido acético, os resultados mostrados na Figura 40 indicaram que as três primeiras resinas não foram eficientes para remover este contaminante, mesmo que duas delas apresentassem características catiônicas. Possivelmente, isto ocorreu devido ao pH do meio estar abaixo do pka do ácido acético que é de 4,76, durante a percolação, fazendo com que o referido ácido não esteja na forma ionizada em valores de pH de 1,52 – 1,37 e 2,97 respectivamente. Além disso, deve-se levar em conta que as resinas estão com suas capacidades totais de troca parcialmente comprometidas, devido à concorrente remoção dos furanos e fenóis.

Assim, a melhor resina a promover a remoção de ácido acético foi a R4, (aniônica fraca) na forma OH⁻, graças ao aumento do pH do meio para 8,18 durante a percolação. Conclusões semelhantes foi verificado por Nivelbrant et al. (2001) que estudaram a utilização de resinas de troca iônica, aniônica base forte (AG 1-X8, na forma OH⁻), catiônica (AG50W-X8, na forma Na⁺), e a resina sem grupo trocador XAD-8, para o tratamento do hidrolisado de madeira, em que os autores vincularam a remoção dos compostos fenólicos e ácidos alifáticos (ácidos fórmicos, acético, láctico, oxálico e levulínico) ao pH do hidrolisado. A maior remoção de ácidos alifáticos (91%) ocorreu em pH 5,5 e, sendo considerada muito eficiente devido à maioria dos ácidos encontrarem-se na forma ionizada neste pH. Ao aumentar o pH do hidrolisado a remoção diminuiu para 38% devido aos grupos fenólicos encontrarem-se ionizados, e contribuírem com o aumento da competição com ácidos alifáticos pelos sítios catiônicos e, conseqüentemente, a retenção destes ácidos é menor pelo trocador aniônico.

No contexto deste trabalho, no total da sequência de resinas foi possível remover 55,1% do ácido acético presente do hidrolisado ultrafiltrado.

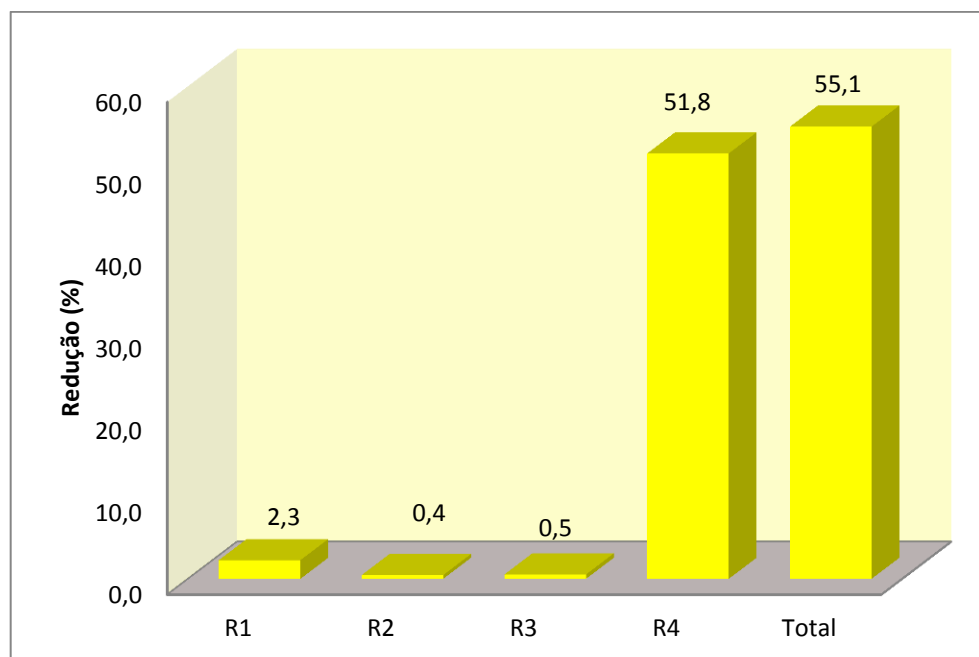


Figura 40 – Redução relativa do ácido acético ao longo do tratamento por resinas.

Finalizando este item, cabe avaliar o comportamento da variação dos valores de área espectral. De acordo com a Figura 41, a R1 reduziu 84,1% deste parâmetro, a R2 2,7%, a R3 1,1% e a R4 6,3%. Corroborando com o efeito da redução deste parâmetro, uma inspeção visual de amostras dos hidrolisados percolados (Figura 42), possibilita observar nítidas diferenças entre as cores do hidrolisado inicial e dos hidrolisado percolados. Nota-se que através da R1 ocorre a remoção de boa parte da tonalidade amarelada, mas poucas diferenças existem entre as resinas R2 e R3 apesar de ocorrerem reduções de cor. Contudo, o uso da última resina (R4) propiciou uma remoção de 6,3% na área espectral, tornando o hidrolisado consideravelmente cristalino e incolor.

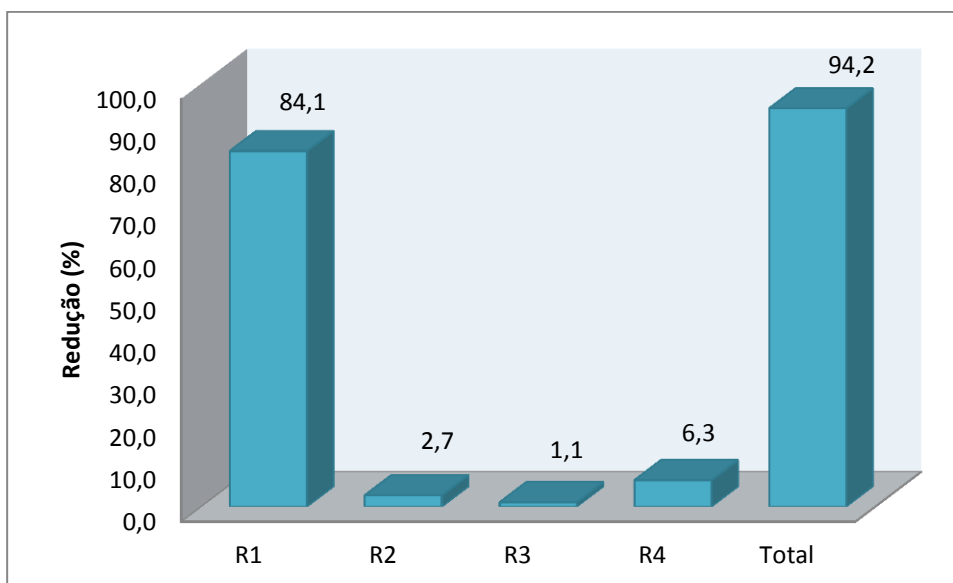


Figura 41 – Redução do indicativo de cor nos processos de purificação.

Em resumo, levando em conta o tratamento por resinas na sua totalidade, a purificação do hidrolisado ultrafiltrado apresentou bons resultados. Desde a primeira resina, a concentração de HMF foi reduzida a valores inferiores ao limite de detecção (< 1 mg/L). Do mesmo modo, as concentrações de furfural e dos compostos fenólicos também atingiram estes níveis não detectáveis após a da última resina. O ácido acético teve uma redução de 51,8% alcançando, ao final, uma concentração de 2,00 g/L.

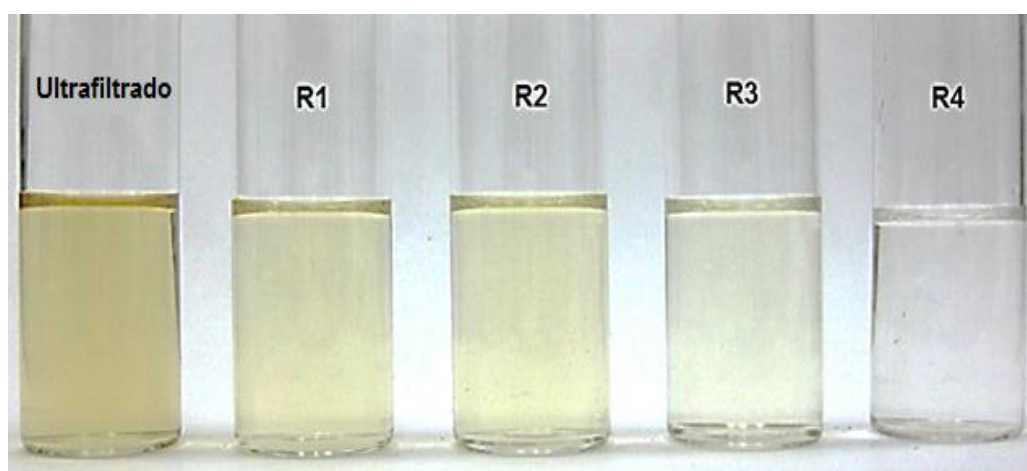


Figura 42 – Análise visual dos hidrolisados percolados por resina.

Ainda neste contexto de destoxificação do hidrolisado e a fim de verificar a eficácia de trocas iônicas das resinas, optou-se em avaliar a presença de algumas formas iônicas durante as diferentes percolações realizadas, e os resultados serão discutidos a seguir.

5.5.4 Variação da composição iônica do hidrolisado com o uso de resinas

Durante os processos de purificação alguns íons como cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro, sulfato e cloreto foram determinados por cromatografia de íons e espectrometria de fluorescência de raio-x. Através deste procedimento foi possível verificar a eficácia das resinas com relação a remoção deste tipo de contaminante e observar quais íons e em que concentrações eles estão presentes em cada etapa de trabalho. A partir da Tabela 25 e das Figuras 43 e 44 é possível avaliar estas remoções.

Tabela 25 – Concentrações dos íons analisados durante processos por resinas.

Íons (ppm)	Ultrafiltrado	R1	R2	R3	R4
Cálcio (Ca ⁺²)	2013	49	25	2,7	0,8
Magnésio (Mg ⁺²)	73	4,1	5,2	0,3	0,2
Potássio (K ⁺)	225	35	9,7	9,4	1,2
Sódio (Na ⁺)	17	3,0	5,0	1001	933
Ferro total**	30	nd*	nd*	nd*	nd*
Cloreto (Cl ⁻)	36	50	615	1500	21
Sulfato (SO ₄ ⁻²)	2144	2618	8	27	5

** determinado por espectrometria de fluorescência de raio-x

* não detectado (limite de detecção – 10 ppm)

Analisando os íons cálcio é possível observar que as resinas foram extremamente eficientes quanto a remoção desta substância alcançando valores de 98%, principalmente considerando que o hidrolisado ultrafiltrado apresentou valores elevados. O caráter catiônico da R1 tendo como contra-íon o H⁺ mostrou a elevada capacidade desta resina na retenção de cálcio mesmo frente as diferentes valências dos cátions envolvidos na respectivas trocas. A literatura indica que essa classe de resina tende a priorizar a remoção de cátions monovalentes, contudo o hidrolisado tratado apresenta reduzidos teores de cátions monovalentes o que disponibilizou mais sítios ativos para remoção substancial do

cálcio presente (HARLAND, 1994). Para as demais resinas observam-se remoções de Ca^{+2} até mesmo com o uso das resinas aniônicas, mesmo que em menores níveis, o que pode ser explicado por possíveis fenômenos adsortivos com a base polimérica da resina. Ao final as resinas conseguiram remover 99,96% de todo o cálcio presente no hidrolisado ultrafiltrado.

Mesmo comportamento é notado para o íon Mg^{+2} apesar deste estar presente em valores reduzidos no hidrolisado, mesmo assim foi possível remover 94% deste íon com a primeira resina e ao final da sequência foi removido 99,73%.

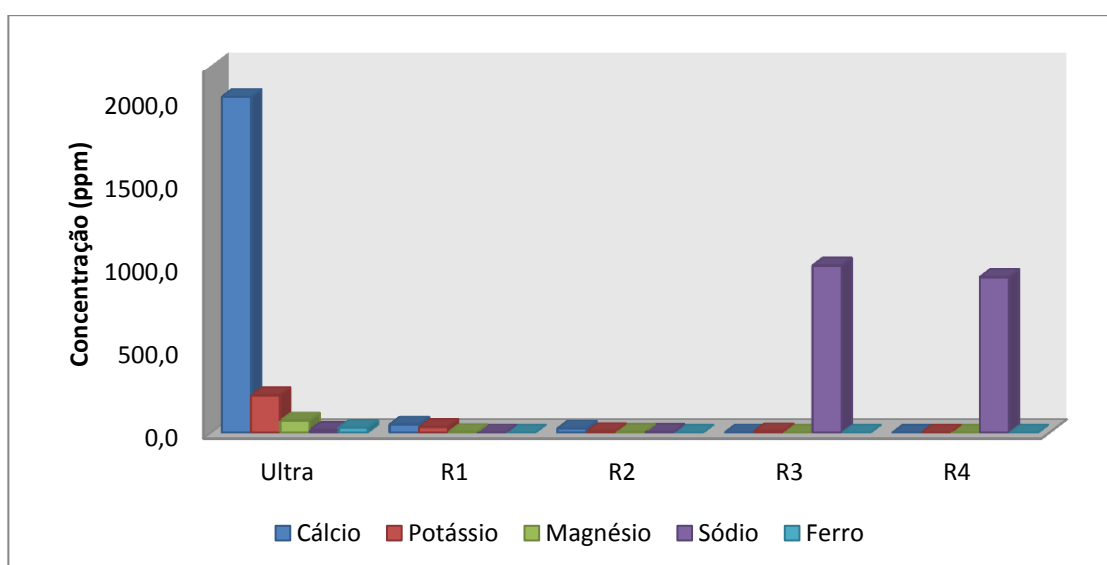


Figura 43- Concentração de cátions presentes em cada etapa de purificação por resinas.

Com relação aos cátions monovalentes comportamento diverso ao sugerido por Harland (1994) foi observado, pois os íons K^{+} e Na^{+} foram removidos em 84% e 82%, respectivamente, usando a R1. Com as outras resinas os teores de K^{+} e Na^{+} apresentaram comportamentos diferentes. Para o íon K^{+} as resinas R2 e R4 foram ativas contabilizando, ao final de toda a sequência, 99,46% de remoção deste íon. Já para o Na^{+} , a terceira resina da série agregou ao hidrolisado íons deste tipo, que não foram removidos mesmo com o uso da R4, isto ocorreu tendo em vista que o contra-íon da R3 é o próprio Na^{+} e foi inserido ao hidrolisado devido a ação desta resina na remoção de outras espécies iônicas.

Os íons ferro foram detectados em níveis reduzidos no hidrolisado de partida e foram removidos a níveis menores que 10 ppm já na primeira resina.

Dentre os contaminantes aniônicos avaliados é possível observar que o SO_4^{-2} foi extensivamente removido pela R2, como sugerido por Harland (1994), pois sendo esta uma resina que possui como grupos funcionais aminas quaternárias a remoção do SO_4^{-2} é priorizada e o contra-íon Cl^- é liberado. Após a percolação por todas as resinas foi possível remover 99,77% deste íon.

Finalizando, avaliando o comportamento do íon Cl^- foi observado elevações substanciais tanto com o uso da R2 como com o uso da R3 esta ocorrência oriunda da R2 já era esperado considerando que este é o contra-íon liberado, porém sendo a R3 uma resina catiônica e que, portanto, teoricamente libera cátions não seria lógico o aumento de Cl^- . A explicação mais provável pode estar relacionada com o tipo da solução regenerante usada nesta resina, que consiste de uma solução concentrada de cloreto de sódio em pH próximo a neutralidade. Devido a efeitos adsortivos parte do Cl^- , oriundo do regenerante, deve ficar retido na matriz polimérica e com a alteração brusca do pH para níveis ácidos, devido ao hidrolisado percolado, parte desses íons são liberados. Contudo, a última resina da sequência (R4) foi extremamente eficiente na remoção deste contaminante alcançando valores de 98,60% liberando hidroxilas como contra-íon.

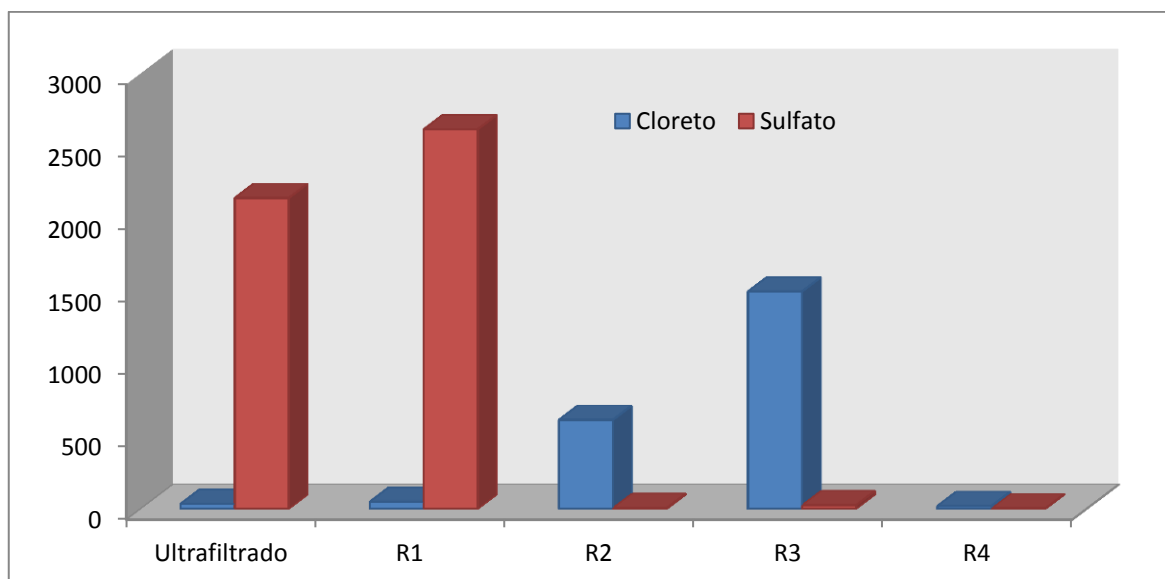


Figura 44 - Concentração de ânion presentes em cada etapa de purificação por resinas.

5.6 Avaliação global dos Processos Combinados de Purificação

Ao final, após todas as etapas de purificação do hidrolisado propostas, foi possível observar e discutir os benefícios das técnicas utilizadas de maneira combinada. As composições características do hidrolisado após cada etapa investigada são apresentadas na Tabela 26.

A utilização do método de coagulação e floculação foi fundamental como pré-tratamento considerando que se trata de uma técnica de custo reduzido, se comparada às outras duas técnicas (membranas e resinas). Esta etapa sozinha possibilitou a remoção de 53,3% de compostos fenólicos, 34,8% de furfural e 67,6% de área espectral (Figura 44).

Após a utilização da técnica de coagulação/floculação, o processo com membranas de ultrafiltração foi importante reduzindo os teores de furfural, HMF e área espectral em 23,8%, 21,4% e 21,5%, respectivamente. Além disso, também atuou na remoção de 11,9% dos compostos fenólicos, o que reduziu o impacto sobre a última etapa do tratamento. A utilização das membranas como parte do processo foi importante no tocante à extensão de

uso por vários ciclos, pois as diversas lavagens realizadas mostraram a viabilidade de recuperação de fluxo em níveis aceitáveis. Após cada etapa de limpeza, ou seja, aumentando sua vida útil. Vale ressaltar que a utilização tanto da coagulação/floculação como dos processos de separação por membranas reduziu de maneira geral o impacto das impurezas diretamente sobre a última etapa de tratamento, possibilitando a ocorrência de ciclos maiores de utilização de cada resina entre cada etapa de regeneração.

Tabela 26 – Parâmetros por cada etapa de purificação.

Parâmetros	Original	Coagulado/ Floculado	Ultrafiltrado	Resinas
pH	1,31	7,61	6,43	6,13
D-glicose (g/L)	0,81	0,67	0,67	0,62
D-xilose (g/L)	23,95	21,14	22,20	21,37
L-arabinose (g/L)	1,93	1,79	1,75	1,68
Ác. Acético (g/L)	4,54	4,35	4,45	2,00
Furfural (g/L)	0,50	0,32	0,20	Nd*
HMF (mg/L)	10,7	10,2	8,00	Nd*
C.Fenólicos (g/L)	3,23	1,51	1,13	Nd
Área espectral(u.a)	796	258	87,75	5,52
Potássio (mg/L)	211	232	225	1,2
Cálcio (mg/L)	172	2618	2013	0,8
Sódio (mg/L)	14	20	17	933
Magnésio (mg/L)	16	615	73	0,2
Cloreto (mg/L)	456	47	36	21
Sulfato (mg/L)	11169	4983	2144	5
Ferro (mg/L)	310	130	30	Nd

Nd – Não detectado.*

Com relação ao carboidrato principal, diferentemente do trabalho de Magacho, 2009 em que a autora relatou a ocorrência de perdas de 20,21% de D-xilose, o presente trabalho registrou perdas de somente 8,4 % de D-xilose, o que demonstra o uso de condições operacionais mais otimizadas neste trabalho para as mesmas técnicas.

Por fim, a utilização da tecnologia de resinas de troca iônica mostrou eficiência elevada com altos níveis de purificação. Individualmente esta tecnologia de purificação foi responsável por remoções de 34% nos compostos fenólicos, 38% de furfural, 74% de HMF e 54% de ácido acético (Figura 45).

O hidrolisado original não possui grandes quantidades dentre os cátions analisados. Entretanto, a etapa de coagulação/floculação propiciou uma elevação de 93% nos níveis de cálcio, que é justificada pela utilização de óxido de cálcio durante as correções de pH. O magnésio também teve elevação e isto pode estar relacionado com a qualidade do óxido de cálcio utilizado, pois alguns óxidos de cálcio (técnico) possuem magnésio em sua composição.

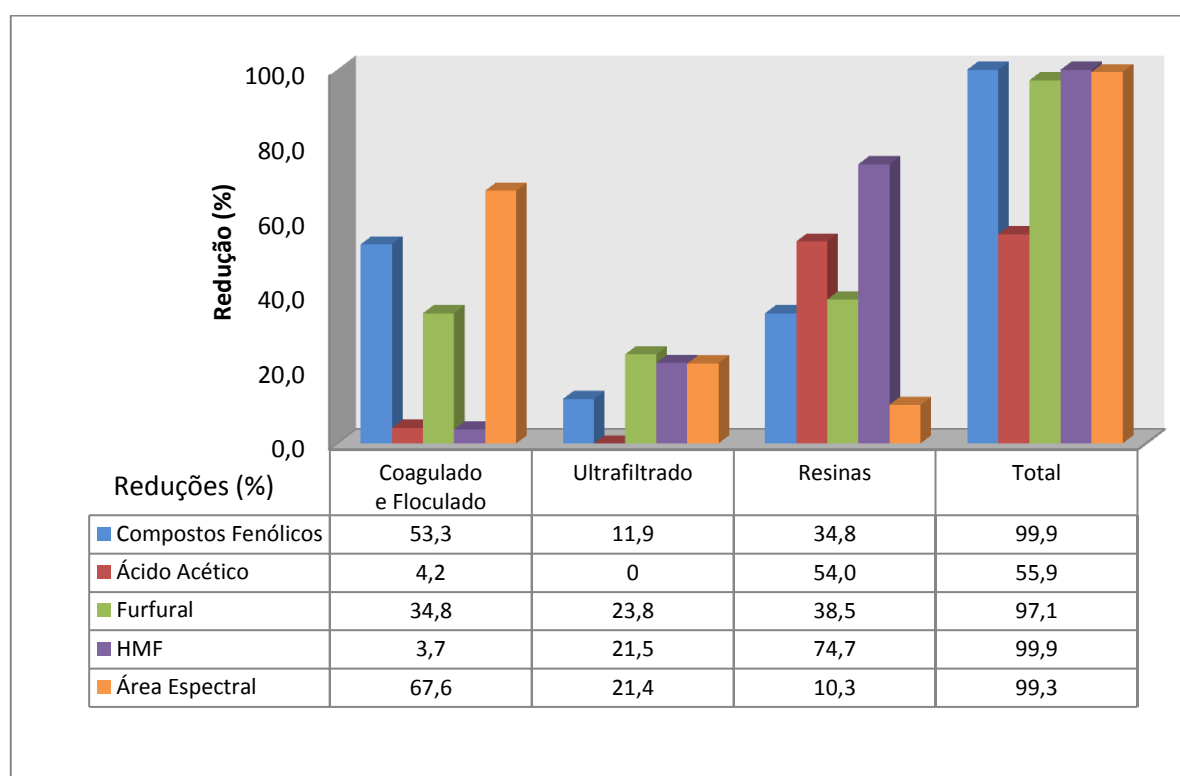


Figura 45 – Remoção dos compostos inibidores e da área espectral em cada etapa da purificação.

Durante a etapa de ultrafiltração ocorreu a redução de cálcio (23%) e uma acentuada redução de magnésio (88%). Desse modo, é possível afirmar que parte destes cátions está complexada em macromoléculas no hidrolisado, ou se acomodam na camada gel que se forma na membrana durante todo o processo e são removidos do meio com facilidade.

Quanto à remoção de ânions é possível observar (Figuras 46 e 47) que a concentração de sulfato é muito alta no hidrolisado original, isto porque a hidrólise é realizada utilizando

ácido sulfúrico. Durante os processos de separação a concentração deste ânion sofre uma grande redução. Logo, na etapa de coagulação/floculação a concentração de sulfato é reduzida em 55%. Ao final do tratamento por resinas o ânion sulfato foi reduzido em 99% seguido pelo ânion cloreto que foi reduzido em 96%.

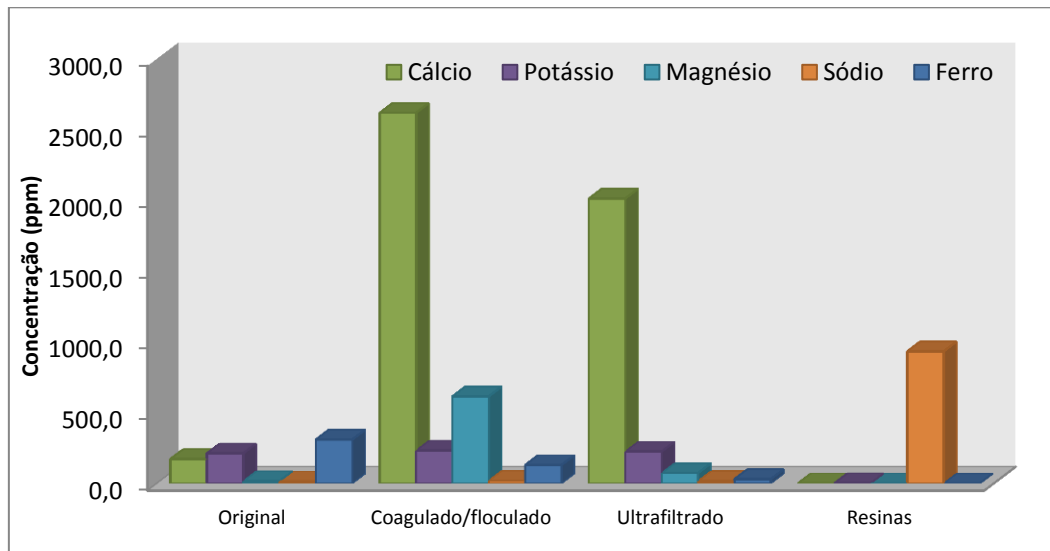


Figura 46 – Variação da concentração de cátions durante os processos de purificação do hidrolisado.

Ao final de todo o processo, com o uso combinado das diferentes tecnologias de purificação foi possível obter um hidrolisado com 21,37 g/L de D-xilose, 0,62 de D-glicose, 1,68 g/L de L-arabinose. A redução dos contaminantes foi muito significativa, atingindo níveis de purificação elevados (Tabela 26). Em destaque, os compostos fenólicos e o HMF foram removidos praticamente em sua totalidade, juntamente com a remoção de 97,1% do furfural e remoção de 55,9% do ácido acético, o que propiciou a redução de 99,3% na área espectral, onde a variação deste último parâmetro é sensivelmente notada através da inspeção visual da Figura 48.

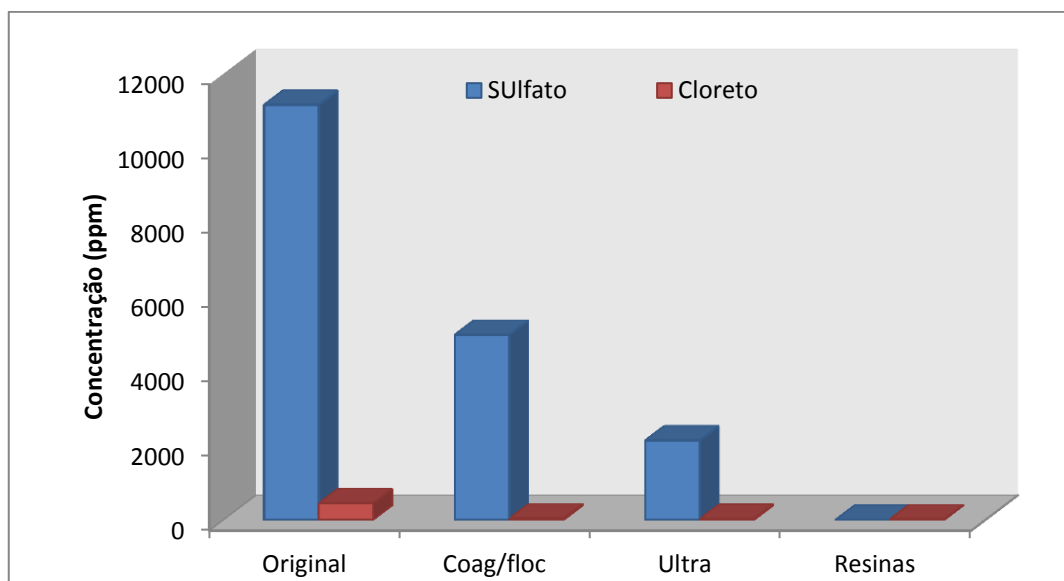


Figura 47- Variação da concentração de ânions durante os processos de purificação do hidrolisado.

Os resultados obtidos mostraram a eficiência dos processos de purificação do hidrolisado, o qual foi concentrado e submetido aos testes fermentativos programados. Os resultados destes testes serão discutidos a seguir.



Figura 48 - Comparação entre o hidrolisado original e o hidrolisado final purificado.

5.7 Testes Fermentativos

A fim de comprovar a eficácia dos métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico foram realizadas fermentações utilizando as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037 e *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 visando a produção de xilitol e etanol, respectivamente. Os meios de cultivo utilizados foram meio sintético e hidrolisado hemicelulósico concentrado em rotaevaporador, ambos suplementados. A composição do hidrolisado após concentração é mostrada na Tabela 27.

Tabela 27 – Hidrolisado concentrado três vezes.

<i>Parâmetros</i>	<i>Hidrolisado Concentrado</i>
pH	6,00
Condutividade (mS/cm)	7,77
D-glicose (g/L)	2,36
D-xilose (g/L)	57,6
C.Fenólicos (g/L)	nd
Furfural (g/L)	nd
HMF (mg/L)	nd
Ác. Acético (g/L)	6,31
Área espectral(u.a)	9,92

5.8 Bioconversão de D-xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*

As fermentações foram realizadas em frascos agitados de 250 mL com volume de meio de 100 mL e a agitação orbital realizada em shaker. O pH inicial foi 6,0 e as concentrações de D-xilose de aproximadamente 70g/L para o hidrolisado e 60g/L para o meio sintético. O meio sintético foi suplementado com 3g/L de sulfato de amônio, 0,1 g/L de cloreto de cálcio e 20% (v/v) de extrato de farelo de arroz. O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado com 3g/L de extrato de levedura.

Nas Figuras 49 e 50 são mostrados o consumo de D-xilose, a formação de xilitol e o crescimento celular. Analisando os resultados referentes ao crescimento celular é possível destacar que em ambos os meios de fermentação, as concentrações finais de

células foram bastante próximas e expressivas ao final de 72 horas de fermentação, tanto no meio sintético como no hidrolisado, sendo de 6,49 g/L e 7,42 g/L, respectivamente. Nota-se que a presença de ácido acético no hidrolisado tratado não inibiu crescimento celular.

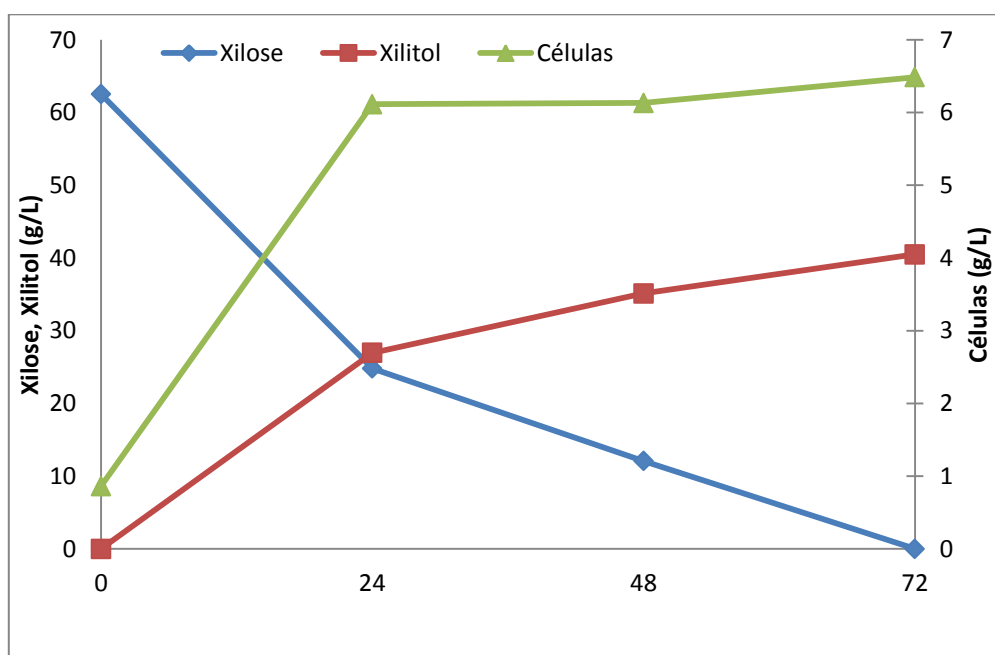


Figura 49 – Consumo de D-xilose, formação de xilitol e crescimento de células em função do tempo em meio sintético.

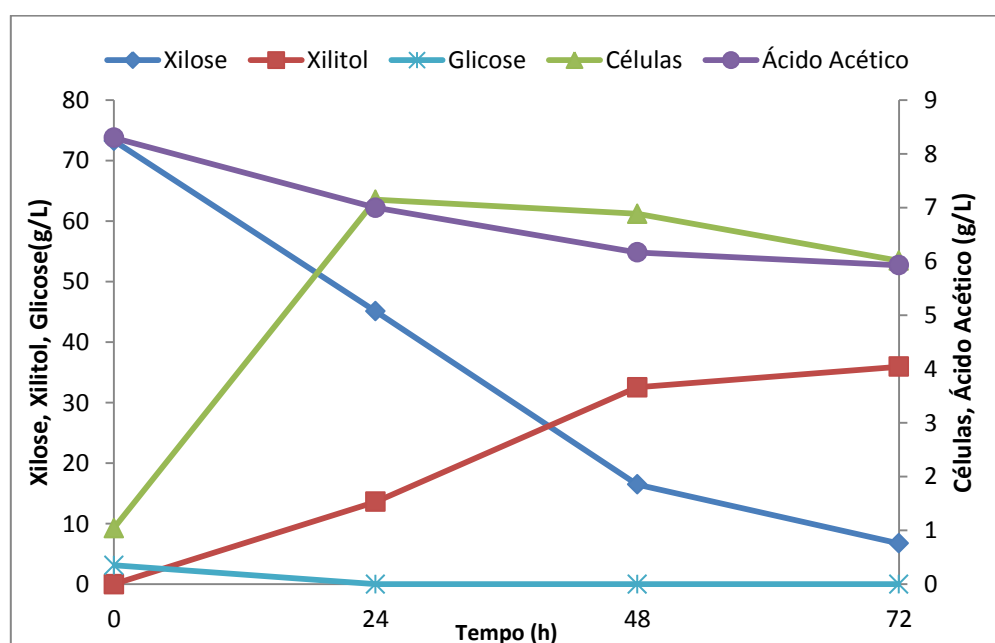


Figura 50 – Consumo de D-xilose e ácido acético, formação de xilitol e crescimento de células em função do tempo em hidrolisado suplementado.

Outro composto presente somente no hidrolisado foi a D-glicose com uma concentração de 3,12 g/L (Figura 50), no entanto ela foi assimilada nas primeiras 24h de fermentação, mas sua presença pode ser o motivo do maior tempo requerido para a fermentação neste meio, por questões adaptativas. A velocidade de consumo de D-xilose no meio sintético que não apresenta D-glicose foi maior que no hidrolisado, reduzindo o substrato em 60,3% nas primeiras 24 horas, enquanto que a D-xilose consumida no hidrolisado foi de 40,1% também nas primeiras 24 horas. De acordo com Parajó et al. (1998) a presença de hexoses no meio de fermentação pode inibir o metabolismo de D-xilose por repressão e inativação do sistema de transporte da D-xilose ou de enzimas catabólicas.

Os maiores valores de concentração de xilitol foram 40,5g/L para o meio sintético e 37,7 g/L para o hidrolisado após 72 horas de fermentação.

Quanto à produção de xilitol no hidrolisado verifica-se que somente após o período de 24 horas de fermentação ocorreu um expressivo aumento deste carboidrato, coincidente com o fim da D-glicose presente, e ao final das 72 horas alcançou um valor 6,9% menor quando comparado ao meio sintético.

Avaliando os parâmetros fermentativos (Tabela 28) o rendimento em células por grama de D-xilose ($Y_{X/S}$) apresentou comportamento similar nos dois meios, no entanto o rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no meio sintético foi superior em 13,9% ao hidrolisado suplementado. Cabe ressaltar que a produtividade volumétrica (Q_P) foi muito semelhante para os diferentes meios, sendo de 0,56 g/L.h para o meio sintético e 0,52g/L.h para o hidrolisado, evidenciando a qualidade da purificação.

Diversos trabalhos na literatura têm estudado o efeito dos processos de destoxificação do hidrolisado por meio dos parâmetros fermentativos. Analisando estudos

como o de Magacho (2009) que partindo de um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado (após a hidrólise) utilizando os mesmos métodos de destoxificação e a mesma levedura, apresentou resultados de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) de 0,73 g/g para meio sintético e 0,68 g/g para o hidrolisado. Estes valores são maiores que os apresentados nesse trabalho, no entanto os valores de produtividade volumétrica (Q_p) foram inferiores em 33% para o meio sintético e 52% para o hidrolisado.

Diferentemente do presente trabalho, Ferraz (2010) também purificando hidrolisado através de membranas de extração e resinas de troca iônica separadamente, obteve como $Y_{P/S}$ os valores de 0,39 g/g e 0,30g/g, respectivamente e como Q_p os valores de 0,26 g/L.h e 0,10g/L.h, respectivamente. Estes resultados foram inferiores aos encontrados no presente trabalho ($Y_{p/s}$ 0,56 g/g e $Q_{p/s}$ 0,52 g/L.h) lembrando que o processos de separação por membranas e resinas de troca iônica foram utilizados de maneira combinada.

Ainda na linha de purificação de hidrolisados Marton (2005) ao fermentar o hidrolisado de bagaço de cana por *Candida guilliermondii* tratado por alteração de pH seguido de resinas de troca iônica, obteve um rendimento de 0,52 g de xilitol/ D-xilose consumida e um Q_p de 0,27 g/L.h, após 72 horas de fermentação. Os resultados também são inferiores aos obtidos neste trabalho (Tabela 28).

Tabela 28 – Parâmetros fermentativos dos experimentos com meio sintético e hidrolisado purificado para obtenção de xilitol.

Parâmetros fermentativos	Meio sintético	Hidrolisado Suplementado*
Rendimento em xilitol: $Y_{P/S}$ (g/g)	0,65	0,56
Rendimento em células: $Y_{X/S}$ (g/g)	0,10	0,10
Rendimento xilitol/células: $Y_{P/X}$ (g/g)	7,20	5,90
Produtividade volumétrica: Q_p (g/L.h)	0,56	0,52
Eficiência: η (%)	70,9	61,4
Tempo de fermentação (h)	72	72

*Suplementado com extrato de levedura.

Ainda é importante ressaltar que neste trabalho o ácido acético não foi totalmente removido e sua redução durante a fermentação do hidrolisado sugere a capacidade da levedura *Candida guilliermondii* de assimilar o ácido acético ou sua parcial volatilização (Figura 50) promovendo uma redução de 27,6% do ácido acético.

Comportamento parecido foi observado por Chaud (2010) em que o ácido acético presente no hidrolisado de bagaço de cana destoxificado com polímero vegetal foi totalmente consumido, o que não foi verificado no hidrolisado de controle, que possuía outros tipos de contaminantes além do ácido acético.

Segundo Felipe (2004) em linhas gerais a toxicidade dos compostos se deve não apenas à ação individual, mas também à ação combinada entre outros compostos presentes. Esta análise leva a concluir que no presente trabalho os processos de purificação utilizados foram extremamente eficazes no que se refere a eventual remoção de outros contaminantes possíveis de estarem presentes, mas não detectados pelas técnicas analíticas utilizadas, tornando o hidrolisado altamente fermentescível.

5.9 Bioconversão de D-xilose em etanol por *Pichia stipitis*

Como no item anterior, o hidrolisado purificado foi submetido a bioconversão da xilose, mas desta vez visando a produção de etanol utilizando a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

Foram realizadas duas fermentações em frascos agitados de 250 mL com volume de meio de 100 mL e a agitação foi do tipo orbital realizada em shaker. O pH inicial foi 6,0 e as concentrações de xilose de aproximadamente 70g/L para o hidrolisado e 65 g/L para o meio sintético. O meio sintético foi suplementado com 3g/L de fosfato de amônio, 1 g/L de sulfato de magnésio heptaidratado e 3 g/L de extrato de levedura. O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado com 3g/L de extrato de levedura. O consumo de

substrato (xilose), a formação de produto e o crescimento celular podem ser observados nas Figuras 51 e 52.

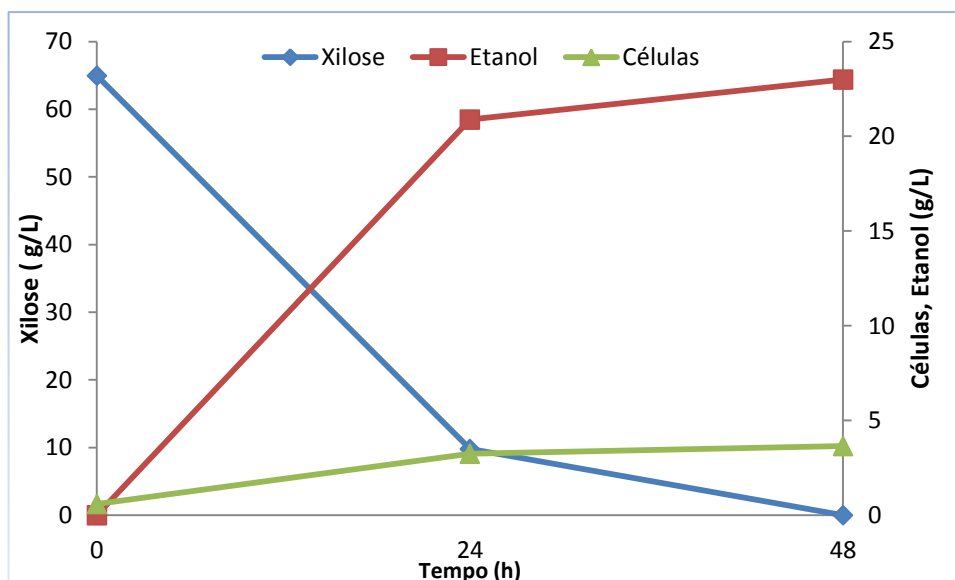


Figura 51 – Consumo de D-xilose, formação de etanol e crescimento de células em função do tempo em meio sintético.

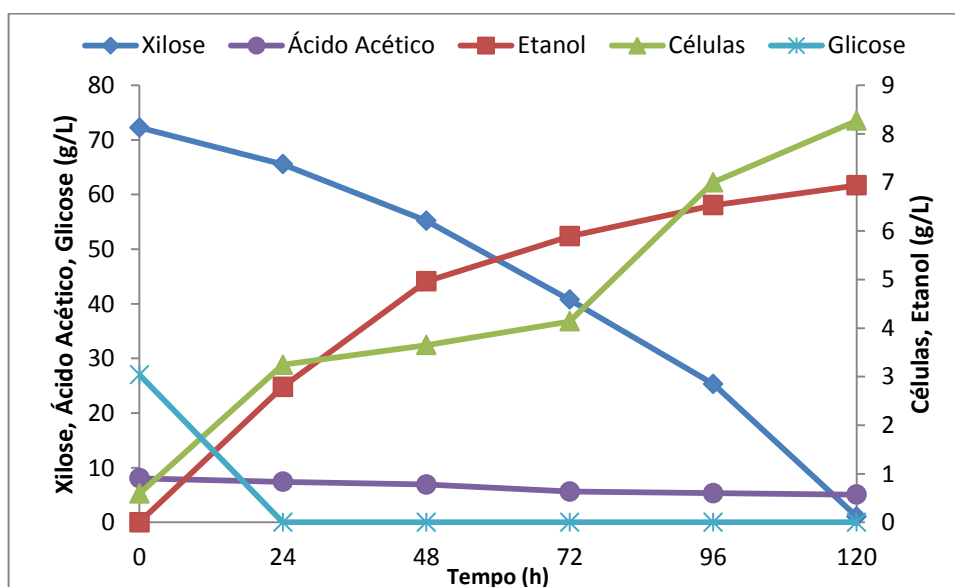


Figura 52 – Consumo de D-xilose e ácido acético, formação de etanol e crescimento de células em função do tempo em hidrolisado suplementado.

Na Figura 51 é possível observar que o consumo total de xilose no meio sintético acontece em 48 h ao contrário do hidrolisado suplementado em que o consumo total de xilose só ocorre em 120h de fermentação (Figura 52). Observa-se que os açúcares são assimilados sequencialmente, sendo a D-glicose a primeira a ser consumida.

Este comportamento parece ser típico em diferentes leveduras cultivadas em misturas de açúcares, que em geral apresentam uma inibição ou um atraso da utilização de xilose pela presença de D-glicose no meio (DU PREEZ, 1994; AGBOGBO, 2006; SCHIRMER-MICHEL et al., 2008). Ao contrário do meio sintético, o hidrolisado purificado em questão contém D-glicose em sua composição, carboidrato este que afetou diretamente os testes fermentativos, e apesar de estar presente em níveis reduzidos (3,04 g/L) foi consumido totalmente nas primeiras 24h de fermentação, retardando o consumo de xilose (Figura 52).

De maneira semelhante Canilha et al. (2010) estudando a purificação de hidrolisados por alteração de pH, também verificaram o rápido e prioritário consumo em 24 horas de D-glicose presente em um hidrolisado tratado alterando o pH. O mesmo hidrolisado quando tratado por resinas de troca iônica foi consumido em 48 horas. Este comportamento também foi observado em outros trabalhos que utilizaram como substrato hidrolisados de bagaço de cana (CHENG et al., 2008), palha de trigo (CANILHA et al., 2005) e cevada (MORAES, 2008).

Com relação ao ácido acético, Van Zyl et al. (1991) usando *P. stipitis* para produzir etanol de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, relatou que o grau de inibição causado por esta substância depende não apenas de sua concentração, mas também da concentração de oxigênio dissolvido e do pH do meio de fermentação. Em meio com pH de 6,5 e concentrações de ácido acético acima de 4 g/L, a produção de etanol foi reduzida cerca de 50% quando a concentração de ácido acético foi de 15 g/L. No presente trabalho a

redução no rendimento do etanol do hidrolisado em relação ao meio sintético foi de 17% na presença de 8,08 g/L de ácido acético. O ácido acético foi consumindo juntamente com a xilose durante a fermentação, o que confirma a versatilidade da levedura na utilização de todas as principais fontes de carbono encontradas no hidrolisado hemicelulósico semelhantemente ao sugerido por Canilha et al. (2010).

Neste trabalho o ácido acético não causou inibição ao crescimento celular, o que é comprovado analisando o teor de células no final alcançada na fermentação do hidrolisado que foi de 8,27 g/L. Além disso, os valores de rendimento celular (Y_p/s) foram bastante expressivos atingindo apresentando valores de 0,18 g/g em 48h e 0,11 g/g em 120h.

Uma das explicações para este crescimento celular, mesmo na presença de alta concentração de ácido acético no meio, é a ausência de outros contaminantes no hidrolisado, como HMF, furfural e compostos fenólicos. Segundo Vogel e Lee (1998) mesmo em pequenas concentrações, vários inibidores juntos atuam de maneira sinérgica propiciando baixos rendimentos.

Com relação a rendimentos, estudos realizados por Nigam (2001) utilizando a mesma levedura em meio sintético mostraram um rendimento de etanol de 0,43 g/g, valores similares ao encontrado neste trabalho (0,48 g/g) como é mostrado na Tabela 29. Este mesmo autor simulou as condições do hidrolisado adicionando ao meio sintético os inibidores separadamente, e seus efeitos foram observados. Nigam verificou que o ácido acético separado dos outros inibidores em concentrações de 6,9 g/L apresentou resultado de 0,30 g/g em rendimento de etanol. Já no presente trabalho para uma concentração de 8,08 g/L de ácido acético o resultado obtido foi de 0,29 g de etanol/ por D-xilose consumida. Tais dados possibilitam que o ácido acético não inibe diretamente o crescimento celular, embora reduza a velocidade de consumo da D-xilose e por consequência reduz a produção de etanol (Figura 52).

Tabela 29 – Parâmetros fermentativos dos experimentos com meio sintético e hidrolisado purificado para obtenção de etanol.

Parâmetros fermentativos	Meio sintético	Hidrolisado Suplementado*	
	48h	48h	120h
Rendimento em etanol: $Y_{P/S}$ (g/g)	0,35	0,29	0,10
Rendimento em células: $Y_{X/S}$ (g/g)	0,05	0,18	0,11
Rendimento etanol/células: $Y_{P/X}$ (g/g)	7,52	1,62	0,90
Produtividade volumétrica: Q_p (g/L.h)	0,48	0,14	0,04
Eficiência: η (%)	94	57	19

*Suplementado com extrato de levedura.

Finalizando, ficou demonstrada a possibilidade de produção de etanol, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana tratado, a partir da levedura *P. stipitis* Y-7124. Isto evidencia o potencial de utilização deste resíduo para a obtenção de etanol e a eficácia do sistema combinado de purificação do hidrolisado.

6 Conclusão

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível avaliar uma sequência de purificação para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, com o objetivo de produzir etanol e xilitol pela bioconversão da D-xilose e, diante dos testes, concluiu-se:

A utilização de planejamento experimental na etapa de coagulação/floculação foi de grande valia, pois possibilitou o melhor estudo de diferentes condições apresentando os melhores resultados na combinação de quitosana, PAC e pH próximo a neutralidade. Outro fator importante foi a efetiva atuação do processo de coagulação/floculação referente a redução de compostos fenólicos que chegou a 53,3% e a redução de área espectral a 67,6%, o que demonstra a grande utilidade deste processo, pois seu custo é relativamente menor em comparação com outros reduzindo as técnicas posteriores evitando assim, em nosso caso, danos diretos aos processos de membranas e resinas de troca iônica.

A utilização do processo de ultrafiltração se mostrou eficaz precedendo as resinas de troca iônica, pois reduziu o impacto sobre as resinas reduzindo cor, furanos e compostos fenólicos no hidrolisado. As membranas de ultrafiltração mesmo após sete ciclos de regeneração apresentaram recuperação de até 88%, portanto sendo viável sua utilização.

A utilização das resinas de troca iônica atuou de forma a lapidar o hidrolisado removendo as impurezas mais difíceis de serem removidos por métodos mais clássicos. Em destaque, podem ser citadas as remoções 99,9% de compostos fenólicos e HMF, o furfural teve 97,1% e 55,9% do ácido acético, o que possibilitou a redução em 99,3% na área espectral.

Os testes de bioconversão confirmaram que a D-xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico nas condições estudadas é fermentescível tanto para a *Candida guilliermondi* como para *Pichia stipitis* sendo a ultima mais sensível aos níveis de ácido

acético. Tal fermentabilidade confirma que o nível de purificação alcançado com este tratamento proposto foi bastante efetivo.

7 Sugestões para trabalhos futuros

- Análise de sólidos em suspensão;
- Ênfase nos processos de separação por membranas, visando a explicação do fenômeno ocorrido durante a permeação do hidrolisado. Utilização de outras análises como proteínas, turbidez;
- Ampliação de escala do processo de coagulação/floculação e melhor estudo dos fenômenos ocorridos no processo, como tamanho de flocos e turbidez.
- Fermentações em maior escala e sua otimização.
- Avaliação econômica dos processos combinados para escala industrial.

Referências

- ADAK, A.; PAL, A. Removal of phenol from aquatic environment by SDS-modified alumina: Batch and fixed bed studies. **Separation and Purification Technology**, v.50, p.256-262, 2006.
- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333-2336, 2006.
- ALEXANDRATOS, S.D. Ion-Exchange Resins: A Retrospective from Industrial and Engineering Chemistry Research. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v.48, p.388–398, 2009.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ARANDA-BARRADAS, J.S.; GARIBAY-ORIJEL, C.; BADILLO-CORONA, J A.; SALGADO-MANJARREZ, E. A stoichiometric analysis of biological xylitol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 1-9, 2010.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 187-98, 2000.
- AZEVEDO NETTO, J. M.; RICHTER, C. A. **Tratamento de água: tecnologia atualizada**. 2 ed. São Paulo: CETESB, 1998.
- AZEVEDO, J.M., PEREIRA, B.E.B., YASSUDA, E.R., MARTINS, J.A., NOGAMI, P.S., GAGLIONI, P.S., OLIVEIRA, W.E. **Técnicas de abastecimento de água**. 2.ed. São Paulo: CETESB. 1979.
- BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2nd. New York. John Wiley & Sons, 2004.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 3 ed. Campinas, UNICAMP, 2007.
- BENITO, G.G.;BRAÑA,R.L.; BOLADO,S.; COCA,M; CUBERO,G.M.T. Batch ethanol fermentation of lignocellulosic hydrolysates by *Pichia stipitis*. Effect of acetic acid, furfural and HMF. **New Biotechnology**, v. 25, p. S261, 2009.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Produção de cana-de-açúcar**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em 15 junho de 2010.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil.. In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 365-380, 2010.

CAMPBELL, A. The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. **J. Alzheimer's Disease**, v.5, n.1, p.31-8, 2003.

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

CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. **Applied Biotechnology**, n. 161, p.84-92, 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Estratégia de preparação do inóculo para bioprodução de xilitol utilizando hidrolisado de palha de trigo. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 117-120, 2005.

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

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

CARDOSO, K. C; BERGAMASCO, R; COSSICH, E.S; MORAES, C.K. Otimização dos tempos de mistura e decantação no processo de coagulação/floculação da água bruta por meio da *Moringa oleifera Lam*. **Acta Scientiarum – Technology**, v. 30, n.2, p. 193-198, 2008.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; LOPES, S.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GIRIO, F. M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. **Process Biochemistry**, v.40, p.1215-23, 2005.

CARVALHO, G.B.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Evaluación del hidrolizado hemicelulósico de eucalipto buscando la remoción de compuestos inhibidores del hydrolyzate de microorganismos, IN: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA, 7., 2002 Habana, Junio.

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

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

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

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

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

CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; PING, W.X.; HUANG, W.; GE, J.P.; XU, J.M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 203–207, 2009.

CHO, D.H.; SHIN, S.J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y. H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4947–4951, 2010.

CONAB-COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_08_30_13_41_19_boletim_cana_portugues_-_agosto_2011_2o_lev..pdf> Acesso: 15 de setembro, 2011.

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

CRUZ, J.G.H. **Alternativas para a aplicação de coagulante vegetal à base de tanino no tratamento do efluente de uma lavanderia industrial**. 2004. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre- RS, 2004.

DA SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. Fundação Oswaldo Cruz; Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, 1999.

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

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. Métodos e técnicas de tratamento de água, 2 ed., v.1, São Carlos: RIMA., 2005.

DÍAZ, M.J., RUIZ, E., ROMERO, I., CARA, C., MOYA, M., CASTRO, E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 891–899, 2009.

DOMENECH, C.H. **Como fazer um DOE com sucesso**. Parte II: análise e interpretação de resultados. Disponível em: <<http://www.statistical.com.br>> . Acesso em: 30 jun. 2010.

DRABER, K. M. M.; FONSECA, C. R.; FARIA, L. F. F. Uso de resinas de troca iônica na purificação de hidrolisado de Bagaço de cana de açúcar. **Anais CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 9., 2011.

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

EBRINGEROVA, A., HROMADKOVA, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 1- 67, 2005.

EIKEBROKK, B.; SALTNES, T. Removal of natural organic (NOM) using different coagulants and lightweight expanded clay aggregate filters. **Water Science & Technology: Water Supply**, v. 2, p. 131-140, 2001.

FARIA, L.F.F. **Produção de xilitol a partir de xilose em um biorreator a membrana**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FELIPE, M. G. A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic materials. In: Saha, B. C., Hayashi Kyoshi. **Lignocellulose Biodegradation**. Washington: American Chemical Society, cap. 18. p. 300-314, 2004.

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

FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A.M. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Arquivos em Biologia e Tecnologia**, v. 36 p. 103-14, 1993.

FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S.; RODRIGUES, R.C.L.B.; VITOLO, M.; PELLAR, M.V. Effect of phenol concentration on xylose-xylitol bioconversion by *Cândida guilliermondii*. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 21., 1999. Colorado (USA).

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M., SILVA, S.S; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35 p. 171-7, 1995.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 11-4, 1997.

FELLOWS, P. Concentración por membranas. In: **TECNOLOGÍA DEL PROCESADO DE LOS ALIMENTOS: PRINCIPIOS Y PRÁCTICAS. Libro de Resumen**, Zaragoza; Acibia, 1994, p. 141-52.

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

FERRAZ, A. **Processos Fermentativos e Enzimáticos. In Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001, p. 465-484.

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

FERREIRA, A.L.B.; FARIA, L.F.F.; SILVA, J.B.A. Avaliação do uso de Resinas de Troca Iônica na Purificação de Hidrolisado de Bagaço de Cana. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCION DE ALCOHOLS Y LEVEDURAS (SIPAL),5.**, Campos do Jordão. **Programa e Livro de Resumos**, Lorena: FAENQUIL, 2005. v.5, p.292.

FLATEN, T. P. Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. **Brain Research Bulletin**, v.55, n.2, p.187-96, 2001.

FONSECA, C. R.; FREITAS, T. P.; FARIA, L. F. F. Uso Combinado de Polímero Vegetal e Policloreto de Alumínio na Purificação de Hidrolisado de Bagaço de Cana. In: **COBEQ**, 2010, Foz do Iguaçu, **Resumo**.

FRANÇA NETA, L. S. **Clarificação de bebidas fermentadas utilizando o processo de microfiltração**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

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

GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v. 74, p. 78–88, 2006.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; E SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009

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

GUIBAL, E.; ROUSSY, J. Coagulation and flocculation of dye-containing solutions using a biopolymer (Chitosan). **Reactive e functional polymers**, v. 67, p. 33-42, 2007.

GUO, G.L.; CHEN, W.H.; CHEN, W.H.; MEN, L.C.; HWANG, W.S. Characterization of dilute acid pretreatment of silver grass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.99, p. 6046-6053, 2008.

HABERT, A. C., BORGES, C. P., NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**, Rio de Janeiro: Escola Piloto de Engenharia Química, 2006.

HARLAND, C.E. **Íon Exchange: Theory and Practice**, 2nd, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994.

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

HIRA, A.; OLIVEIRA, L.G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, p. 2450-2456, 2009.

HUANG, C.; CHEN, S.; PAN, J. R. Optimal condition for modification of chitosan: a polymer for coagulation of colloidal particles. **Water Research**, v. 34, n.3, p.1057-1062, 2000.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food Technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v.28, p.373-403, 1982.

KAWAMURA, S. Effectiveness of Natural Polyelectrolytes in Water Treatment. **Journal Awwa**. Japan, v. 79, n. 6, pp. 88-91. 1991.

KIM, S.H.; YUN, J.Y.; KIM, S.G.; SEO, J.H.; PARK, J.B. Production of xylitol from d-xylose and glucose with recombinant *Corynebacterium glutamicum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 366-371, 2010.

KIMURA, I. Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10–26, 2004.

KOBLITZ, M. G. B. **Estudo de Método para Remoção de Polissacarídeos que Precipitam em Cachaça**. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas, 1998.

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

KUSUMEGI, K.; YOSHIDA, H.; TOMIYAMA, S. Inhibitory Effects of Acetic Acid on Respiration and Growth of *Zygosaccharomyces rouxi*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 213-217, 1998.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JONSSON, L.J. Comparison of different methods for detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 91-103, 1999.

LIMA, L.H.A.; BERLINK, C.N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 195, p.66-71, 2003.

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

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S.W. Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanogenic Yeast Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 452-460, 2005.

LLOPIS, L. S.; DIEZ, F. B. Review of studies on exposure to aluminium and Alzheimer's disease. **Rev. Esp. Salud Publica**. v.76, n.6, p.645-58, 2002.

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

MABEE, W.E.; SADDLER, J.N. Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4806-4813, 2010.

MAGACHO, A.L.F. **Avaliação de técnicas de separação combinadas para a purificação de D-xilose visando à obtenção de bioprodutos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2009.

MAIA, M.C.A.; GALVÃO, A. P. G. L.K.; DELLA MODESTA, R. C.; PEREIRA JÚNIOR, N. Avaliação sensorial de sorvetes à base de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 146-151, 2008.

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

MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol-its properties and use as a sugar substitute in foods. In: FOOD R. A. SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS. London, 1973.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W., PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, p. 526–536, 2000.

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

MARTON, J.M. **Avaliação da performance de carvão ativo e resinas de troca iônica no desenvolvimento de um sistema de tratamento que minimize a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana à obtenção de xilitol**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MATILLA, P.T.; KANGASMA, H.; KNUUTTILA, M.L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism**, v. 54, p. 548–51, 2005.

MEMBRANE SEPARATIONS. In: **ENCYCLOPEDIA** of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. Canada: Editorial Board, 1999, v. 3, p. 1695–705.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M. **Vogel – Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S. A., p.139, 2002.

MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 515–522, 2002.

MORAES, E. J. C. **Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**, 157p. (Tese de Doutorado) – EEL-USP, 2008.

MORAES, K. L. C. **Estudo da coagulação-ultrafiltração para produção de água potável**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MORAES, K. L. C.; BERGAMASCO, R.; TAVARES, C. R. G. HENNIG, D.; BONGIOVANI, M. C. Utilization of the coagulation diagram in the evaluation of the natural organic matter (NOM) removal for obtaining potable water. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v.6, article A-87, 2008.

MORITA T. A.; SILVA, S. S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, p. 801–808, 2000.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for treatment of lignocelulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p. 673–86, 2005.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1991.

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

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

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I. C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 540-548, 2008.

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

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

NILVEBRANT N,O.; REIMANN A; LARSSON S; JONSSON LJ. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates with ion exchange resins. **Application Biochemistry Biotechnology**, v.91–93, p.35–49, 2001

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO, W. G. Ultra e Microfiltração de Licor de Acerola. **Brazil Journal of Food Technology**, v.8, n.4, p. 305-311, 2005.

NORONHA, Leonardo de Lima et al . Utilização de diferentes tipos de policloreto de alumínio para purificação de hidrolisado de bagaço de cana através da técnica de coagulação e floculação. **Química Nova**, v. 33, n. 8, 2010 .

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

PAN, R. J.; HUANG, C.; CHEN, S.; CHUNG, C.Y. Evaluation of modified chitosan for coagulation of colloidal particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 147, 359-364, 1999.

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

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

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

PENG, F.; REN, J.L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R.C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 6305-6317, 2009.

PITARELO, A.P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar à Bioconversão Via Pré-Tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática**. Dissertação (Mestre em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

PREZIOSI-BELLOU, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p.124-9, 1997.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 485 - 492, 2002.

RENAULT, F.; SANCEY, B.; CHARLES, J.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P.-M.; WINTERTON, P.; CRINI, G. Chitosan flocculation of cardboard-mill secondary biological wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v.155, p.775-783, 2009.

RICO, J.A.P.; MERCEDES, S.S.P.; SAUER, I. L. Genesis and consolidation of the Brazilian bioethanol: A review of policies and incentive mechanisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1874-1887, 2010.

RITCHER, C.A.; AZEVEDO NETTO, J.M. **Tratamento de água: tecnologia atualizada**. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.36, n.3, p.2715, 1991.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos USP, São Carlos, 2000.

ROCHA, G. J.M; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S; ARAÚJO, G. T. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS,5., Paraná, Brasil, 1997.

SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**,v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmo tolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SCORDIA, D.; COSENTINO, S. L.; JEFFRIES, T. W. Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5358-5365, 2010.

SENE, L.; FELIPE M.G.A.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in sugar cane bagasse hydrolysate. **Journal Basic Microbiology**, v. 38, p. 61-9, 1998.

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

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por Pichia Stipitis empregando palha de arroz**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia Química de Lorena USP, Lorena, 2007.

SILVA, S. S.; FELIPE, M .G. A., SILVA, J. B. A., PRATA, A. M. R. Acid hydrolysis of *Eucalyptus gaudis* chips for microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p.63-7, 1998.

SJOMAN,E.; MANTTARI, M.; NYSTROM, M.; KOIVIKKO, H.; HEIKKILA, H. Xylose recovery by nanofiltration from different hemicellulose hydrolyzate feeds. **Journal of Membrane Science**, v.310, p. 268–277, 2008.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 2nd [S.L] Ed. Academic Press, 1993.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKRIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F., FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZA, H.; PARAJÓ, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. **Journal of Food Engineering**, v.105, p. 1-27, 2011.

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

SPINELLI, V.A. **Quitosana: Polieletrólito Natural para o Tratamento de Água Potável**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UFSC, Florianópolis, 2001.

SUN Y.; ZHUANG J.; LIN L.; OUYANG P. Clean conversion of cellulose into fermentable glucose. **Biotechnology Advances**, v.27, p.625-632, 2009

SUN, J.X.; SUN, R.; SUN, X-F.; SU, Y. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 39, p. 291-300, 2004.

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

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Produção de etanol no Brasil. Disponível em <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>> Acesso: 15 de junho, 2011.

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

VILLA, P., FELIPE, M.G.A., RODRIGUEZ, R.C.L.B., VITOLO, M., BEIS, E.L., SILVA, S.S., NAPOLES, A.I., MANCILHA, I.M., Influence of phenolic compounds on bioprocess of xylitol production by *C. guilliermondii*. In: 2nd EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE. 2., 1998. Porto.

VILLARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 17–24, 2006.

VIÑALS, M.V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena. Lorena. São Paulo. 2001.

WICKRAMASINGHE, S. R.; GRZENIA, D.L. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. **Desalination**, v.234, p. 144-155, 2008.

XAVIER, A.M.R.B.; CORREIA, M.F.; PEREIRA S.R.; EVTUGUIN, D.V. Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2755-2761, 2010.

XIAOLI C.; YOUCAI, Z. Adsorption of phenolic compound by aged-refuse. **Journal of Hazardous Materials**, v.137, p.410-417, 2006.

YANG, S.T. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**, 1 ed. Elsevier, Ohio, USA, 2007.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 524–530, 2000.