

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RAIANNI OLIVEIRA FERNANDES

Destoxificação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica por processos oxidativos
avançados

Lorena
2023

RAIANNI OLIVEIRA FERNANDES

Destoxificação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica por processos oxidativos
avançados

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 de Desenvolvimento de Produtos e Processos.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Alves Silva

Versão Corrigida

Lorena
2023

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernandes, Raianni Oliveira
Destoxificação de hidrolisados de biomassa
lignocelulósica por processos oxidativos avançados /
Raianni Oliveira Fernandes; orientador João Paulo
Alves Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
116 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2023

1. Processos oxidativos avançados. 2.
Destoxificação. 3. Hidrolisados. 4. Biomassa
lignocelulósica. 5. Etanol. I. Título. II. Silva, João
Paulo Alves, orient.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Valdirene e Gideoni. Vocês foram
essenciais em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me guiou em todos os momentos e me deu forças para chegar até aqui.

Aos meus pais, Maria Valdirene e Gideoni, por todo apoio, amor e força, que nunca deixaram de acreditar em mim e me fazer lembrar disso nos momentos em que mais precisei. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. João Paulo Alves Silva, por todo ensinamento, paciência e orientação durante a execução do trabalho, que mesmo diante das dificuldades, se manteve presente e acreditou na minha capacidade.

Aos meus amigos de laboratório Camilla, Jéssica, Paulo, Valdimir, entre outros, que me acompanharam e me ajudaram durante essa caminhada.

À Camilla, aluna de iniciação científica, que foi meu braço direito principalmente nesta reta final do mestrado.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL), em especial, ao Departamento de Engenharia Química, pela disponibilização dos laboratórios para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos de que alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

FERNANDES, R. O. **Destoxificação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica por Processos Oxidativos Avançados**. 2023. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

A biomassa lignocelulósica é uma das matérias-primas de maior importância para biorrefinarias devido a seu baixo custo, abundância e seu caráter renovável. Durante o processamento destas biomassas são obtidos hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis, nos quais, além dos açúcares podem estar presentes compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano. Uma estratégia para melhorar os processos de bioconversão microbiana dos açúcares presentes nos hidrolisados são os processos de destoxificação. Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) apresentam potencial para aplicação na destoxificação de hidrolisados, porém, pesquisas sobre tal aplicação ainda são escassas. Desta forma o presente estudo avaliou o emprego de POAs para destoxificação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos, comparando-o à métodos amplamente estudados, como uso de Carvão ativado e Overliming, e avaliando ainda novas estratégias de uso combinado (Overliming-POAs). Foram também avaliadas a aplicação de POAs na destoxificação de hidrolisados de diferentes biomassas vegetais (palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café). Em todas as etapas dos estudos foram considerados os efeitos dos tratamentos sobre a redução do teor de compostos inibidores e sobre a bioconversão dos açúcares dos hidrolisados pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124, como modelo de processo de bioconversão. Na comparação dos diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando os métodos de POAs, Overliming, Carvão ativado e Combinação de Overliming-POAs, foram alcançadas reduções na concentração de compostos fenólicos de baixa massa molecular (94%, 84%, 44% e 97%, respectivamente), compostos fenólicos totais (40%, 31%, 24% e 58%, respectivamente) e furanos (71%, 63%, 90% e 70%, respectivamente). Os tratamentos por POAs e Carvão ativado foram os únicos que preservaram a concentração de açúcares no hidrolisado tratado, sendo o tratamento por POAs o que proporcionou maior recuperação volumétrica de hidrolisados tratado (cerca de 93%). No processo de bioconversão dos açúcares a etanol por *S. stipitis*, foram observadas melhoras no crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol em decorrência do tratamento do hidrolisado por POAs, Overliming e pela combinação destes. Comparado ao acúmulo de etanol no cultivo em hidrolisado não tratado (3,8 g/L em 120 h), foram alcançadas concentrações quatro vezes maiores em hidrolisado tratado por POAs (21,6 g/L) e Overliming (18,7 g/L) e seis vezes maior para hidrolisado tratado com a combinação de Overliming-POAs (33,2 g/L). Na comparação econômica simplificada, o menor custo operacional por unidade volumétrica de etanol produzido foi estimado para o tratamento por POAs (USD 859,47/m³), sendo inferior ao estimado para o hidrolisado não tratado (USD 1.481,23/m³). O tratamento por POAs se mostrou eficaz na destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas, como palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café. Verificou-se ainda que POAs foi capaz reduzir a concentração de compostos inibidores (entre 49% e 68% para de compostos fenólicos de baixa massa molecular e 11% e 62% para furanos), além de melhorar a etapa subsequente de bioconversão dos açúcares presentes nos hidrolisados tratados (com aumentos de 2 a 5 vezes na produção de etanol). Desta forma, este estudo demonstrou que o método de destoxificação por POAs podem ser aplicados com eficácia para a destoxificação de diferentes hidrolisados, sendo economicamente vantajoso frente a outros métodos de destoxificação.

Palavras-chave: Processos Oxidativos Avançados. Destoxificação. Hidrolisados. Biomassa lignocelulósica. Etanol.

ABSTRACT

FERNANDES, R. O. **Advanced Oxidation Processes applied to detoxification of lignocellulosic biomass hydrolysates**. 2023. 116 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Lignocellulosic biomass plays an important role as a raw material in the biorefineries due to its low cost, abundance and renewable nature. During biomass processing a hydrolysate rich in fermentable sugars are obtained, along with other compounds potentially inhibiting microbial metabolism. Detoxification processes represent a strategy to improve the microbial bioconversion of hydrolysates sugars. Advanced Oxidation Processes (AOPs) have potential for application in hydrolysates detoxification; however, they are still scarcely explored. Thus, the present study evaluated the use of AOPs for lignocellulosic biomass hydrolysates detoxification, comparing it to the widely studied methods, such as the use of Activated Charcoal and Overliming, and evaluating new strategies of combined use (Overliming-POAs). The application of AOPs in the detoxification of hydrolysates from different biomasses (rice straw, sugarcane bagasse and spent coffee grounds) was also evaluated. At all stages of the studies, the effects of treatments on the reduction of the content of inhibitory compounds and on the bioconversion of sugars in hydrolysates by the yeast *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 were considered, as a model of the bioconversion process. The different methods of detoxification of rice straw hemicellulosic hydrolysate, by POAs, Overliming, Activated charcoal and Combination of Overliming-AOPs, were able to reduce the concentration of low molecular weight phenolic compounds (94%, 84%, 44% and 97%, respectively), total phenolic compounds (40%, 31%, 24% and 58%, respectively) and furans (71%, 63%, 90% and 70%, respectively). The treatments with AOPs and activated carbon were the only ones that preserved the concentration of sugars in the treated hydrolysate. In addition, the treatment with AOPs provided the highest volumetric recovery of treated hydrolysates (about 93%). In the process of bioconversion of sugars to ethanol by *S. stipitis*, improvements in cell growth, sugar consumption and ethanol production were observed as a result of the treatment of the hydrolysate by AOPs, Overliming and their combination. Compared to the accumulation of ethanol in cultivation in untreated hydrolysate (3.8 g/L in 120 h), four times higher concentrations were achieved in hydrolysate treated by AOPs (21.6 g/L) and Overliming (18.7 g/L) and six times higher for hydrolysate treated with the Overliming-AOPs combination (33.2 g/L). In the simplified economic analysis, the lowest operating cost per volumetric unit of ethanol produced was estimated for the treatment by AOPs (USD 859.47/m³), which was lower than that estimated for the untreated hydrolysate (USD 1,481.23/m³). AOPs treatment proved to be effective in the detoxification of hemicellulosic hydrolysates from different biomasses, such as rice straw, sugarcane bagasse and spent coffee grounds. It was also found that AOPs were able to reduce the concentration of inhibitor compounds (between 49% and 68% for low molecular weight phenolic compounds and 11% and 62% for furans), in addition to improving the subsequent stage of bioconversion of the sugars present in treated hydrolysates (with two to five times increases in ethanol production). Thus, this study demonstrated that AOPs detoxification method can be effectively applied for the detoxification of different hydrolysates, being economically advantageous compared to other detoxification methods.

Keywords: Advanced Oxidative Processes. Detoxification. Hydrolysates. Lignocellulosic biomass. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Classificação de biorrefinaria com base no modo de operação.23
- Figura 3.2** - Estrutura lignocelulósica da parede celular de vegetais (B) e suas principais frações: Celulose (Aa); Hemicelulose (Ab); Monolignóis (Ac) e Lignina (Ad).....25
- Figura 3.3** - Estrutura química da hemicelulose, com alguns dos seus grupos de açúcares.....30
- Figura 3.4** - Produtos possíveis de degradação da celulose, hemicelulose e lignina resultantes o processo de hidrólise.33
- Figura 5.1** - Relação entre a temperatura e o tempo durante a operação do reator de 350 L, utilizado para reação da hidrólise ácida da hemicelulose, com destaque para o período de aquecimento em temperatura superior à 100 °C (1) e período de reação com temperatura d cerca de 121 °C (2).59
- Figura 5.2** - Crescimento celular durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).....63
- Figura 5.3** - Consumo de glicose (a) e xilose (b) durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).....64
- Figura 5.4** - Produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).....66
- Figura 5.5** - Volume recuperado de hidrolisado após ajuste direto de pH para condição de fermentação (a); e após tratamento de destoxificação por processos: POAs (b) nas etapas de ajuste de pH 8,5 (b.1) e POAs (b.2); tratamento por Overliming (c); Tratamento por carvão ativado (d); e tratamento combinado Overliming-POAs (e).70
- Figura 5.6** - Porcentagem de recuperação da concentração de açúcares totais (xilose, glicose e arabinose) no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido após ajuste direto de pH para condição de fermentação (a); e após tratamento de destoxificação por processos: POAs (b); tratamento por Overliming (c); Tratamento por carvão ativado (d); e tratamento combinado Overliming-POAs (e).73
- Figura 5.7** - Crescimento celular durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado com 80g/L de xilose (◆) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲).75
- Figura 5.8** - Consumo de glicose (a) e xilose (b) durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de

arroz não tratado com 80g/L de xilose (◆) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲). 77

Figura 5.9 - Produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado com 80g/L de xilose (◆) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲). 79

Figura 5.10 - Cromatogramas da análise de compostos fenólicos de baixa massa molecular por HPLC, dos hidrolisados de palha de arroz (a), bagaço de cana (c) e borra de café (c), tratado por POAs (linha vermelha) e antes de seu tratamento (linha preta pontilhada). As setas azuis apontam os picos dos compostos identificados como: Ácido gálico (1); HMF (2); Ácido furóico (3); Álcool vanilil (4); Furfural (5); Ácido vanílico (6); Ácido siríngico (7); Vanilina (8); Siringaldeído (9); Ácido p-cumárico (10); Ácido ferúlico (11). Enquanto a seta cinza pontilhada (número 12) mostra um pico não confirmado, mas muito provavelmente um indicador da presença de ácido cafeico. 89

Figura 5.11 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. 93

Figura 5.12 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. 95

Figura 5.13 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de borra de café. 96

Figura 5.14 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (●). 99

Figura 5.15 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (●). 101

Figura 5.16 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de borra de café não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (●). 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição da biomassa lignocelulósica (em fração mássica) quanto as frações de celulose, hemicelulose e lignina.....	26
Tabela 3.2 - Processos de destoxificação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica.	36
Tabela 5.1 - Composição da palha de arroz utilizada.	58
Tabela 5.2 - Composição do hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz obtido no processo de hidrólise ácida.	61
Tabela 5.3 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado original (não tratado) e após os tratados por POAs, Overliming, Carvão Ativo e Processo Combinado (Overliming-POAs).	68
Tabela 5.4 - Comparação dos diferentes tipos de tratamentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, quanto a demanda de insumos e ao custo de tratamento, normalizados pelo volume de hidrolisado tratado e pelo volume de etanol produzido na fermentação. Dados referentes ao hidrolisado não tratado são apresentados para fins de comparação.....	83
Tabela 5.5 - Composição do bagaço de cana de açúcar e da borra de café utilizados comparados com outros trabalhos na literatura.	85
Tabela 5.6 - Composição do hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz, bagaço de cana e borra de café obtidos pelo processo de hidrólise ácida.....	86
Tabela 5.7 - Variação das concentrações de compostos fenólicos de baixa massa molecular (CFBMM) e furanos nos hidrolisado de palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café, antes e após tratamento por POAs.	90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3.1	USO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM BIORREFINARIAS	22
3.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	24
3.3	FRACIONAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	27
3.4	PRODUÇÃO DE ETANOL POR BIOPROCESSOS	31
3.4.1	INIBIDORES DO METABOLISMO MICROBIANO	32
3.4.2	TOXICIDADE DOS COMPOSTOS INIBIDORES	34
3.5	PROCESSOS DE DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS	35
3.5.1	DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO	45
4.1.1	MATÉRIA-PRIMA	45
4.1.2	HIDRÓLISE ÁCIDA	45
4.1.3	CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO	45
4.2	TRATAMENTOS DE DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ	46
4.2.1	TRATAMENTOS POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAS)	46
4.2.1.1	Quantificação do ozônio	46
4.2.2	TRATAMENTO POR OVERLIMING	47
4.2.3	TRATAMENTO POR CARVÃO ATIVADO	47
4.2.4	TRATAMENTO POR PROCESSO COMBINADO OVERLIMING-POAS	47
4.3	PROCESSO DE BIOCONVERSÃO	48
4.3.1	MICROORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO	48
4.3.2	MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	49
4.4	ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DOS EXPERIMENTOS	49
4.4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	49
4.4.1.1	Determinação do teor de umidade das biomassas lignocelulósicas	49
4.4.1.2	Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina insolúvel (Klason)	49
4.4.1.3	Determinação de lignina solúvel	51
4.4.1.4	Determinação do grupo acetil	52
4.4.1.5	Determinação do teor de cinzas	52
4.4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS	53
4.4.2.1	Determinação de pH	53
4.4.2.2	Determinação de cinzas	53
4.4.2.3	Determinação dos teores de carboidratos e ácido acético	53
4.4.2.4	Determinação dos compostos fenólicos totais	54
4.4.2.5	Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural e compostos fenólicos de baixa massa molar	54

4.4.2.6 Determinação do fator de severidade combinada (CS)	54
4.4.3 ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DO PROCESSO DE BIOCONVERSÃO	55
4.4.3.1 Determinação dos teores dos açúcares, etanol e ácido acético	55
4.4.3.2 Determinação da concentração celular	55
4.4.3.3 Fator de conversão de xilose em etanol ($Y_{P/S}$)	56
4.4.3.4 Fator de conversão de xilose em células ($Y_{X/S}$)	56
4.4.3.5 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ TRATADO POR DIVERSOS MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO	57
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE ARROZ	57
5.1.2 HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ	58
5.1.3 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO CONCENTRADO DE PALHA DE ARROZ NÃO TRATADO POR <i>SCHEFFERSOMYCES STIPITIS</i> NRRL-Y-7124	62
5.1.4 COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DESTOXIFICAÇÃO APLICADOS AO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ	67
5.1.4.1 Volume recuperado após os tratamentos	69
5.1.4.2 Influência dos tratamentos de destoxificação sobre a concentração de açúcares totais	71
5.1.5 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS DE DESTOXIFICAÇÃO	74
5.1.6 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE CUSTOS OPERACIONAIS DOS DIFERENTES MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO	79
5.2 AVALIAÇÃO DO EMPREGO DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS PARA DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS DE DIFERENTES BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	84
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E BORRA DE CAFÉ.	84
5.2.2 AÇÃO DOS POAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR DURANTE OS TRATAMENTOS DE DESTOXIFICAÇÃO	88
5.2.3 AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DOS HIDROLISADOS APÓS TRATAMENTO POR POAS	97
6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

A principal motivação pela busca por fontes de energia renováveis é devido ao impacto ambiental causado pelo aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, o qual se deve à utilização de combustíveis fósseis para diversos fins, dentre eles o setor automotivo, que é responsável por grande parte das emissões. Visando à redução destas emissões de dióxido de carbono, há um crescente interesse na utilização de fontes renováveis de matéria-prima, tendo como consequência um grande aumento na sua demanda nas próximas décadas.

Atualmente, as principais fontes de matéria-prima utilizadas para processos de bioconversão referem-se a açúcares provenientes da cana-de-açúcar, do amido de milho e de beterraba. Estes produtos agrícolas têm grandes aplicações alimentícias, o que desperta um interesse por novas alternativas. Uma possível e promissora fonte de matéria-prima para emprego em biorrefinarias são os materiais lignocelulósicos. Estes materiais representam uma fonte de matéria-prima renovável abundante em todo o mundo, disponível na forma de resíduos agrícolas e florestais. Estes resíduos são gerados e acumulados na natureza, o que resulta em sérios problemas de poluição ambiental. O desenvolvimento de tecnologias que visam o aproveitamento em larga escala destes resíduos representa um grande desafio atual, o que permitirá aumentar a disponibilidade de fontes de carbono para emprego em processos biotecnológicos sem que para isso seja necessário o aumento de áreas cultivadas ou concorrer com o fornecimento de alimentos.

A utilização de materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas requer a separação dos carboidratos provenientes da celulose e hemicelulose por meio de processos de hidrólise ácida ou enzimática, levando à obtenção de hidrolisados ricos em açúcares. Entretanto, nos processos de separação destes carboidratos é gerada uma variedade de subprodutos capazes de interferir no metabolismo microbiano, prejudicando os processos fermentativos, reduzindo o consumo de açúcares e, conseqüentemente, limitando a produtividade dos processos de bioconversão. Desta forma a etapa de destoxificação representa um importante aspecto a ser considerado para a melhoria dos processos fermentativos empregando hidrolisados de materiais lignocelulósicos, sendo importante a busca por novas alternativas que contribuam com esta etapa.

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são processos muito estudados para tratamento de diversos tipos de efluentes potencialmente tóxicos, entretanto seu emprego como método de destoxificação de hidrolisado de materiais lignocelulósicos para a melhoria de processos de bioconversão tem sido pouco reportada na literatura.

Em trabalhos anteriores, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, buscou-se avaliar o potencial da aplicação dos POAs na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para melhorar o processo de produção de etanol por leveduras. Em tais estudos foram alcançados resultados promissores, o que resultou até o presente momento na publicação de artigos e em uma patente registrada, demonstrando o potencial inovador deste processo.

Dentro desta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar o tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados (POAs) em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz comparando-o com outros tratamentos frequentemente utilizados na literatura (Overliming e Carvão ativado) e Processo combinado (Overliming + POAs) e analisar o tratamento por POAs em hidrolisados hemicelulósicos obtido por diferentes materiais (palha de arroz, bagaço de cana e borra de café), visando melhorar o processo biotecnológico de produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124. Além disso, foram realizados estudos sobre os processos de destoxificação visando avaliar a cinética de degradação dos compostos potencialmente inibidores presentes no hidrolisado, assim como os efeitos dos tratamentos sobre o processo de bioconversão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o emprego de Processos Oxidativos Avançados como método de tratamento de destoxificação de hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas, assim como compará-lo a outros processos de destoxificação comumente descritos na literatura.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo principal proposto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o grau a tolerância da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificados.
- Avaliar os tratamentos de destoxificação (Processos Oxidativos Avançados, Overliming, Carvão ativado, Processo combinado Overliming + POAs) em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, a fim de avaliar sua eficácia na remoção dos compostos inibidores presentes no hidrolisado, assim como seus efeitos sobre o processo de bioconversão, e possibilitar uma comparação destes processos.
- Avaliar a aplicabilidade do tratamento por POAs para a destoxificação de hidrolisados de outras biomassas (bagaço de cana-de açúcar e borra de café). Avaliando os efeitos do tratamento na cinética de degradação dos compostos potencialmente inibidores, bem como seus efeitos sobre o processo de bioconversão.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias

A grande dependência atual de matérias-primas de origem fóssil para fins energéticos e insumos químicos industriais, associada à diminuição das reservas de petróleo e a problemas ambientais decorrentes do uso de tais recursos, tem motivado a busca por alternativas sustentáveis, como o uso de biomassa em larga escala. Neste contexto surgem as chamadas biorrefinarias como uma alternativa capaz de substituir a refinaria de petróleo. Tais instalações industriais poderiam processar biomassa em larga escala, e convertê-las em uma grande variedade de produtos de interesse econômico, incluindo biocombustíveis, insumos químicos industriais e biomateriais, como biopolímeros e energia (CLARK; DESWARTE, 2015). O processamento de biomassa em biorrefinarias deve seguir os princípios de desenvolvimento sustentável, com o emprego de tecnologias de processamento verde, limitação do consumo de energia e impacto ambiental e eficiência na utilização de matérias-primas que devem ser as mais completas possíveis, evitando a geração de resíduos (GULLÓN *et al.*, 2012). A substituição de produtos químicos derivados do petróleo por biomassa desempenhará um papel fundamental no futuro da indústria química (MENON; RAO, 2012).

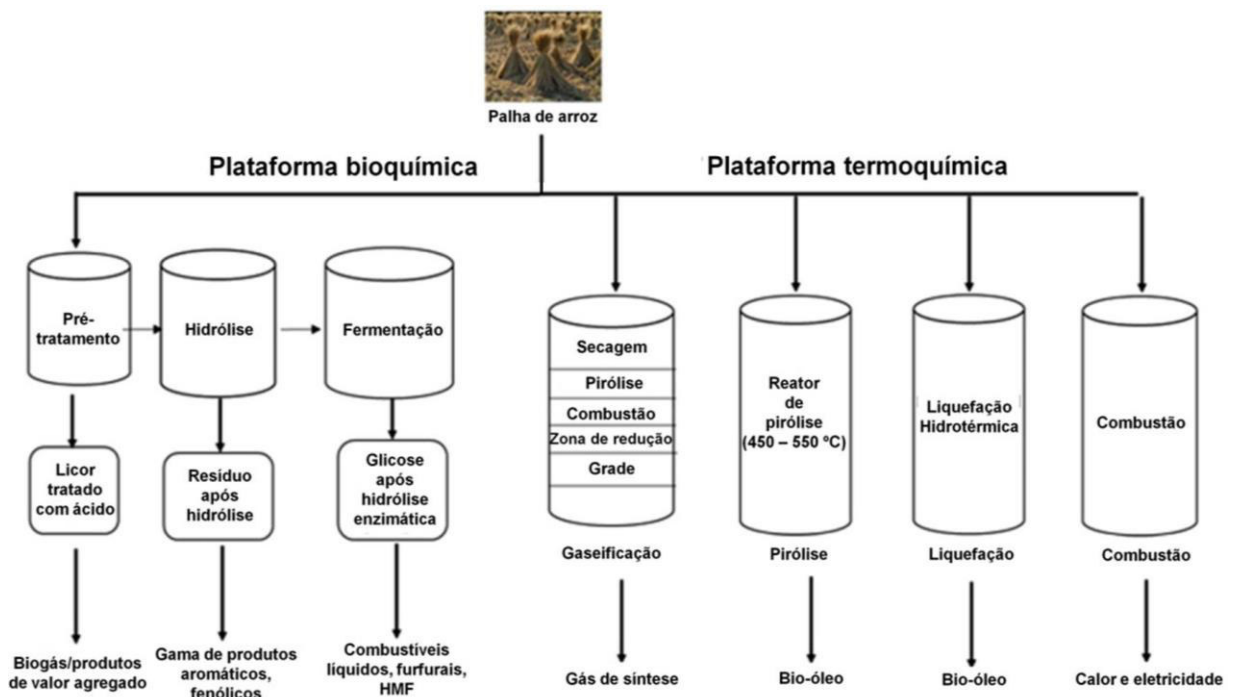
A biomassa pode ser derivada de materiais vegetais (lignocelulósicos ou oleaginosos), e microbiana (como microalgas, cianobactérias, fungos e leveduras). Dentre estes, a biomassa vegetal lignocelulósica vem recebendo grande atenção, devido a sua disponibilidade e baixo custo. Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são celulose, hemicelulose e lignina. Cada biomassa apresenta composições distintas e estruturas específicas (HUANG *et al.*, 2013).

Os produtos químicos mais importantes que podem ser produzidos por biorrefinarias são: ácidos orgânicos (succinósicos, lácticos, itacônicos, e outros derivados do açúcar), polímeros e resinas (plásticos à base de amido, resinas fenólicas, resinas de furano), biomateriais (painéis de madeira, celulose, papel), alimentos e ração animal, fertilizantes, biocombustíveis gasosos (biogás, syngas, hidrogênio, biometano), biocombustíveis sólidos (carvão), biocombustíveis líquidos (biodiesel, etanol, bio-óleo) (CHERUBINI, 2010). A escolha dos produtos de

biorrefinaria deve ser feita com base na economia e sustentabilidade da logística de biomassa.

As biorrefinarias podem ser classificadas com base no modo de operação: plataforma termoquímica e plataforma bioquímica, conforme Figura 3.1. A biorrefinaria de plataforma bioquímica apresenta como principais processos de fracionamento da biomassa as etapas de hidrólise dos polissacarídeos e a bioconversão dos açúcares, obtendo diversos produtos de interesse comercial e biocombustíveis. Na biorrefinaria de plataforma termoquímica, o processamento da biomassa pode compreender etapas como pirólise, gaseificação, liquefação e combustão, possibilitando gerar diferentes produtos em cada um destes processos. A produção de biocombustíveis líquidos a partir da biomassa lignocelulósica de forma economicamente competitiva ainda é um desafio e, portanto, a geração de coprodutos de alto valor, associados à produção de biocombustíveis líquidos, pode permitir a viabilidade econômica de biorrefinarias. Embora essa abordagem pareça promissora, a avaliação cuidadosa da seleção de produtos, a disponibilidade de matéria prima, a localização e o tamanho da planta são fatores que determinam aspectos econômicos da biorrefinaria (ABRAHAM *et al.*, 2016).

Figura 3.1 - Classificação de biorrefinaria com base no modo de operação.



Fonte: Adaptado de Abraham *et al.* (2016).

3.2 Biomassa lignocelulósica

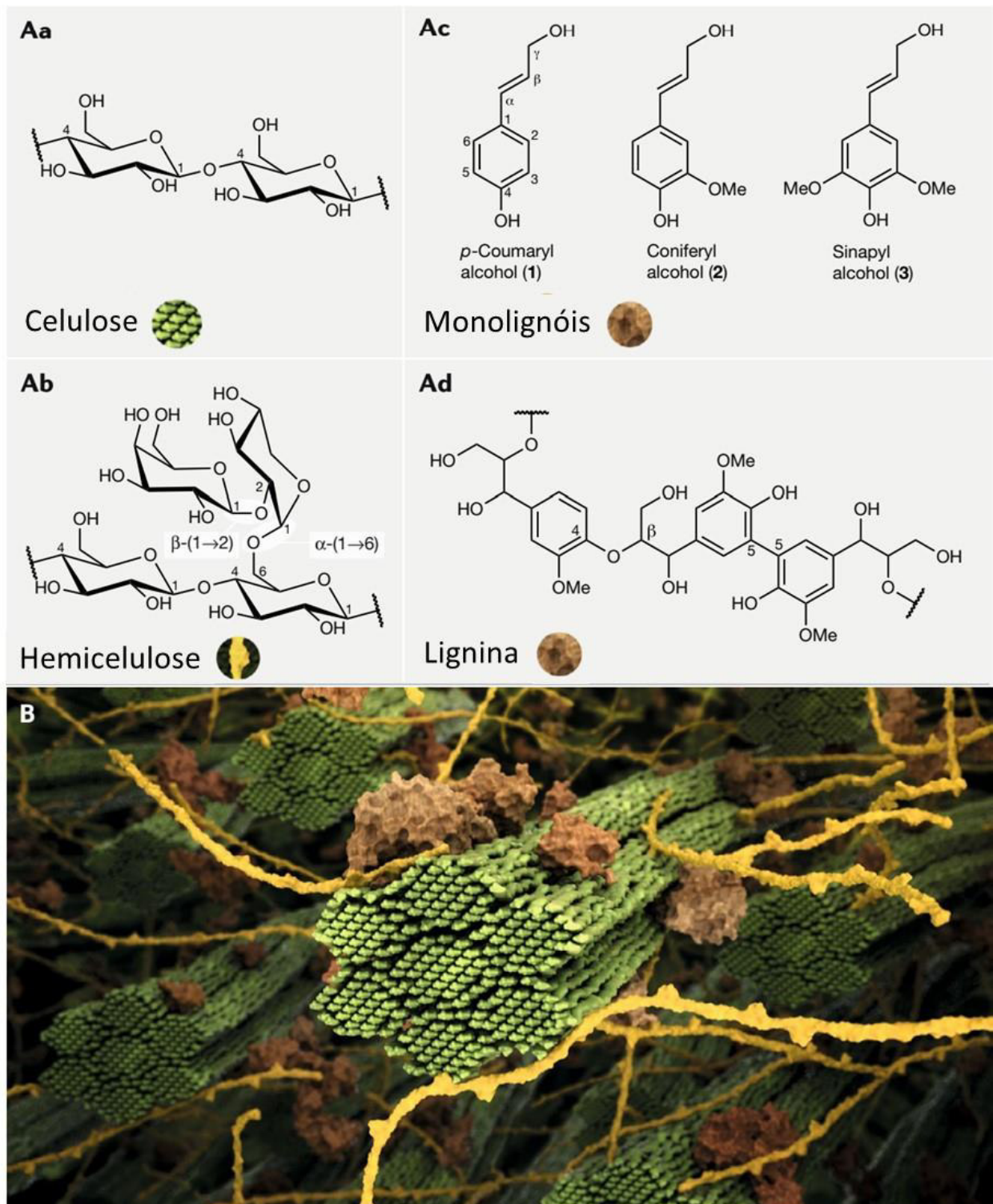
Os materiais lignocelulósicos correspondem a uma das fontes mais promissoras de matéria-prima renovável para diversos processos biotecnológicos em razão ao seu baixo valor econômico e alta disponibilidade. Eles correspondem a aproximadamente 60% da biomassa vegetal, podendo ser: resíduos celulósicos, madeira de lei, madeira de conífera, resíduos de colheitas, biomassas herbáceas e resíduos sólidos municipais (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). De acordo com o Conselho Internacional de Grãos (IGC), a produção mundial de grãos em 2019/2020 foi estimada em 2,2 bilhões de toneladas, sendo 500 milhões de toneladas de arroz, representando 23,2% do número total de grãos produzido mundialmente. O Brasil está entre os principais produtores agrícolas mundiais, e conseqüentemente possui um grande potencial de resíduos agroindustriais.

A estrutura lignocelulósica encontra-se na parede celular do vegetal, a qual é constituída por uma estrutura rígida e fibrosa composta basicamente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) os quais estão ligados a uma estrutura amorfa constituída por ligações poliméricas tridimensionais entre unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações, denominada lignina (PAULY; KEEGSTRA, 2008).

A celulose é um polímero insolúvel em água formado por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas; a hemicelulose compõe-se de várias pentoses e hexoses acopladas por diversas formas de ligações glicosídicas; e a lignina é um polímero tridimensional constituído de unidades de fenil propano (WYMAN *et al.*, 2004). As cadeias de celulose são envolvidas por ligações de hidrogênio nas chamadas microfibrilas, as quais são ligadas umas às outras pela hemicelulose e cobertas por lignina, conforme Figura 3.2. Essas microfibrilas são frequentemente associadas na forma de macrofibrilas (PETRIDIS, SMITH, 2018).

As proporções de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa lignocelulósica dependem do tipo de plantas, conforme mostrado na Tabela 3.1. De modo geral, a biomassa vegetal apresenta como maior fração a celulose (25 a 50%), seguida pela hemicelulose (20 a 35%) e pela lignina (12 a 20%), incluindo também pequenas quantidades de minerais (cinzas) e uma variedade de outros compostos, denominados extrativos (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Figura 3.2 - Estrutura lignocelulósica da parede celular de vegetais (B) e suas principais frações: Celulose (Aa); Hemicelulose (Ab); Monolignóis (Ac) e Lignina (Ad).



Fonte: Petridis; Smith (2018).

Tabela 3.1 - Composição da biomassa lignocelulósica (em fração mássica) quanto as frações de celulose, hemicelulose e lignina.

Material vegetal	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Bagaço de cana de açúcar	36,9 – 45,7	25,6 – 29,6	18,9 – 26,1	ROCHA, <i>et al.</i> 2015
Palha de cana de açúcar	30 - 37	25 - 30	18 - 22	MENANDRO, <i>et al.</i> 2017
Casca de arroz	35	33	23	JOHAR, AHMAD, DUFRESNE, 2012.
Palha de arroz	33 - 47	19 - 27	5 - 24	SINGH, SRIVASTAVA, SHUKLA, 2016.
Palha de trigo	35 - 45	20 - 30	8 - 15	MOHANTY, ABDULLAHI, 2016.
Madeira	25 - 40	45 - 47	20 - 25	LIMAYEM, RICKE, 2012.
Casca de coco	44	12	33	KOBAYASHI, FUKUOKA, 2013.

Fonte: O Autor.

Tendo em vista que os materiais lignocelulósicos são compostos por complexos polímeros heterogêneos de carboidratos, densamente envolvidos pela lignina, sua utilização em aplicações biotecnológicas requer uma separação seletiva destes constituintes (BINOD *et al.*, 2010). A conversão da biomassa lignocelulósica em produtos de maior valor agregado, como insumos químicos ou a produção de biocombustível, requer um processamento de várias etapas, como: (i) hidrólise dos polissacarídeos (ii) destoxificação dos hidrolisados e (iii) processo de bioconversão (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

A separação das diferentes frações dos materiais lignocelulósicos por meio da hidrólise destes materiais tem como objetivo viabilizar a utilização dos carboidratos provenientes da celulose e hemicelulose. É possível utilizar diferentes métodos de tratamento físico, químico e bioquímico e variadas combinações dos mesmos (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013).

No Brasil, existe uma grande variedade de resíduos com potencialidades para uso como matéria prima em biorrefinarias, dentre eles encontra-se a palha de arroz. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra de grãos brasileira em 2021/2022 foi estimada em 270,9 milhões de toneladas, sendo 10,8 milhões de toneladas de arroz, representando 4% da produção total de grãos brasileira. Com isso, gera-se uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos, como a palha de arroz. Segundo Abraham *et al.* (2016), para cada tonelada de arroz produzido, é gerada uma tonelada e meia de palha de arroz, sendo inferida uma disponibilidade de cerca de 15,6 milhões de toneladas de palha de arroz na safra atual.

A palha de arroz gerada após a colheita de grãos é usualmente deixada no campo. Entretanto, a palha de arroz tem várias características que a tornam uma matéria-prima potencial para uso como matéria-prima em biorrefinarias. Possui alto teor de celulose e hemiceluloses (de 50 a 74%) que podem ser hidrolisados em açúcares fermentáveis. A logística de coleta poderia ser melhorada através do enfardamento, entretanto a necessidade de equipamento para tal operação teria um impacto econômico para os produtores de arroz. Sendo assim, as tecnologias para usar palha de arroz para fins industriais devem ser especialmente eficientes para compensar os custos envolvidos na coleta de palha (BINOD *et al.*, 2010).

3.3 Fracionamento da biomassa lignocelulósica

O fracionamento permite a solubilização ou separação dos principais componentes da biomassa, celulose, hemicelulose e lignina, melhorando a digestibilidade do material lignocelulósico. A escolha do tipo de tratamento deve considerar a compatibilidade geral de matérias-primas, enzimas, e organismos a serem aplicados (MENON; RAO, 2012).

No Quadro 3.1, estão descritos os principais métodos de fracionamento de biomassa lignocelulósica. Os métodos utilizando ácidos atuam na hidrólise da hemicelulose, enquanto os métodos alcalinos atingem a fração de lignina. Já os processos hidrotérmicos solubilizam a hemicelulose, sem atingir a hidrólise completa. Os métodos oxidativos removem a lignina e parte da hemicelulose e os processos químicos visam principalmente a lignina. Métodos em que se utilizam

solventes alternativos promovem a dissolução da biomassa lignocelulósica, especificamente ou de todo o material (JONSSON; MARTÍN, 2016).

Quadro 3.1 – Principais métodos de fracionamento da biomassa lignocelulósica.

Métodos de fracionamento	Efeito principal	Produtos químicos utilizados	Formação de subprodutos
Métodos baseados em ácido	Hidrólise de hemiceluloses em monossacarídeos	Envolve catalisadores como H_2SO_4 , SO_2 , HCl , H_3PO_4	Ácidos carboxílicos alifáticos, compostos fenílicos, furanos, etc.
Processamento hidrotérmico	Solubilização de hemiceluloses sem hidrólise completa	Sem aditivos	Ácido acético, quantidades menores de aldeídos de furano
Métodos alcalinos de baixa concentração	Remoção de lignina e uma pequena parte das hemiceluloses	Envolve álcalis como $NaOH$, $Ca(OH)_2$, NH_3	Ácido acético, hidroxiácidos, ácidos dicarboxílicos, compostos fenólicos
Métodos oxidativos	Remoção de lignina e parte da hemicelulose	Envolve oxidantes como H_2O_2 e O_2 (condições alcalinas) e O_3	Ácido aldônicos e aldáricos, ácido furóico, ácidos fenólicos, ácido acético
Processos químicos de polpação	Métodos que visam a lignina, e até certo ponto, hemicelulose	Kraft polpa, polpa de sulfito, polpa de sódio	Ácidos alifáticos
Solventes alternativos	Dissolução de componentes lignocelulósicos específicos ou toda a biomassa	Líquidos iônicos, como cloreto de 1-alkil-3-metilimidazólio	Depende do solvente e condições

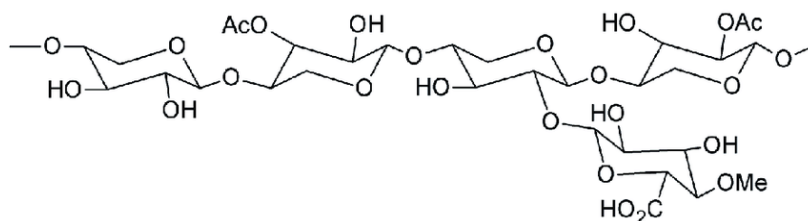
Fonte: Jonsson, Martín (2016).

A lignina é um polímero tridimensional constituído por subunidades fenilpropanóides ligadas entre si por uma variedade de ligações éter e carbono-carbono e está diretamente entrelaçada na parede celular da planta com hemiceluloses, formando uma matriz para ocultar as microfibrilas de celulose cristalina. Possui uma estrutura aromática e complexa que dificulta sua degradação (RICO *et al.*, 2014). É a única matéria-prima renovável de grande volume que contém aromáticos (TUCK *et al.*, 2012). É destacada a produção de vanilina a partir de lignossulfonatos, um subproduto da indústria de polpa de sulfito, produzido a partir da lignina. O rendimento máximo de vanilina do processo industrial otimizado é de apenas 7,5% em massa, mas concorre com processos de produção de vanilina por rotas petroquímicas (BJORSVIK; MINISCI, 1999; SHELDON; BEKKUM, 2001). A lignina usualmente é utilizada como fonte de energia na indústria de celulose (TUCK *et al.*, 2012).

Os tratamentos para deslignificação podem ser classificados como: físico, físico-químico, químico, biológico, e uma combinação entre diferentes métodos. Os métodos físicos podem ser mecânicos, como trituração e não-mecânicos como o pré-tratamento a vapor. Os pré-tratamentos químicos são utilizados especificamente para remoção da lignina ao redor da celulose e destruição da sua estrutura cristalina. As principais alterações físico-químicas que acontecem devido a diferentes tipos de pré-tratamento são: grau de polimerização da celulose, alteração na área superficial, volume de poros, cristalinidade da biomassa, fusão e realocação de lignina (SINGH; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2016).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo de baixo peso molecular mais comum encontrado na natureza, presente nas paredes celulares das plantas, juntamente com celulose e lignina. É constituída por combinações de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e glicose), normalmente acetilada e possui grupos de cadeia lateral, como ácido urônico e éster 4 - O - metílico (NASCIMENTO *et al.*, 2014). A estrutura química da hemicelulose está representada na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Estrutura química da hemicelulose, com alguns dos seus grupos de açúcares.



Fonte: Nascimento *et al.* (2014).

O grau de polimerização da hemicelulose está tipicamente na faixa de 50 a 300, sendo menor que o da celulose. A quantidade de hemicelulose varia entre diferentes tipos de biomassa (PENG *et al.*, 2012; HU; RAGAUSKAS, 2012).

Os pré-tratamentos usualmente utilizados para recuperação dos açúcares presentes na hemicelulose são: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído, hidrólise alcalina, hidrólise com SO₂, hidrólise com peróxido de hidrogênio, explosão a vapor (autohidrólise), explosão fibra amoníaco (AFEX), oxidação úmida, cal, água quente líquida, explosão de CO₂ e tratamentos com solventes orgânicos. Com a utilização destes métodos, a biomassa é reduzida e sua estrutura física fica exposta (SAHA, 2003).

Os açúcares derivados da hemicelulose podem ser comercializados como oligômeros (geralmente como xilooligossacarídeos de valor agregado (XOS)) ou como monômeros, destacando-se a xilose. A obtenção dos monômeros de xilose normalmente é realizada diretamente no hidrolisado hemicelulósico por processos químicos ou por bioconversão. De acordo com o método de fracionamento empregado e das condições operacionais, pode ser necessário um procedimento de destoxificação para viabilizar a bioconversão. Alguns dos produtos derivados deste bioprocessamento podem incluir xilitol, etanol e ácidos orgânicos (MONIZ *et al.*, 2017).

Diversos estudos de pré-tratamento publicados na literatura são relatados conforme os mecanismos envolvidos; as vantagens e desvantagens; e o custo. Os pré-tratamentos para a biomassa lignocelulósica podem ser por métodos biológicos, químicos, mecânicos, e diferentes combinações dos mesmos (WYMAN *et al.*, 2005). No Quadro 3.1 são mostrados os principais métodos de pré-tratamentos utilizados.

Os subprodutos do pré-tratamento da lignocelulose sob condições ácidas podem ser divididos em grupos com base na funcionalidade química, origem e efeitos no microrganismo fermentador. Produtos de degradação de carboidratos tais como ácidos carboxílicos alifáticos, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico, e os furanos aldeídos furfural e HMF exibem toxicidade relativamente baixa, mas podem estar presentes em altas concentrações dependendo das condições de pré-tratamento e da matéria-prima (JONSSON; MARTÍN, 2016).

Dentre vários tipos de pré-tratamento, a hidrólise de ácido diluído e a técnica de explosão a vapor são comumente utilizadas por serem mais eficazes do que outros, visto que já foram desenvolvidos com sucesso para o pré-tratamento, são conhecidos por melhorar a recuperação do açúcar (particularmente xilose na fase aquosa) e aumentar a abertura das fibras pré-tratadas à digestão enzimática, além de serem de baixo custo e com poucas limitações (CHEN *et al.*, 2011; BADIEI *et al.*, 2014).

O ácido solubiliza polissacarídeos, principalmente a hemicelulose. As condições usualmente aplicadas são: concentração baixa de ácido com alta temperatura ou concentração alta de ácido com baixa temperatura. A principal desvantagem da utilização do ácido é a produção de diversos inibidores, como ácido acético, furfural e 5-hidroximetil furfural, que inibem o crescimento das leveduras. Os ácidos utilizados incluem: ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nitroso, ácido fosfórico, ácido maleico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido acético, entre outros. O ácido sulfúrico é o mais comumente utilizado (KUMARI; SINGH, 2018).

3.4 Produção de etanol por bioprocessos

O etanol pode ser obtido a partir da biomassa que contém açúcares fermentescíveis, ou carboidratos complexos que podem ser transformados em açúcares fermentescíveis. Essa biomassa pode ser classificada em três grupos: biomassa lignocelulósica, culturas amiláceas e açúcares (matérias primas açucaradas e subprodutos das refinarias de açúcar) (ZABED *et al.*, 2016b).

Os biocombustíveis podem ser classificados como de primeira geração, que são produzidos a partir de culturas alimentares, causando um conflito com ração animal e alimentação destinada à população; e, para minimizar este impacto, foi estudado a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, de 2ª geração,

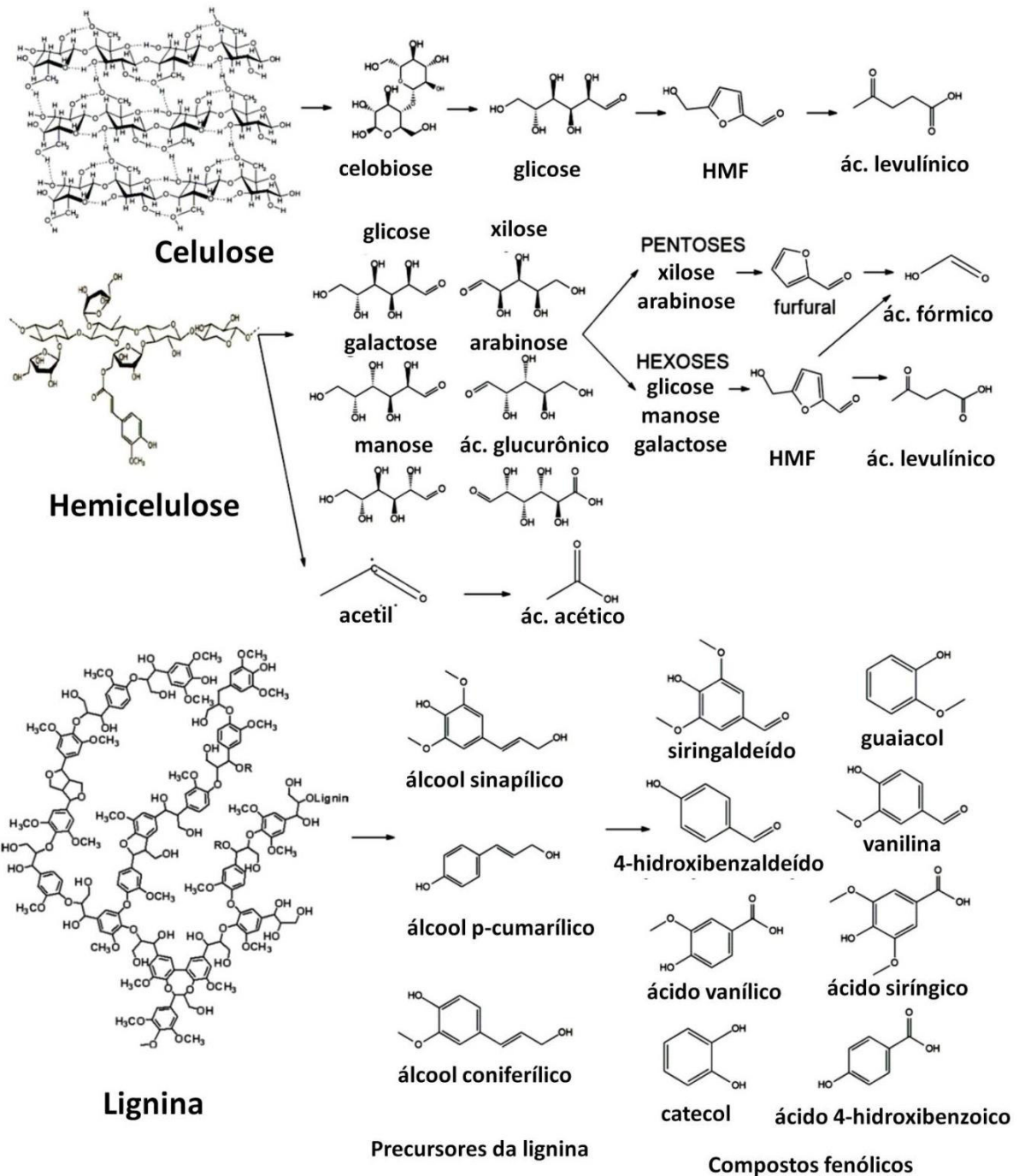
utilizando como matéria prima os materiais vegetais lignocelulósicos não alimentares, como resíduos agrícolas, sendo o principal benefício, minimizar os impactos ambientais e gerar baixas emissões de gases de efeito estufa (GUO; SONG; BUHAIN, 2015; NIGAM; SINGH, 2011). O etanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica é uma opção em potencial por apresentar diversas formas de ser utilizado, como combustível para veículos, energia e calor (ACHINAS; EUVERINK, 2016).

A fermentação é a conversão de açúcares em etanol, realizada pelo processo metabólico por microrganismos. Os hidrolisados derivados de culturas amiláceas possuem principalmente glicose ou um dissacarídeo (maltose). Os hidrolisados de biomassa lignocelulósica possuem açúcares como pentose e hexose. As hexoses, como a glicose, galactose e manose, que podem ser também encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, são facilmente fermentados por microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*, entretanto, estes não são capazes de fermentar pentoses, como a xilose e arabinose, principais açúcares constituintes da hemicelulose. Para o uso de tais açúcares podem ser empregadas leveduras fermentadoras de xilose como *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida shehatae* (ZABED *et al.*, 2017).

3.4.1 Inibidores do metabolismo microbiano

Alguns métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como a explosão a vapor e com ácido diluído são geralmente utilizados devido à sua eficácia e baixo custo. No entanto, esses métodos são inespecíficos e levam à formação, além de açúcares, dos compostos inibitórios. Esses inibidores são subprodutos da degradação de três principais constituintes do material lignocelulósico: celulose, hemicelulose e lignina, restringindo a produtividade de produtos derivados da bioconversão. As concentrações destes compostos variam muito com a quantidade de sólidos no reator, as condições de pré-tratamento empregadas (temperatura, tempo, concentração de produtos químicos, etc.) e a matéria-prima utilizada (PARAWIRA; TEKERE, 2011). Na Figura 3.4 encontra-se alguns compostos derivados da degradação da celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 3.4 - Produtos possíveis de degradação da celulose, hemicelulose e lignina resultantes do processo de hidrólise.



Fonte: Adaptado de Coz *et al.* (2016).

A concentração de alguns componentes pode aumentar nas etapas de conversão, enquanto outros componentes podem ser decompostos pela levedura em outros produtos (CONDE-MEJÍA; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2012).

Os inibidores podem ser classificados nos seguintes grupos principais: furaldeídos, como furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF); compostos fenólicos, como vanilina, conerílicolaldeído e siringaldeído; ácidos orgânicos fracos, como ácido levulínico, fórmico e acético; e íons de metais pesados, como níquel, alumínio, cromo, entre outros (CHANDEL; DA SILVA; SINGH, 2013; PARAWIRA; TEKERE, 2011). De modo geral, os hidrolisados lignocelulósicos, antes de serem empregados em processos fermentativos, devem ser concentrados e destoxificados, com o intuito de obter produção e rendimento satisfatórios de produtos de valor agregado (ZHANG *et al.*, 2015).

3.4.2. Toxicidade dos compostos inibidores

Os principais compostos que apresentam um potencial inibitório para o processo de bioconversão são: compostos derivados da degradação dos carboidratos, como o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural; ácidos fracos alifáticos, sendo o ácido acético, ácido levulínico, ácido fórmico); e os compostos fenólicos, formados pela degradação da lignina, como vanilina, siringaldeído, catecol.

Ácidos fracos não dissociados são lipossolúveis e podem se difundir através da membrana plasmática. A concentração de ácidos não dissociados em hidrolisados lignocelulósicos é muito dependente do pH, sendo assim, o pH é uma variável crucial durante a fermentação. Manter um pH intracelular neutro é crucial para a viabilidade celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Os produtos de desidratação de açúcares hexose e pentose, como os derivados de furano, impedem a função da enzima fermentativa. Os compostos fenólicos, formados a partir da lignina, podem romper as membranas e supostamente interferem na função dos alvos hidrofóbicos intracelulares da *Escherichia coli* (MILLS; SANDOLVAL; GILL, 2009).

Zaldivar, Martinez, Ingram (2000) investigaram a toxicidade dos aldeídos (siringaldeído, vanilina, 5-hidrometilfurfural, furfural e 4-hidroxibenzaldeído) como inibidores do crescimento celular da *Escherichia coli*. As toxicidades de todos os aldeídos (e etanol), exceto furfural, foram aditivas quando testadas em combinações binárias. Em todos os casos, as combinações com furfural foram tóxicas. Dos aldeídos testados, apenas o furfural inibiu fortemente a produção de etanol *in vitro*.

Bellido *et al.* (2011) estudaram os efeitos dos principais compostos inibitórios (HMF, furfural e ácido acético) formados após o pré-tratamento por explosão a vapor da palha de trigo nos processos fermentativos por *Pichia stipitis*. Os resultados mostraram que o ácido acético reduziu a produtividade de etanol, e com o aumento da concentração para 3,5 g/L, inibiu completamente o processo de fermentação. O furfural proporcionou um consumo de açúcares lento na levedura, de acordo com o aumento da concentração; e o HMF não apresentou um efeito significativo na faixa de concentração estudada (0,1 g/L a 0,5 g/L).

3.5 Processos de destoxificação de hidrolisados

Diversos procedimentos de destoxificação do hidrolisado têm sido estudados, a fim de reduzir a concentração de compostos tóxicos e, assim, favorecer o processo de fermentação. Esses métodos podem ser classificados em biológico, físico e químico, sendo a principal diferença entre eles o mecanismo de ação (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2014).

Os métodos biológicos de tratamento envolvem a utilização de determinadas enzimas ou microrganismos que agem sobre os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados alterando suas estruturas químicas. Já os métodos físicos são aqueles nos quais se viabiliza a remoção dos compostos inibidores do meio, sem que ocorram alterações em suas estruturas químicas. Estes métodos podem ser baseados em processos de adsorção como os que utilizam carvão ativado, resinas de troca iônica, terra diatomácea, ou ainda processos de transferência de fase como extração com solventes e evaporação. Os principais métodos químicos de destoxificação de hidrolisados empregados são baseados na adição de substâncias redutoras e em processos de alteração do pH. Os processos baseados na alteração de pH podem levar à redução da toxicidade de hidrolisados por dois diferentes mecanismos, o primeiro se refere simplesmente à precipitação de alguns compostos tóxicos, enquanto que o segundo é atribuído à decomposição de certos compostos inibidores devido à instabilidade química sob determinados valores de pH (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Existe uma variedade de métodos empregados para destoxificação de hidrolisados derivados de materiais lignocelulósicos descritos na literatura, cada um

deles possuindo diferentes capacidades de remoção de compostos inibidores. Na Tabela 3.2 é possível observar alguns métodos de destoxificação encontrados na literatura e a capacidade de remoção de cada um deles.

Tabela 3.2 - Processos de destoxificação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

Método	Redução de inibidores	Referência
Métodos físicos		
Destilação em membrana à vácuo	24,79% de ácido acético e 96,25% de furfural.	CHEN <i>et al.</i> 2013.
Destilação em membrana a vácuo acoplada à adsorção	99,7% de furanos e 83,5% de ácido acético	ZHANG <i>et al.</i> 2015.
Diananofiltração	92% ácido acético e furfural e 25% siringaldeído	FAYET <i>et al.</i> 2018.
Carvão ativado	38,7% de furanos e 57,5% de fenólicos totais.	CHANDEL <i>et al.</i> 2007.
Métodos químicos		
Processos Oxidativos Avançados (POAs)	>40% de fenólicos totais, >95% de compostos fenólicos de baixo peso molecular e >52% de furanos.	SILVA, CARNEIRO, ROBERTO, 2013.
Boro-hidreto de sódio	0% de ácido ferúlico, 86% de furfural e >99,9 % de p-benzoquinona,	CAVKA, JÖNSSON, 2013.
Overliming	75,6% dos derivados de furano e 68,1% dos monômeros aromáticos.	ZHANG <i>et al.</i> , 2018.
Métodos biológicos		
Tratamento biológico utilizando levedura de panificação (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).	>94% de furanos e >80% de HMF.	FONSECA <i>et al.</i> 2018.
Tratamento com Lacase de <i>C. stercoreus</i>	77,5% de fenólicos totais, sem afetar o teor de furanos e ácido acético.	CHANDEL <i>et al.</i> 2007.

Fonte: O Autor.

O método por destilação em membrana à vácuo é focado na remoção dos inibidores ácido acético e furfural no hidrolisado hemicelulósico de palha de milho. No trabalho de Chen *et al.* (2013) foram empregadas variadas condições de processo, apresentando uma remoção de até 96% de furfural em condições ideais (temperatura 70 °C, fluxo 6,42 L/m².h), entretanto, a remoção do ácido acético foi menor, atingindo aproximadamente 25% de remoção. No estudo de Zhang *et al.* (2015), acoplado o método por membrana à vácuo com adsorção, possibilitou a remoção de compostos inibidores como ácido acético. O processo teve como resultado uma alta remoção de furanos e ácido acético (99,7% e 83,5%, respectivamente).

A diananofiltração é um processo combinado que faz o uso da nanofiltração e da diafiltração, nesta ordem. A etapa da nanofiltração mostrou-se adequada para remover compostos inibitórios, em pH baixo e alta pressão osmótica (28 bar). A diafiltração foi testada por diluição contínua e sequencial. Ambos os modos apresentaram um desempenho de remoção de 92% de furfural e ácido acético e 25% de siringaldeído em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo (FAYET *et al.*, 2018). No método de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizando carvão ativado, foi obtido uma remoção de compostos inibidores de 38,7% para furanos e 57,5% para fenólicos totais (CHANDEL *et al.*, 2007).

No método por Processos Oxidativos Avançados (POAs), o hidrolisado hemicelulósico foi submetido a diferentes condições de tratamento (Fenton, foto-Fenton, UV/H₂O₂, O₃ e UV/O₃), apresentando como principal característica a geração do radical hidroxila solúveis na fase líquida. No trabalho de Silva *et al.* (2013) o procedimento foi realizado em reator com capacidade de 150 mL, equipado com refrigeração a água e agitador magnético, durante 30 minutos, a uma temperatura de 30 °C. A ozonização em meio alcalino (pH 8), na presença de H₂O₂ ou na presença da radiação ultravioleta se mostrou as condições mais eficazes para esse tipo de tratamento, alcançando uma remoção acima de 40% de fenólicos totais, acima de 95% de compostos fenólicos de baixo peso molecular (ácido vanílico, vanilina, ácido p-cumárico e ácido ferúlico) e acima de 52% de furanos.

O método químico em que se utiliza boro-hidreto de sódio baseia-se na adição deste reagente em hidrolisados hemicelulósicos. Segundo Cavka e Jönsson (2013) o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar e

abeto por este método, foi capaz de reduzir a concentração de coniferil aldeído, p-benzoquinona, 2,6-dimetoxibenzoquinona e furfural.

Zhang *et al.* (2018) empregaram o processo overliming para o tratamento do hidrolisado. Os autores reportam que para o tratamento foi adicionado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ao hidrolisado até alcançar pH 10, em seguida a mistura foi aquecida em banho maria a 60 °C por 2h. Posteriormente, o hidrolisado foi ajustado para pH 6, usando H_2SO_4 , e posteriormente centrifugado para remoção dos precipitados. Os autores reportaram que o método de tratamento levou a uma redução de 75,6% de furano (furfural, 2,5-furandicarboxialdeído e hidroximetilfurfural) e 68,1% de monômeros aromáticos derivados de lignina (vanilina, siringaldeído e (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoil) – acetaldeído).

O processo biológico empregando-se levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) como forma de reduzir a toxicidade de hidrolisados. Fonseca *et al.* (2018) reporta o tratamento de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com levedura de panificação liofilizada. As leveduras utilizadas foram previamente hidratadas durante 10 min com água destilada estéril, na proporção 1:10 sólido/líquido, sendo posteriormente separada por centrifugação (1100 xg por 20 min) e adicionado no hidrolisado hemicelulósico previamente ajustado o pH com solução NaOH 10 mol/L. A mistura foi inoculada com concentração de 10 g/L da levedura e 50 mL de hidrolisado em agitador rotatório a 20,94 rad/s, a 30 °C por tempos variados (2,4,6 e 8h). O hidrolisado tratado apresentou uma redução acima de 94% de furfural e 80% de HMF, mas não houve uma redução significativa na concentração de ácido acético, alcançando uma redução de 10% para tratamentos em pH 3.

Chandel *et al.* (2007) reportam o uso de enzimas para a destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos e bagaço de cana de açúcar. Estes autores utilizaram a enzima lacase de *C. stercorius* parcialmente purificada (100 U). A enzima foi adicionada ao hidrolisado, e a mistura foi incubada em um agitador orbital a 100 rpm, durante 4h na temperatura a 30 °C. Foi alcançada uma redução de 77,5% de fenólicos totais, mas os teores de furanos e ácido acético não foram afetados.

3.5.1. Destoxificação de hidrolisados por Processos Oxidativos Avançados

Uma alternativa para a destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos é a utilização de Processos Oxidativos Avançados (POAs). Os POAs compreendem uma grande gama de diferentes processos os quais nas últimas décadas têm sido amplamente estudados em tratamento de efluentes de diversas indústrias. Tais processos possuem a capacidade de degradar compostos tóxicos e recalcitrantes, sendo muitas vezes reportado como um método eficiente na redução da toxicidade de efluentes, melhorando a suscetibilidade de tais efluentes à ação de agentes biológicos, o que desperta o interesse sobre a possibilidade da aplicação de POAs como metodologia de redução da toxicidade de hidrolisados lignocelulósicos.

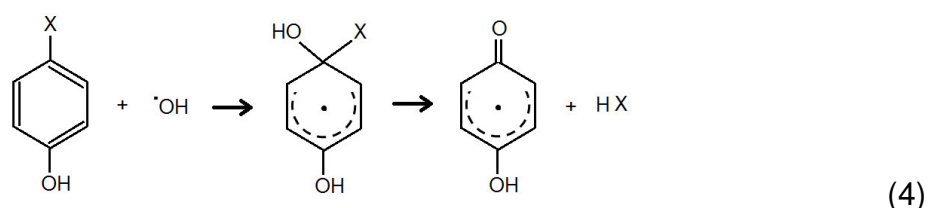
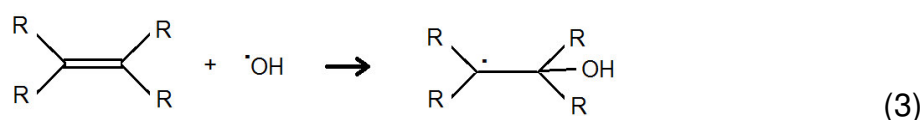
Os Processos Oxidativos Avançados (POAs) são geralmente caracterizados como os métodos mais eficientes capazes de mineralizar compostos orgânicos biorrecalcitrantes ou convertê-los em compostos biodegradáveis (AHMED *et al.*, 2009). A base destes processos é a geração de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) em soluções. Os POAs não modificam a fase dos poluentes, mas os degradam, o que é uma vantagem (SOUZA; FÉRIS, 2015). Devido a sua alta reatividade, o radical hidroxila deve ser gerado *in situ*, o que pode ser feito através um grande número de diferentes processos (PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004).

A geração do radical hidroxila geralmente envolve reações que resultam da combinação de agentes oxidantes fortes como peróxido de hidrogênio e ozônio com irradiação ultravioleta (UV) ou visível e catalisadores como íons metálicos e semicondutores (NOGUEIRA *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2000). As reações entre o radical hidroxila gerado e as moléculas orgânicas presentes no meio podem ser divididas em três classes diferentes segundo seus mecanismos de reação, tais como a abstração de átomos de hidrogênio, adição eletrofílica e a transferência de elétrons (LEGRINI; OLIVEROS; BRAUN, 1993).

A abstração de átomos de hidrogênio é uma reação que ocorre geralmente com hidrocarbonetos alifáticos. Nesta reação o radical hidroxila oxida o composto orgânico retirando um átomo de hidrogênio (Equação 1), resultando em um radical orgânico, o qual reage rapidamente com o oxigênio presente no meio, dando origem a radicais peróxido orgânico (Equação 2), intermediários instáveis que iniciam as reações subsequentes de oxidação.



As reações de adição eletrofílica ocorrem geralmente com hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos. Os radicais hidroxila atacam as ligações π dos compostos orgânicos, resultando na formação de radicais orgânicos (Equações 3 e 4), e da mesma forma que os radicais orgânicos gerados na abstração de átomos de hidrogênio, reage rapidamente com o oxigênio presente no meio, formando radicais peróxido orgânicos e iniciando as reações subsequentes de oxidação.



As reações de transferência de elétrons ocorrem quando as reações de abstração de átomos de hidrogênio e reações de adição radicalar são desfavorecidas, o que pode ser ocasionado pela presença de halogênio nas moléculas ou mesmo por impedimento estérico. Nesta reação o radical hidroxila é reduzido a ânion hidroxila retirando elétrons do composto orgânico oxidado, dando origem a um radical orgânico (Equação 5).



A predominância de um determinado tipo de reação no processo de oxidação de compostos orgânicos dependerá de diferentes fatores, dentre eles sua concentração e a estrutura química (NOGUEIRA *et al.*, 2007). De um modo geral

reações de adição eletrofílicas tendem a ocorrer com maior velocidade que reações de subtração de hidrogênio ou transferência de elétrons, principalmente em compostos aromáticos e insaturados. Esta natureza eletrofílica do radical hidroxila pode levar a um ataque preferencial de compostos com anéis aromáticos com elevada densidade eletrônica (LANZALUNGA; BIETTI, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os POAs são processos amplamente estudados para tratamento de diversos tipos de efluentes, como gerados na indústria de fármaco (VOGNA *et al.*, 2004), têxtil (ASGHAR; RAMAN; DAUD, 2015), pesticidas (PEREZ *et al.*, 2006), explosivos (BARRETO-RODRIGUES *et al.*, 2009) e papelreira (GHATAK, 2014).

Os efluentes da indústria produtora de polpas celulósicas são formados por mais de 40% de matéria orgânica com baixa biodegradabilidade, constituídos principalmente de compostos aromáticos e fenólicos, decorrentes da degradação de lignina e carboidratos, sendo estes compostos identificados também nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos, atribuindo a eles os efeitos de inibição do metabolismo microbiano observado neste hidrolisado (HERMOSILLA *et al.*, 2015; JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Na literatura muitos autores reportam a redução da toxicidade e o aumento da biodegradabilidade de diferentes poluentes tóxicos por meio de tratamento por POAs (CHAMARRO; MARCO; ESPLUGAS, 2001; MERIÇ; KAPTAN; OLMEZ, 2004), incluindo efluentes oriundos da indústria papelreira, como nos trabalhos de Ramos e colaboradores (2009), Catalkaya e Kargi (2008), Portjanskaja e Preis (2007), o que demonstra a capacidade dos POAs em reduzir a toxicidade destes grupos de compostos.

Ramos *et al.* (2009) investigaram a degradação por meio de ozonização da lignina e seus derivados presentes no efluente de uma indústria de papel e celulose. Em todas as condições avaliadas foram observados aumentos de 3 a 4 vezes no valor de biodegradabilidade do efluente, determinada pela razão entre a demanda biológica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO). O aumento da biodegradabilidade observado após a ozonização ocorreu não apenas pela redução do valor de DQO, como também pelo aumento do valor de DBO, o que demonstrou que o processo de ozonização foi capaz de converter os produtos de degradação da lignina presentes no efluente a compostos passíveis de degradação biológica.

Catalkaya e Kargi (2008) estudaram a destoxificação do efluente de uma indústria de polpação através de diferentes processos oxidativos avançados, tais como UV, UV/H₂O₂, TiO₂/UV e TiO₂/UV/H₂O₂. Em todas as diferentes condições de tratamento do efluente avaliadas por estes autores foram observadas reduções em ambos os parâmetros, carbono orgânico total (COT) e toxicidade. Os processos empregando TiO₂/UV ou TiO₂/H₂O₂/UV foram os que propiciaram as maiores reduções percentuais de COT. Entretanto, o processo TiO₂/UV mostrou-se mais vantajoso que o TiO₂/H₂O₂/UV, quanto a remoção de toxicidade do efluente. O tratamento por TiO₂/UV foi capaz de levar a reduções de toxicidade e COT de 94 e 79%, respectivamente, quando realizado em pH 11, com uma concentração de 0,75 g/L de TiO₂, após 60 minutos de tratamento.

Portjanskaja e Preis (2007) investigaram a degradação de lignina em solução aquosa (100 mg/L) por fotocatalise heterogênea com dióxido de titânio. Os autores observaram que a presença de dióxido de titânio foi essencial para a redução da concentração de lignina na solução tratada. O tratamento fotocatalítico foi capaz de promover a redução tanto da lignina quanto da concentração de compostos fenólicos livres. Ao fim do tratamento foram alcançadas reduções de 50 e 80% para a lignina e fenóis livres, respectivamente, sendo observado um aumento de cinco vezes na biodegradabilidade da solução. Os autores sugeriram que este aumento de cinco vezes na biodegradabilidade, juntamente com uma redução na concentração de compostos fenólicos livres de cinco vezes, indica possível relação entre estes parâmetros, e que, a razão para o aumento da biodegradabilidade observada, deve estar ligada a formação de subprodutos biodegradáveis a partir da oxidação de compostos fenólicos tóxicos presentes no meio.

Diferente dos efluentes, os hidrolisados de materiais lignocelulósicos apresentam elevadas concentrações de carboidratos em comparação à concentração de compostos inibidores. Para que os POAs possam ser utilizados como método de destoxificação de hidrolisados, tais processos devem permitir a redução da concentração dos compostos inibidores e ao mesmo tempo proporcionar pouca ou nenhuma alteração na concentração dos açúcares presentes. Dentro desta perspectiva é importante salientar que os compostos fenólicos e furanos presentes nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos provenientes da degradação da lignina e carboidratos, respectivamente, possuem como característica comum as estruturas aromáticas de suas moléculas, o que os diferem

dos carboidratos. Apesar da grande maioria dos trabalhos sobre POAs enfatizarem a não seletividade do radical hidroxila frente a compostos orgânicos, atualmente alguns autores sugerem que estruturas moleculares com elevadas densidades eletrônicas, como duplas ligações e anéis aromáticos, podem ser oxidadas preferencialmente por tais processos (LANZALUNGA; BIETTI, 2000; GERNJAK *et al.*, 2003). O pH do hidrolisado assume um papel importante na ozonização catalítica. A solução que apresenta um pH mais baixo desempenha uma via de reação direta seletiva, enquanto para soluções com o pH mais alto, o mecanismo de reação gera mais $\text{OH}\bullet$, ou seja, a solução com um pH alto propicia um aumento na decomposição do ozônio em $\text{OH}\bullet$, aumentando a degradação dos inibidores (REKHATE; SRIVASTAVA, 2020).

Trabalhos que descrevem a utilização dos POAs para destoxificação de efluentes cujos principais agentes tóxicos são compostos fenólicos derivados de materiais lignocelulósicos, como os citados anteriormente, relatam a eficácia destes métodos na redução da toxicidade e no aumento da suscetibilidade à ação microbiana, o que torna potencialmente promissora a aplicação dos POAs na destoxificação de hidrolisado de biomassa lignocelulósica.

Resultados promissores da aplicação de POAs para a destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz para a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* foram alcançados em trabalhos iniciais desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP (ROBERTO; CARNEIRO; SILVA, 2011; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2014). No referido trabalho foi avaliado o potencial da aplicação de POAs como método de destoxificação de hidrolisado, sendo tais processos divididos em dois grupos, homogêneos e heterogêneos. Os resultados mostraram que os POAs foram capazes de remover preferencialmente compostos aromáticos (furanos e compostos fenólicos derivados de lignina) sem alterar as concentrações dos açúcares presentes no hidrolisado. Na fermentação por *S. Stipitis* dos hidrolisados destoxificados nas condições selecionadas de tratamento por processo homogêneo ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{pH } 8$) e heterogêneo ($\text{ZnO}/\text{UVA}/\text{O}_3/\text{pH } 8$), a levedura apresentou aumentos de cerca de 200 e 90% na produtividade volumétrica em etanol, de 240 e 112% nas velocidades de consumo de açúcares e de 224 e 171% nas concentrações de etanol obtidas, respectivamente, quando comparadas à fermentação em hidrolisado não tratado. Mesmo não sendo condições otimizadas,

os tratamentos do hidrolisado por POAs apresentaram resultados comparáveis aos obtidos por processos de destoxificação mais comumente descritos na literatura. Estes resultados demonstram que os POAs são processos promissores para a aplicação como técnica de redução de toxicidade e consequente melhoria na fermentabilidade de hidrolisados lignocelulósicos.

Dentro desta perspectiva, o presente estudo teve por objetivo avaliar o emprego do método de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisados obtidos a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas, além de comparar esta técnica de tratamento com processos de destoxificação usualmente encontrados na literatura, visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124. Ressalta-se ainda que o estudo tem relevância do ponto de vista tecnológico, e caráter inovador, uma vez que o processo em estudo pode ser amplamente aplicado a diversos processos de bioconversão que empregam hidrolisados de resíduos lignocelulósicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos Químicos do Departamento de Engenharia Química (LOQ) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

4.1 Obtenção e concentração do hidrolisado

4.1.1 Matéria-prima

A palha de arroz utilizada neste trabalho foi coletada em plantação na cidade de Canas/SP. A palha foi seca ao sol, e submetida a uma operação de redução de tamanho em moinho de martelo para a obtenção de material com tamanho de 10 mm. Por fim, a palha de arroz foi pesada, ensacada e estocada até a realização da hidrólise.

4.1.2 Hidrólise ácida

A hidrólise da hemicelulose da palha de arroz foi realizada segundo as condições otimizadas, descritas por Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003). O hidrolisado hemicelulósico foi obtido através do processo de hidrólise ácida da palha de arroz empregando ácido diluído, realizada em reator de aço inoxidável (AISI 316) com volume útil de 350 L, aquecido indiretamente por resistência elétrica através de uma camisa de óleo. A reação foi realizada a 121 °C por cerca de 30 minutos, a uma agitação de 50 rpm e pressão manométrica de 180 KPa, tendo uma proporção de ácido sulfúrico concentrado (98% v/v) de 100 mg/g de matéria seca e uma relação de matéria seca/solução ácida de 1:10.

4.1.3 Concentração do hidrolisado

O hidrolisado hemicelulósico foi submetido a um processo de concentração sob vácuo em concentrador (confeccionado em aço inox) com capacidade de 350 L, a uma temperatura de 54 °C, alcançando um fator de concentração de aproximadamente seis vezes. O hidrolisado concentrado foi estocado a 4 °C, para posterior utilização.

4.2 Tratamentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

4.2.1 Tratamentos por Processos Oxidativos Avançados (POAs)

O tratamento de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por POAs foi realizada em processo descontínuo, empregando condições previamente estabelecidas em trabalhos do grupo de pesquisa (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2014).

Como etapa prévia ao tratamento, o hidrolisado teve o pH ajustado para 8,5 (pela adição de hidróxido de sódio em micro pérolas), e em seguida foi centrifugado para a remoção de precipitados.

O tratamento de destoxificação do hidrolisado foi realizado em um reator do tipo coluna de bolhas, confeccionado em vidro e com volume útil de 150 mL. As reações foram conduzidas a temperatura de 30 °C, com uma concentração inicial de 100 mg/L de H₂O₂ e adição contínua de ozônio (taxa de fornecimento de 2,50 mg de O₃ por minuto). Foi empregado o tempo de ozonização de 15 minutos, de modo a alcançar dosagens de ozônio de até 250 mg/L (SILVA; CARNEIRO; ROBERTO 2013).

O ozônio utilizado nos ensaios foi produzido pela conversão de O₂ em O₃ pelo efeito Corona, utilizado para tal um Gerador de Ozônio Ozonebras, modelo Z30, com potência de 60 W.

Para o acompanhamento dos experimentos foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre dois aspectos: (1) os efeitos do tratamento sobre as características do hidrolisado tratado; (2) os efeitos do tratamento sobre o processo de bioconversão com a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 empregando o hidrolisado tratado como substrato.

4.2.1.1 Quantificação do ozônio

A quantidade de ozônio utilizado nos tratamentos (ozônio dissolvido) foi determinada pela diferença entre o ozônio fornecido na corrente de entrada dos reatores e o ozônio presente na corrente de gás de exaustão. A quantificação do ozônio foi feita por técnica titrimétrica de iodometria. A corrente gasosa foi recolhida em um conjunto de dois frascos lavadores contendo cada um 50 mL de uma solução

de KI 6% e 10 mL de H_2SO_4 1 mol L^{-1} . O iodo produzido pela reação do O_3 e KI foi quantificado por titulação com solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 eq. L^{-1}). A quantidade de ozônio foi calculada com base na estequiometria das reações químicas envolvidas, bem como nos tempos e volumes empregados nos tratamentos.

4.2.2 Tratamento por Overliming

Foi empregada a metodologia descrita por Carvalheiro *et al.* (2005). O hidrolisado teve seu pH ajustado para 10 com a adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Após 1 h em pH 10, o hidrolisado foi centrifugado a 7500 xg por 25 minutos. Em seguida, foi ajustado para o pH 5,5 com a adição de H_2SO_4 98% (p/p) e, após 1 hora, foi novamente centrifugado como descrito anteriormente para remoção do precipitado.

4.2.3 Tratamento por Carvão ativado

O tratamento por Carvão ativado foi realizado de acordo com a metodologia de Mussatto e Roberto (2001). O hidrolisado hemicelulósico teve seu pH ajustado para 8 com a adição de NaOH sólido e, em seguida, abaixado para 6,5 com a adição de uma solução de H_2SO_4 13 mol/L. Após cada mudança de pH, o hidrolisado foi centrifugado a 2000 xg por 20 minutos para remoção do precipitado. Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 1,5 g de carvão ativado em 50 mL de hidrolisado, correspondendo a uma razão de 40:1 de hidrolisado:carvão ativado (g/g). Os frascos foram levados para um agitador rotatório, a temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 1 hora. O carvão ativado foi removido por centrifugação a 2000 xg por 20 minutos.

4.2.4 Tratamento por Processo combinado Overliming-POAs

Foram seguidas as metodologias descritas nos itens 4.2.2 e 4.2.1, respectivamente. O hidrolisado primeiramente foi tratado por Processo Overliming, onde teve seu pH ajustado para 10, com a adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Após 1 h, o hidrolisado foi centrifugado a 7500 xg por 25 minutos, e, em seguida, teve seu pH

ajustado para 8,5 com a adição de H₂SO₄ 72%, para prosseguir com o tratamento por Processos Oxidativos Avançados. Após o tratamento por POAs, o hidrolisado teve seu pH ajustado para 5,5, e seguiu para o processo de bioconversão.

4.3 Processo de bioconversão

Antes da utilização como meio de fermentação, o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz teve o seu pH alterado para pH 5,5 com solução de NaOH 10 mol/L. Após a alteração de pH, o hidrolisado foi centrifugado em centrífuga 1000 xg por 10 minutos para remoção de sólidos.

4.3.1 Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124, cedida pela USDA (*United States Department of Agriculture*) de Peoria, Illinois. A cultura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservada a 4 °C. O inóculo foi preparado no próprio hidrolisado com as concentrações de açúcares ajustada por meio de diluição para (g/L): xilose (30,0); glicose (1,9); arabinose (7,6); com a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para frascos Erlenmeyer de 250 mL mantendo-se a proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a 1100 xg por 10 minutos e ressuspensas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão de aproximadamente 50 g/L de células. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular inicial de 0,5 g/L.

4.3.2 Meio e condições de cultivo

Nas fermentações em hidrolisado, as concentrações de açúcares foram ajustadas por diluição para (g/L): xilose (80,0); glicose (5,1); arabinose (20,3); com a adição de extrato de levedura (3 g/L), ou sem a adição de nutrientes. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação e inóculo de 0,5 g/L de células. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, à temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm. As amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento das fermentações.

4.4 Acompanhamento analítico dos experimentos

4.4.1 Caracterização das biomassas lignocelulósicas

4.4.1.1 Determinação do teor de umidade das biomassas lignocelulósicas

Amostras de 1,0 g de biomassa foram colocadas em uma estufa de secagem (Solab SL-100). A secagem foi realizada em uma temperatura de 105 °C até massa constante. A umidade da palha de arroz foi determinada pela diferença de massa obtida antes e após a secagem conforme mostrado na Equação 4.1.

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{úmida}}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Sendo:

$m_{\text{úmida}}$ = massa úmida da palha de arroz (g);

m_{seca} = massa da palha de arroz após secagem na estufa (g).

4.4.1.2 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina insolúvel (Klason)

Os materiais lignocelulósicos foram caracterizados quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, segundo as metodologias descritas por Gouveia *et al.* (2009). Amostras de aproximadamente 1,0 g (moída a 20 mesh) de biomassa

previamente seca em estufa a 105 °C até massa constante, foram transferidas para um béquer de 100 mL e foi adicionado 10 mL de solução ácida (H₂SO₄ 72% v/v) (pré-aquecida a 45 °C). A reação foi mantida em banho ultratermostático Solab modelo SL-152, a 45 °C por 7 minutos, sob agitação constante com bastão de vidro. Em seguida, foram usados 275 mL de água para transferir quantitativamente o conteúdo do béquer para um frasco erlenmeyer de 500 mL, desse modo interrompendo a reação. Em seguida o frasco erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado a 121 °C, durante 30 minutos. Após autoclavagem, o frasco foi resfriado até temperatura ambiente e o material sólido foi separado da fração líquida por filtração utilizando papel de filtro quantitativo previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido em um balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido no papel de filtro foi lavado com água destilada até atingir o volume do balão, o qual foi seguidamente avolumado. O resíduo retido no papel de filtro foi em seguida lavado exaustivamente com cerca de 1,5 litros de água destilada até que o pH da água de lavagem alcançasse o pH neutro. O papel de filtro foi seco à temperatura ambiente e levado para a estufa a 105 °C até atingir peso constante e, após a secagem a massa do resíduo foi quantificada para a determinação de lignina insolúvel em meio ácido. O resíduo contido no papel de filtro foi calcinado para determinação de cinzas segundo item 4.4.1.5. A massa de lignina foi calculada descontando-se a massa de cinzas da massa do material seco retido no papel de filtro. A porcentagem de lignina insolúvel presente na palha de arroz foi calculada pela Equação 4.2:

$$\% \text{ lignina}_{\text{insolúvel}} = \frac{\text{massa}_{\text{lignina}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Sendo:

massa_{lignina} = massa do resíduo retido no papel filtro menos a massa de cinzas deste material;

massa_{seca} = massa seca de palha de arroz utilizada no início da análise.

Os teores de celulose e hemicelulose das biomassas lignocelulósicas foram calculados a partir das Equações 4.3 e 4.4 (IRICK *et al.*, 1988). Uma alíquota da fração líquida recolhida no balão volumétrico de 500 mL foi filtrada em filtro Sep-Pak C18 e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de glicose, xilose e arabinose. O teor de celulose foi calculado pela Equação 4.3 que relaciona a massa de glicose encontrada na

fração líquida e a massa seca de palha de arroz utilizada no início da análise, considerando a diluição realizada em um balão volumétrico de 500 mL. A porcentagem de hemicelulose foi calculada da mesma forma, entretanto, utilizando as massas dos açúcares xilose e arabinose, de acordo com a Equação 4.3.

$$\% \text{ celulose} = \frac{\text{massa}_{\text{glicose}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot F_c \cdot F_{ph} \cdot 100 \quad (4.3)$$

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{\text{massa}_{\text{xilose}} + \text{massa}_{\text{arabinose}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot F_c \cdot F_{ph} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Sendo:

$\text{massa}_{\text{glicose}}$ = calculado a partir da concentração de glicose (g/L) presente na fração líquida;

$\text{massa}_{\text{xilose}}$ = calculado a partir da concentração de xilose (g/L) presente na fração líquida;

$\text{massa}_{\text{arabinose}}$ = calculado a partir da concentração de arabinose (g/L) presente na fração líquida;

F_c = fator de conversão (0,9 para celulose e 0,88 para hemicelulose);

F_{ph} = fator de perda de hidrólise (1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose);

$\text{massa}_{\text{seca}}$ = massa seca do material lignocelulósico utilizado no início da análise.

4.4.1.3 Determinação de lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel em meio ácido, uma alíquota de 5 mL da fração líquida derivada da hidrólise descrita no item 4.4.1.2 foi alcalinizada com solução 10 mol/L de NaOH até atingir pH 12. A amostra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro (Bel photonics UV-M51) a um comprimento de onda de 280 nm utilizando água como referência (ROCHA, 2000). A concentração e o teor de lignina solúvel foram calculados pelas Equações 4.5 e 4.7, respectivamente. Amostras das frações líquidas do hidrolisado obtido no item 4.4.1.2 foram analisadas por cromatografia líquida para determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, as quais foram utilizadas para determinar as absorvâncias atribuídas destes compostos, o que foi feito empregando-se a Equação 4.6.

$$C_{\text{lig.solúvel}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 4,187 \cdot 10^{-2} \cdot (Abs_{FL80} - Abs_{pd280}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (4.5)$$

$$A_{pd280} = C_{furf} \cdot E_{furf} + C_{HMF} \cdot E_{HMF} \quad (4.6)$$

$$\% \text{ lignina}_{solúvel} = \frac{\text{massa}_{lignina}}{\text{massa}_{seca}} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Sendo:

A_{FL} = absorvância da fração líquida a 280 nm;

A_{pd280} = absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), cujas concentrações C_{furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência);

C_{HMF} e E_{HMF} = concentração de furfural e hidroximetilfurfural, nesta ordem, na fração líquida (g/L);

E_{furf} = absorvância molar do furfural (146 L/g.cm);

E_{HMF} = absorvância molar do hidroximetilfurfural (114 L/g.cm);

$\text{massa}_{lignina}$ = concentração de lignina solúvel (Equação 4.5) vezes o volume da fração líquida (0,5 L);

massa_{seca} = massa seca de palha de arroz utilizada no início da análise.

4.4.1.4 Determinação do grupo acetil

A determinação do grupo acetil foi baseada na quantidade de ácido acético presente na fração líquida do hidrolisado obtido no item 4.4.1.2, a qual foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A porcentagem do grupo acetil na hemicelulose foi calculada de acordo com a Equação 4.8 (IRICK *et al.*, 1988).

$$\% \text{ grupo}_{acetil} = \frac{\text{massa}_{ácidoacético}}{\text{massa}_{seca}} \cdot F_{ác.acético} \cdot 100 \quad (4.8)$$

Sendo:

$\text{massa}_{ácidoacético}$ = concentração de ácido acético (g/L) vezes o volume da fração líquida (0,5 L);

massa_{seca} = massa da amostra seca (g);

$F_{ác.acético}$ = fator de conversão (0,72 para o ácido acético).

4.4.1.5 Determinação do teor de cinzas

Para determinação do teor de cinzas, amostras de cerca de 1g de palha de arroz previamente seca à temperatura de 105 °C foram colocadas em cadinhos de porcelana previamente tarados. Os cadinhos foram aquecidos em mufla elétrica a

800 °C por 2h, após o resfriamento foram retirados e colocados em dessecador até que alcançasse a temperatura ambiente e, em seguida pesados. As cinzas foram determinadas pela diferença de massa (g) das amostras, antes e após a calcinação, conforme Equação 4.9.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa}_{\text{cinzas}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot 100 \quad (4.9)$$

Sendo:

massa_{cinzas} = massa da amostra calcinada subtraindo massa do cadinho (g);

massa_{seca} = massa da amostra seca (g).

4.4.2 Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos

4.4.2.1 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho Ion pH modelo B500, com correção de temperatura.

4.4.2.2 Determinação de cinzas

O teor de cinzas no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA), obtido na hidrólise ácida descrita no item 4.1.2, foi determinado retirando-se uma alíquota de 10 mL deste hidrolisado, o qual foi seco a uma temperatura de 105 °C até peso constante. Esta amostra seca foi utilizada para determinação de cinzas conforme descrito no item 4.4.1.5.

4.4.2.3 Determinação dos teores de carboidratos e ácido acético

Glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm), nas condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 mol/L; fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas a 3500 xg por 10 minutos para remoção de sólidos sendo o

sobrenadante diluído em água destilada, em seguida, foram filtradas em filtro Sep-Pack C18. As concentrações foram calculadas através de curvas de calibração com uma faixa de concentração de 0,2 e 4,0 g/L.

4.4.2.4 Determinação dos compostos fenólicos totais

A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria através de metodologia adaptada de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), utilizando ácido gálico como padrão. As amostras foram centrifugadas a 1800 xg por 20 minutos para a remoção de sólidos e em seguida diluídas em água deionizada. A um volume de 3,0 mL de amostra foram adicionados 0,2 mL de reagente de Folin-Ciocalteu seguido de agitação e 0,8 mL de solução de Na₂CO₃ 150 g/L a mistura foi mantida por 30 minutos no escuro. A leitura da absorbância em 760nm terá água como branco. Os resultados foram expressos usando-se curva de calibração.

4.4.2.5 Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural e compostos fenólicos de baixa massa molar

As concentrações de furfural, hidroximetilfurfural e compostos derivados de lignina (CDL) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu equipado com detector UV e coluna C18 (150 x 3,9 mm), nas seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:9 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume de amostra de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas a 3500 xg por 10 minutos para remoção de sólidos sendo o sobrenadante diluído em água destilada, em seguida, foram filtradas em membrana Milipore com poros de 0,45 µm.

4.4.2.6 Determinação do fator de severidade combinada (CS)

O fator de severidade combinada (CS) da hidrólise descrita no item 4.1.2 foi determinada de acordo com a metodologia reportada por Lee e Jeffries (2011). Assimilando os valores de variação da temperatura, tempo de reação e acidez da

solução, de acordo com a Equação 4.10, é possível encontrar um fator para facilitar as comparações de diferentes condições do processo de hidrólise.

$$CS = \log \left\{ t \cdot \exp \left[\frac{T_H - T_R}{14,75} \right] \right\} - pH \quad (4.10)$$

Sendo:

t = tempo da reação de hidrólise, em minutos.

T_H = temperatura da reação de hidrólise, em minutos.

T_R = tempo de referência, sendo na maioria dos casos 100 °C.

pH = acidez da solução aquosa, sendo determinada a partir da concentração do ácido utilizado na hidrólise.

4.4.3 Acompanhamento analítico do processo de bioconversão

4.4.3.1 Determinação dos teores dos açúcares, etanol e ácido acético

As concentrações de açúcares (xilose, glicose e arabinose), etanol e ácido acético no meio de cultivo foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de coluna de 45 °C; temperatura do detector de 35 °C, solução de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) como fase móvel; fluxo de 0,6 mL/min; com volume de amostra de 20 µL. As amostras foram centrifugadas para a separação das células e alíquotas do sobrenadante foram diluídas e filtradas em filtro Sep-Pack C18 Cartridge (Waters Associates) antes das injeções. As concentrações de açúcares foram calculadas utilizando curvas de calibração com uma faixa de concentração de 0,01 a 2 g/L.

4.4.3.2 Determinação da concentração celular

A massa de células, proveniente de amostra retirada do meio de cultivo, foi centrifugada, separada do sobrenadante, lavada com água destilada e devidamente diluída para a determinação da absorbância em espectrofotômetro BEL Engineering S.R.L, modelo UV-M51, em um comprimento de ondas de 600 nm. A concentração

celular foi calculada utilizando-se a equação obtida por regressão linear dos dados de uma curva de calibração entre peso seco e absorvância.

4.4.3.3 Fator de conversão de xilose em etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de xilose em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g/g, foi calculado através da seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (4.11)$$

Onde: P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol.

S_i e S_f = Concentração inicial e final de substrato (xilose e glicose).

4.4.3.4 Fator de conversão de xilose em células ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de xilose em células ($Y_{X/S}$), expresso em g/g, foi calculado através da seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \left(\frac{\Delta X}{-\Delta S} \right) = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (4.12)$$

Onde: X_i e X_f = concentração inicial e final de células.

S_i e S_f = Concentração inicial e final de substrato (xilose e glicose).

4.4.3.5 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em g/L.h, foi calculada através da equação a seguir:

$$Q_p = \frac{(\Delta P)}{(\Delta t)} = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)} \quad (4.13)$$

Onde: P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol.

t_i e t_f = tempo inicial e final da fermentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado por diversos métodos de destoxificação

5.1.1 Caracterização da palha de arroz

A composição da palha de arroz empregada neste estudo foi avaliada quanto aos teores de suas principais frações, conforme apresentado na Tabela 5.1. Na caracterização da palha de arroz, foram identificados aproximadamente 87% dos compostos presentes no material, dos quais 55% correspondem a frações de polissacarídeos (sendo 30,3% celulose e 24,6% hemicelulose), 20,4% lignina e 10,9% compostos inorgânicos (teor de cinzas). Nota-se que o teor de celulose da palha de arroz utilizada neste estudo (30,3%) está próximo ao limite inferior da faixa de composição reportada na literatura (32% a 43%) (KSHIRSAGAR, *et al.* 2015; KUMARI; SINGH, 2020), sendo os resultados mais semelhantes aos reportados por Lim *et al.* (2012) e Kshirsagar *et al.* (2015), cerca de 32% de celulose. Variações no teor das principais frações constituintes da biomassa vegetal, tal como a celulose, pode ser atribuído a fatores como o relatado por Wagner e Wolf (1999), em que o estágio de maturação da planta apresenta um papel importante no desenvolvimento da parede celular vegetal.

A palha de arroz apresentou o teor de 24,6% de hemicelulose, dos quais 21,1% atribuem-se a xilanas e 3,5% a arabinanas. Estes resultados estão bastante próximos aos encontrados na literatura, cujo teor de hemicelulose varia entre 19,3% e 28,9% (LIN, *et al.* 2016; KUMARI; SINGH, 2020). O teor de xilanas e arabinanas encontrados no presente estudo (21,2 e 3,5%, respectivamente) são semelhantes aos reportados por Castro *et al.* (2017), que encontraram teores de 19,9% e 3,9% para xilanas e arabinanas, respectivamente, correspondendo a um total de 23,8% de hemicelulose na palha de arroz.

Quanto à fração de lignina, o valor identificado na palha utilizada foi de 20,4%, valor semelhante ao que é relatado por Lin *et al.* (2016), cerca de 19,5% de lignina total, e dentro da faixa de variação relatada na literatura (18,3% a 22,3%) (KUMARI, SINGH, 2020; LIM, *et al.* 2012). O teor de cinzas encontrado na caracterização da palha foi de 10,9%, valor muito semelhante ao reportado por Kumari e Singh (2020).

Os extrativos deste trabalho representam 13,2%, semelhante ao reportado por Castro *et al.* (2017), que obteve o valor de 14,0%. Este valor pode estar relacionado a condições ambientais, idade de crescimento da palha, e outros fatores que influenciam suas espécies. O teor de extrativos presentes em biomassa vegetal pode ser atribuído a compostos tais como ácidos resínicos, triglicerídeos, ácidos graxos, álcoois graxos, esteróis e uma variedade de compostos fenólicos (PENG; BIAN; SUN, 2010).

Tabela 5.1 - Composição da palha de arroz utilizada.

Componente	Presente trabalho	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Celulose	30,3 ± 0,7	32	32	35,3 ± 0,2	38,8 ± 0,2	42,6 ± 2
Hemicelulose	24,6 ± 0,7	28	35,7	23,8 ± 0,4	19,3	28,9 ± 2
<i>Xilanas</i>	21,1 ± 0,6			19,9	16,0 ± 0,2	
<i>Arabinanas</i>	3,5 ± 0,2			3,9	3,3 ± 0,1	
Lignina total	20,4 ± 0,5	17	22,3	17,5	19,5 ± 1,8	18,3 ± 1
<i>Lig.insolúvel</i>	19,2 ± 0,3			13,1 ± 0,7		
<i>Lig.solúvel</i>	1,2 ± 0,5			4,4 ± 0,2		
Grupos acetil	0,55 ± 0,4			2,6 ± 0,4		
Cinzas	10,9 ± 0,1			11,3 ± 0,1	13,1 ± 0,1	10,1 ± 0,7
Extrativos*	13,2 ± 1		10	14,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	1,9 ± 0,3

Fonte: O Autor. *Determinado por diferença. (a) Kshirsagar *et al.* 2015; (b) Lim *et al.* 2012; (c) Castro *et al.* 2017; (d) Lin *et al.* 2016; (e) Kumari; Singh, 2020.

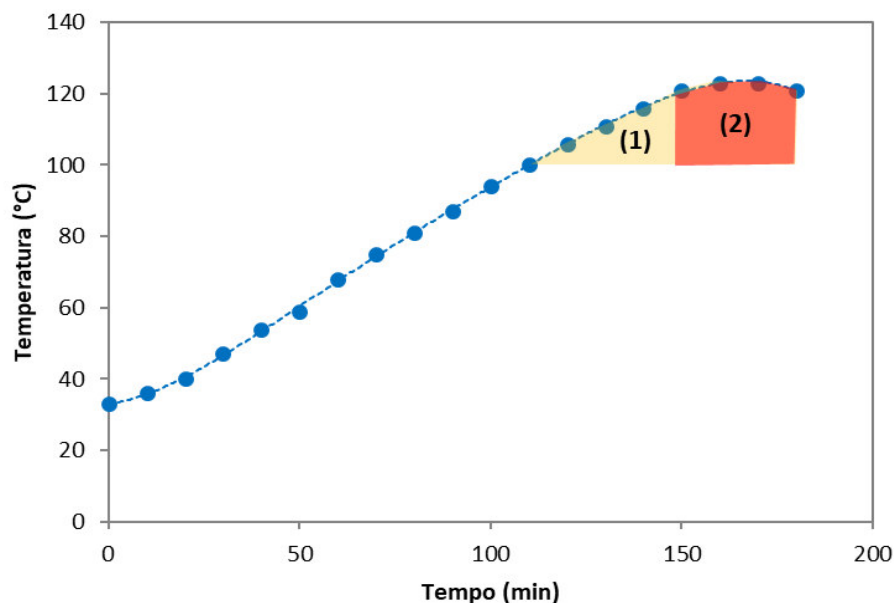
De modo geral, a composição da palha de arroz utilizada neste trabalho está de acordo com os valores comumente encontrados na literatura, indicando assim que o material utilizado pode ser considerado representativo para o desenvolvimento do estudo.

5.1.2 Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

Para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, foi realizada a hidrólise com ácido diluído, conforme metodologia descrita no item 4.1.2. A hidrólise foi realizada em um reator com capacidade de 350 litros, tipo tanque agitado, utilizando 20 kg de palha de arroz seca, 200 litros de solução ácida (H₂SO₄

na concentração 0,1 mol/L). A Figura 5.1 mostra o gráfico do tempo de reação da hidrólise ácida em relação à temperatura do reator. O aquecimento foi realizado a uma taxa de 0,64 °C/min, levando cerca de trinta minutos para elevar a temperatura de 100 para 121 °C, e permanecendo por mais trinta minutos nesta temperatura. Neste processo foi estimado um fator severidade combinada (CS) para a reação de hidrólise da hemicelulose da palha de arroz de aproximadamente 1,07. Lee, Ryu e Oh (2013) avaliaram a relação entre o fator de severidade combinada e o rendimento de hidrólise de diversos materiais, incluindo a palha de arroz. O CS é um indicador que facilita a comparação de diferentes condições da hidrólise (temperatura, tempo e acidez) por um único valor. Estes autores variando CS em uma faixa de 1,2 a 2,9, para o processo de hidrólise ácida da hemicelulose da palha de arroz, reportaram que o maior rendimento de hidrólise (54,32%) foi alcançado em CS mais severos, variando entre 2,3 e 2,5. No presente estudo, mesmo utilizado um fator de severidade de 1,07, foi alcançado um rendimento de hidrólise de 77%, superior ao reportado pelos referidos autores. Tal resultado pode estar relacionado ao uso de condições otimizadas de hidrólise especificamente para a palha de arroz.

Figura 5.1 - Relação entre a temperatura e o tempo durante a operação do reator de 350 L, utilizado para reação da hidrólise ácida da hemicelulose, com destaque para o período de aquecimento em temperatura superior à 100 °C (1) e período de reação com temperatura cerca de 121 °C (2).



Fonte: O Autor.

Ao fim do processo de hidrólise foram recuperados aproximadamente 140 litros de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA) livre de resíduos sólidos, correspondente à 70% do volume inicial de solução ácida (200 L). É importante esclarecer que foi realizada uma filtração manual para a separação do hidrolisado hemicelulósico da celulignina remanescente, e que o uso de equipamentos específicos para separação, como centrífugas, possivelmente proporcionaria um maior percentual de recuperação de hidrolisado.

Na Tabela 5.2 está apresentada a composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, quanto às suas frações de carboidratos (xilose, glicose, arabinose), ácido acético, furanos (furfural, hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos de baixa massa molecular. Verificou-se que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA) obtido pela hidrólise ácida apresentou uma concentração total de carboidratos de 20,1 g/L com uma proporção de 16:3:1 de xilose, arabinose e glicose, respectivamente, e uma fração de ácidos alifáticos de 1,3 g/L. Com base nos teores de xilose e arabinose do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, foi obtido uma eficiência de 77% da conversão dos açúcares a partir da hidrólise da hemicelulose, resultado próximo ao que é reportado na literatura por Silva (2011), em que alcançou uma eficiência de hidrólise de 78%, empregando as mesmas condições de hidrólise.

O hidrolisado hemicelulósico foi também submetido a um processo de concentração a vácuo com o intuito de se obter maiores concentrações de açúcares no hidrolisado. Nesta operação foi alcançado um fator de concentração em torno de oito vezes, ocasionando um aumento na concentração de açúcares nesta mesma proporção. Por outro lado, o teor de furanos, ácido acético e compostos fenólicos apresentaram aumentos inferiores ao fator de concentração empregado. O fator de concentração do furfural e ácido acético foi de 2,5 e 2,0, respectivamente, este comportamento pode estar relacionado com a volatilidade destas substâncias, nas condições operadas na etapa de concentração do hidrolisado hemicelulósico, ocasionando uma remoção parcial destes compostos. Comportamento semelhante foi reportado por Rodrigues *et al.* (2001), que também observaram um aumento da concentração de furfural e ácido acético inferiores ao fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Sobre os compostos fenólicos derivados da lignina, observa-se que o ácido p-cumárico e ácido vanílico foram os que obtiveram um fator de concentração maior, em torno de 14,6 e 18,5,

respectivamente, e o ácido furóico e a vanilina um fator de concentração menor, em torno de 4,2 e 2,0, respectivamente.

Tabela 5.2 - Composição do hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz obtido no processo de hidrólise ácida.

Compostos	Hidrolisado	Hidrolisado concentrado	Fator de concentração
Carboidratos e ácidos alifáticos (g/L)			
Xilose	15,6	124,3	8,0
Glicose	1,1	7,9	7,2
Arabinose	3,4	31,6	9,3
Ácido acético	1,3	2,6	2,0
Furanos (mg/L)			
Furfural	34,5	87	2,5
Hidroximetilfurfural	2,7	27,9	10,3
Compostos fenólicos derivados de lignina (mg/L)			
Ácido gálico	5,3	38,6	7,3
Ácido furóico	66,5	276,2	4,2
Álcool vanilil	37,8	408,2	10,8
Ácido vanílico	2,0	37,0	18,5
Ácido siríngico	3,4	30,3	8,9
Vanilina	16,9	33,8	2,0
Siringaldeído	285,5	1736,8	6,1
Ácido p-cumárico	10,0	146,2	14,6
Ácido ferúlico	119,9	1661,7	13,9
Fenólicos totais	2.900	9572	3,3

Fonte: O Autor.

O hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz apresentou uma concentração total de açúcares de aproximadamente 163,8 g/L, tendo uma proporção de 16:3:1 de xilose, arabinose e glicose. Estes resultados são semelhantes ao relatado por Fonseca *et al.* (2013), que obtiveram uma proporção de 14:2:2, para xilose, arabinose e glicose, totalizando o teor de açúcares de 117,5 g/L no hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz, operando em um reator a 120°C durante 30 minutos, utilizando uma relação massa seca/solução ácida de 1:10, com concentração de ácido sulfúrico a 1,0% (p/v). O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado (HHPAC), além dos açúcares, foi identificada a presença de compostos como ácidos alifáticos (2,6 g/L), furanos (87 mg/L de furfural e 27,9 mg/L de hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos de baixa

massa molecular (siringaldeído 1736,8 mg/L, ácido ferúlico 1661,7 mg/L, ácido siríngico 30,3 mg/L, vanilina 33,8 mg/L, ácido furóico 276,2 mg/L, ácido gálico 38,6 mg/L, álcool vanilil 408,2 mg/L, ácido vanílico 37,0 mg/L, ácido p-cumárico 146,2 mg/L). A presença de compostos como furanos e fenólicos derivados da lignina podem acarretar efeitos indesejáveis nos processos de bioconversão (KO *et al.*, 2015), desta forma, a tolerância da levedura a estes compostos presentes no hidrolisado foi verificada.

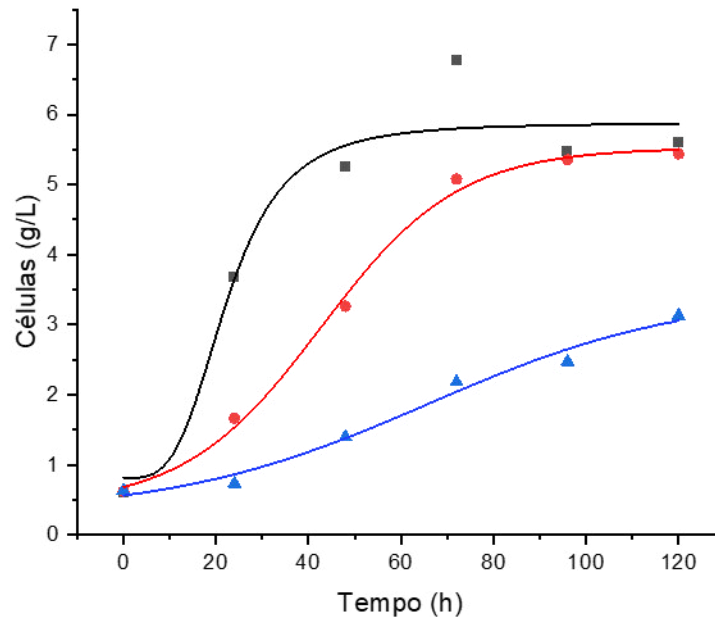
5.1.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado concentrado de palha de arroz não tratado por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124

Na Figura 5.2, são apresentados os perfis do crescimento celular da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado, para cultivos realizados em diferentes ajustes da concentração de xilose (40 g/L, 60 g/L e 80g/L). De modo geral, verificou-se que o crescimento celular foi impactado pelo aumento do fator de concentração do hidrolisado. Para o cultivo realizado em hidrolisado com concentração inicial de 40 g/L de xilose, foi observado um crescimento já nas primeiras 24 h, nas quais a concentração celular aumentou de 0,5 g/L para 3,7 g/L. Neste mesmo período de 24 h, para os cultivos em hidrolisados com xilose inicial a 60 g/L e 80 g/L foram alcançadas concentrações celulares de 1,6 g/L e 0,7 g/L, respectivamente. Nos cultivos realizados em hidrolisados com 40 g/L, 60 g/L e 80 g/L de xilose inicial, as máximas concentrações celulares (5,6 g/L, 5,4 g/L e 3,1 g/L, respectivamente) foram alcançadas nos tempos de 48 h, 72 h e 120 h, havendo pouca variação após estes tempos de cultivo. Estes resultados demonstram que, o aumento do fator de concentração do hidrolisado levou a um maior grau de inibição do crescimento celular, evidenciando que, além dos açúcares, há também no hidrolisado compostos capazes de interferir negativamente no crescimento celular da levedura, proporcionando um crescimento mais lento.

Este impacto no crescimento celular da levedura pode ser atribuído a presença de compostos inibidores no hidrolisado. De acordo com Hou *et al.* (2017), os compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz influenciam no crescimento das leveduras, onde é aconselhável a remoção deste

componente para subsequente aplicação em processos de bioconversão e cultivo microbianos.

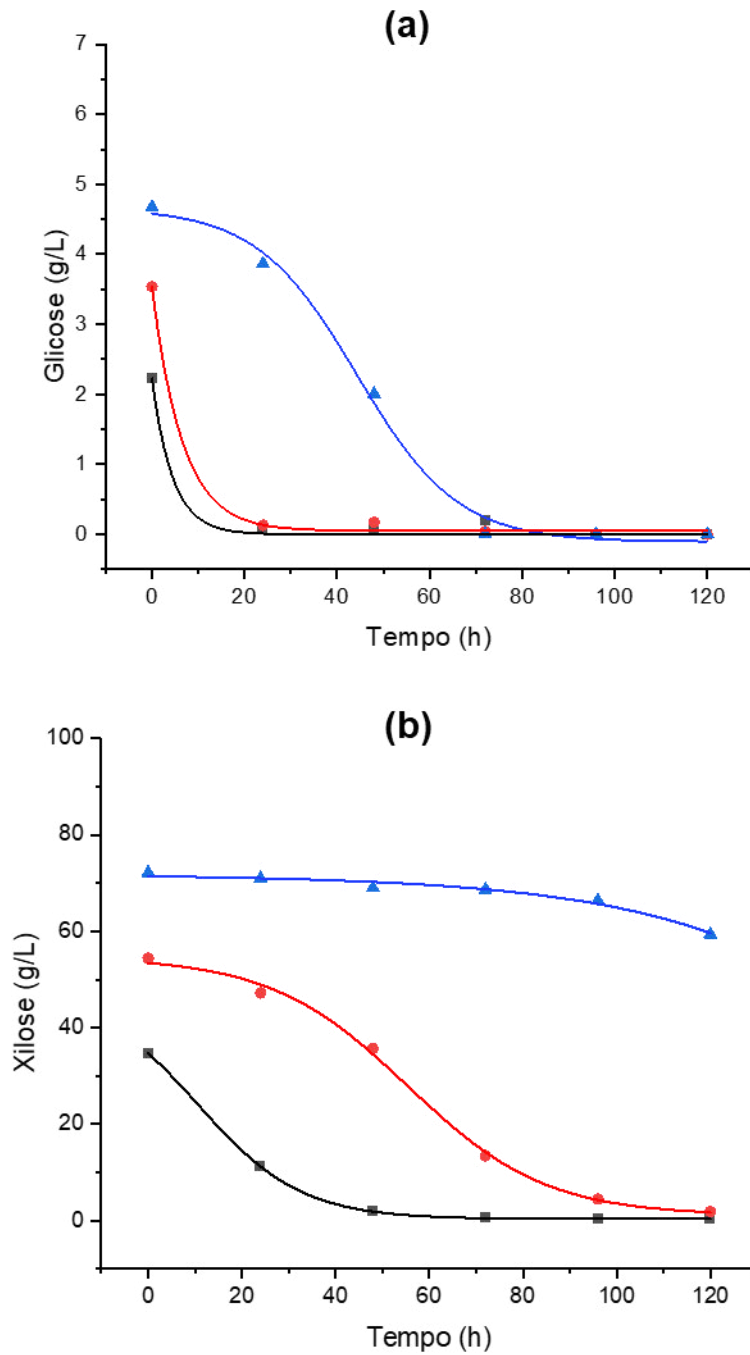
Figura 5.2 - Crescimento celular durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).



Fonte: O Autor.

Na Figura 5.3 são apresentados os consumos de açúcares (xilose e glicose) ao longo do período de cultivo da levedura em hidrolisado sob diferentes ajustes da concentração de xilose (40 g/L, 60 g/L e 80g/L). Observa-se na Figura 5.3.a que, em 24 h de cultivo em hidrolisados com concentrações iniciais de 40 g/L e 60g/L de xilose a levedura foi capaz de consumir praticamente toda a glicose presente no meio. Já para o cultivo em hidrolisado com concentração inicial de 80g/L de xilose, após 24 h ainda apresentava uma concentração de aproximadamente 3,9 g/L de glicose, sendo essa concentração consumida totalmente somente após 72 horas de fermentação. Verificou-se ainda na Figura 5.3.b que o consumo da xilose apresentou um comportamento análogo ao de glicose, em que para o hidrolisado com maior fator de concentração, a levedura apresentou um consumo mais lento. Foram observados consumos completos da xilose nos cultivos realizados em hidrolisado com concentrações iniciais de 40 g/L e 60 g/L, para os tempos de 48 h e 120 h de cultivo, respectivamente. Quando o cultivo foi realizado em meio com 80 g/L de

Figura 5.3 - Consumo de glicose (a) e xilose (b) durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).



Fonte: O Autor.

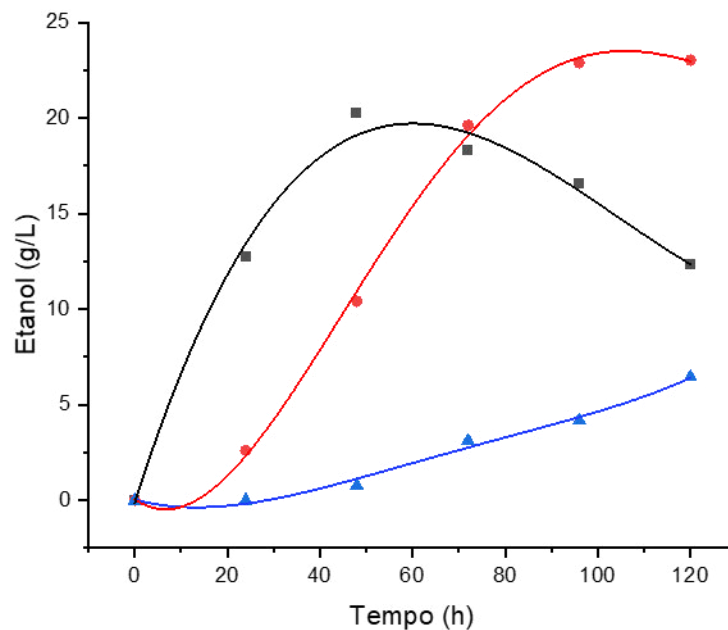
xilose, houve apenas um consumo parcial, restando ao fim das 120 h de cultivo cerca de 82% da xilose inicial. Referente a arabinose, a levedura não mostrou um consumo significativo, mantendo a concentração de arabinose no hidrolisado estável durante todo o período de 120 horas de fermentação (dados não apresentados). Silva *et al.* (2010) identificaram o mesmo comportamento pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 cultivada em meio sintético composto por 90 g/L de xilose, 15 g/L de glicose, 15 g/L de arabinose, 2,3 g/L de ureia, 1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 3 g/L de extrato de levedura, onde após 96 horas de fermentação, a levedura não consumiu arabinose. Conforme reportado por Farias, Andrade e Maugeri-Filho (2014), a concentração de substrato influencia no consumo de xilose pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124, onde é necessário um tempo maior de cultivo para altas concentrações de xilose no meio, devido a inibição da levedura ao meio mais concentrado. É relatado que para a concentração de 82,1 g/L, a duração do cultivo foi de 239,7 horas, apresentando ao final do cultivo uma concentração celular de 5,8 g/L e uma concentração final de etanol de 38,1 g/L. Para baixas concentrações de substrato, a taxa de conversão em etanol foi maior, atingindo até 0,50 g/g.

A Figura 5.4 apresenta o perfil de produção de etanol pela *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 durante os cultivos em hidrolisados com diferentes fatores de concentração. Observa-se que em 24 h, no cultivo em hidrolisado com concentração de 40 g/L a levedura alcançou um acúmulo de etanol de 12,8 g/L, enquanto para os cultivos em hidrolisado com concentrações de 60 g/L e 80 g/L, foram alcançados neste mesmo tempo concentração de etanol de 2,6 g/L e 0,9 g/L, respectivamente. Verificou-se ainda que, no cultivo realizado em hidrolisado com 40 g/L, a máxima concentração de etanol (20,2 g/L) foi alcançada no tempo de 48 h, e após esse período ouve uma reassimilação parcial do etano produzido, chegando em 12,3 g/L após 120 horas de cultivo. Quando a levedura foi cultivada em hidrolisado com 60 g/L de xilose, a máxima concentração de etanol, cerca de 23,1 g/L, foi alcançada em 96 horas de cultivo, permanecendo praticamente estável até o tempo final de 120 h. Já para o cultivo em hidrolisado com concentração de 80 g/L de xilose, a máxima concentração de etanol obtida foi de 6,5 g/L após 120 horas de cultivo, concentração está bastante inferior às máximas concentrações (20,2 e 23,1 g/L) obtidas nos demais cultivos. Estes resultados mostram que a produção de etanol pela levedura

foi fortemente impactada pelo aumento do fator de concentração do hidrolisado, provavelmente resultante da presença de compostos inibidores.

De acordo com o estudo de Cunha *et al.* (2019), a presença de vários inibidores no hidrolisado hemicelulósico causam um efeito de grande influência no processo, precisando ser levado em consideração e analisado para um bom desenvolvimento da levedura. De modo geral, observa-se que o crescimento celular, o consumo de açúcares e a produção de etanol, são impactados com o aumento da concentração do hidrolisado. Estes resultados indicam a presença de compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, capazes de afetar negativamente o processo de bioconversão dos açúcares presentes no hidrolisado.

Figura 5.4 - Produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com concentrações de xilose de: 40g/L (■), 60 g/L (●) e 80 g/L (▲).



Fonte: O Autor.

5.1.4 Comparação de diferentes métodos de tratamento de destoxificação aplicados ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados da caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado, assim como as caracterizações para o mesmo hidrolisado após os processos de tratamento por POAs, Overliming, Carvão ativado e Processo combinado (Overliming-POAs). Em relação a concentração de xilose, verifica-se que os tratamentos por Overliming e Processo combinado (Overliming + POAs) apresentaram uma redução em torno de 18%, enquanto tratamentos por Carvão ativado e POAs proporcionaram reduções de 3,3% e 1,6%, respetivamente (sendo tais variações pouco significativas, devido à proximidade do erro analítico decorrente do método de quantificação).

Em relação aos compostos fenólicos e furanos, nota-se que o tratamento do hidrolisado por POAs proporcionou uma redução acima de 95% para ácido furóico e ácido ferúlico. E os compostos furfural, vanilina, ácido p-cumárico e siringaldeído, obtiveram uma redução entre 70% e 94%. Por outro lado, foi observado aumento de concentração de 13% para ácido gálico, o que pode ter ocorrido devido a degradação de outros compostos durante o tratamento. É importante destacar que estas reduções nas concentrações de compostos potencialmente inibidores foram acompanhadas da manutenção das concentrações de açúcares no hidrolisado, demonstrando assim uma importante seletividade do processo de tratamento de destoxificação, uma característica muito desejável para tais finalidades.

O tratamento por Processo combinado (Overliming e POAs), proporcionou a redução praticamente completa (igual ou superior a 97%) de álcool vanilil, ácido furóico, siringaldeído e ácido ferúlico. Para os compostos vanilina, furfural e ácido siríngico, o tratamento reduziu 85%, 74% e 90%, respetivamente. Em relação ao HMF e ácido gálico, os tratamentos proporcionaram reduções da ordem de 57% e 26%, respetivamente.

Em relação aos compostos furanos, o tratamento por carvão ativado apresentou uma maior redução, cerca de 90%, sendo seguido pelo processo por POAs com 71% de redução na concentração de furanos. Yücel e Aksu (2015) verificou uma redução de 98% dos compostos furanos em hidrolisado derivado da polpa de beterraba, onde é relatado que esta redução pode estar relacionada a alta capacidade de adsorção do carvão ativado.

Tabela 5.3 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado original (não tratado) e após os tratados por POAs, Overliming, Carvão Ativado e Processo Combinado (Overliming-POAs).

Compostos	Composição em termos da concentração					Variação das concentrações (%)			
	HHPA-NT	POAs	Overliming	Carvão Ativado	Combinado	POAs	Overliming	Carvão Ativado	Combinado
Carboidratos e ác. alifáticos									
Xilose (g/L)	124,3	122	101,4	120,2	101,3	-2%	-18%	-3%	-19%
Glicose (g/L)	7,9	8,3	9,4	8,0	9,7	5%	19%	1%	23%
Arabinose (g/L)	31,6	31	22,5	30,1	22,5	-2%	-29%	-5%	-29%
Ácido acético (g/L)	2,6	2,6	2,0	2,4	2,2	0%	-23%	-8%	-15%
Furanos									
Furfural (mg/L)	87	26	31	5	23	-70%	-64%	-94%	-74%
Hidroximetilfurfural (mg/L)	28	7	12	6	12	-75%	-57%	-79%	-57%
Compostos fenólicos									
Siringaldeído (mg/L)	1737	97	233	1116	51	-94%	-87%	-36%	-97%
Ácido p-cumárico (mg/L)	146	18	49	108	13	-88%	-66%	-26%	-91%
Ácido gálico (mg/L)	39	44	11	31	29	13%	-72%	-21%	-26%
Álcool vanilil (mg/L)	408	24	79	61	0	-94%	-81%	-85%	-100%
Ácido vanílico (mg/L)	37	4	30	31	4	-89%	-19%	-16%	-89%
Ácido ferúlico (mg/L)	1662	48	263	1072	34	-97%	-84%	-35%	-98%
Ácido siríngico (mg/L)	30	3	17	23	3	-90%	-43%	-23%	-90%
Vanilina (mg/L)	34	5	19	9	5	-85%	-44%	-74%	-85%
Ácido furóico (mg/L)	276	14	0	14	0	-95%	-100%	-95%	-100%
Total de compostos fenólicos de baixa massa molecular (mg/L)	4369	257	701	2465	139	- 94%	- 84%	- 44%	- 97%
Fenólicos totais (mg/L)	9572	5790	6570	11964	4059	- 40%	- 31%	25%	- 58%
Inorgânicos totais (g/L)	39	140	35	124	98	258%	- 10%	218%	151%

Fonte: O Autor.

Quanto à redução do total de compostos fenólicos de baixa massa molecular, as maiores reduções, 94% e 97%, foram alcançadas com o emprego dos processos de tratamento por POAs e Combinado Overliming-POAs), respectivamente. Sendo as reduções alcançadas pelo tratamento por Overliming e por Carvão Ativado, de 84% e 44%, respectivamente. Resultados de redução semelhantes também foram observados para os compostos fenólicos totais, sendo a maior redução obtida para o processo combinado (58%), seguida em ordem decrescente pelos tratamentos por POAs (40%), Overliming (31%) e Carvão ativado (25%).

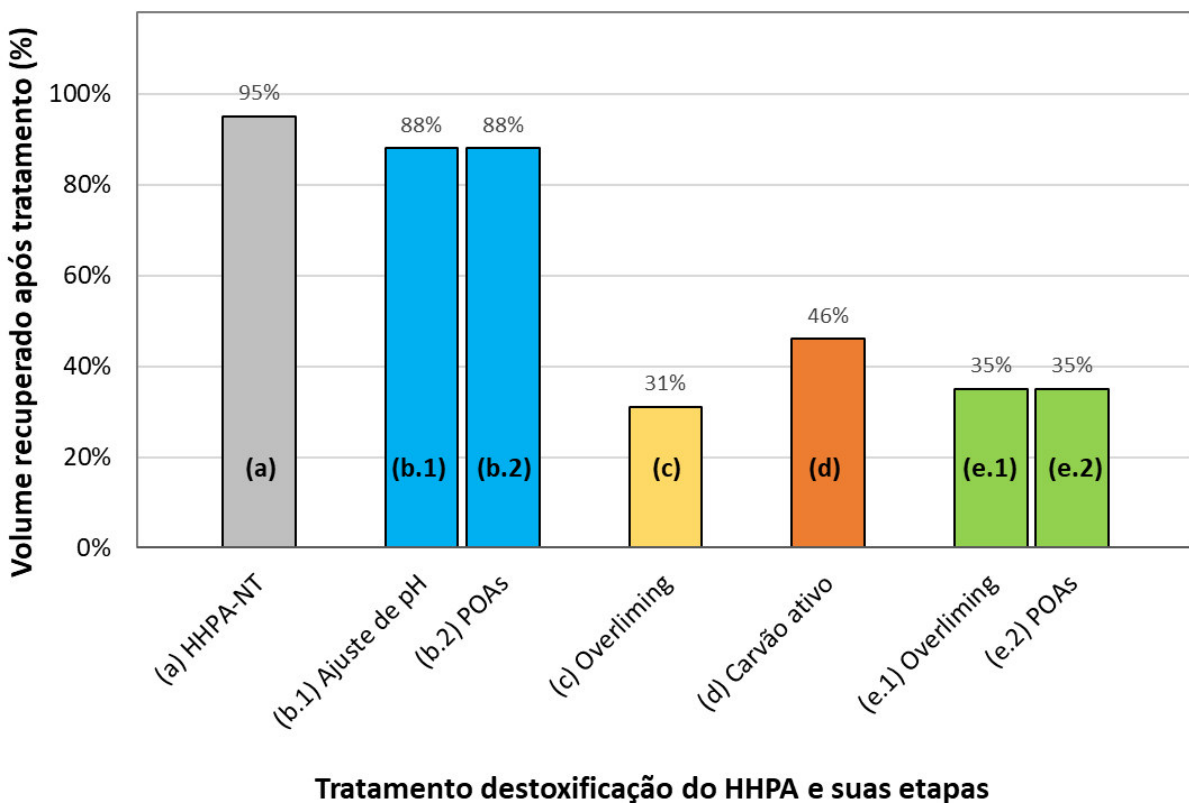
De modo geral, os tratamentos avaliados tiveram ainda uma influência bastante variada sobre o teor de compostos inorgânicos totais solúveis presentes no hidrolisado. É importante lembrar que a presença de compostos inorgânicos solúveis, tais como sais, pode proporcionar maior pressão osmótica no meio, sendo este um fator de estresse microbiano, podendo agravar os efeitos da toxicidade do hidrolisado. Neste sentido, verificou-se que o tratamento por Overliming foi o único que manteve praticamente inalterado o teor de compostos inorgânicos, comparado ao hidrolisado não tratado. Isso por ser explicado pelo fato da formação de grande quantidade de precipitado (sulfato de cálcio) como resultado do ajuste do pH. No processo combinado há também a remoção de sulfato de cálcio, porém em menor proporção que no Overliming, uma vez que parte da variação do pH é proporcionado pela etapa de tratamento por POAs. Já nos processos de tratamento por POAs e por carvão ativado, todo ajuste de pH foi feito utilizando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, tendo como resultado sais solúveis (sulfato de sódio), o que contribuiu para aumento do teor de inorgânicos de até 2,5 vezes.

5.1.4.1 Volume recuperado após os tratamentos

Na Figura 5.5 são apresentados os valores de volume de hidrolisado recuperado após os tratamentos de destoxificação por: POAs (Figura 5.5.b), Overliming (Figura 5.5.c), carvão ativado (Figura 5.5.d), e combinado de POAS e Overliming (Figura 5.5.e). Os resultados são ainda comparados ao volume de hidrolisado não tratado obtido após o ajuste de pH para as condições de fermentação e remoção por centrifugação dos precipitados formados por decorrência

deste ajuste de pH (Figura 5.5.a). Após esta operação foi constatada uma recuperação de 95% do volume inicial, sendo essa a máxima recuperação de volume conseguida nos ensaios. Para os tratamentos foram observadas maiores perdas de volume de hidrolisado, levando a diferentes recuperações, dependendo do tipo de tratamento.

Figura 5.5 - Volume recuperado de hidrolisado após ajuste direto de pH para condição de fermentação (a); e após tratamento de destoxificação por processos: POAs (b) nas etapas de ajuste de pH 8,5 (b.1) e POAs (b.2); tratamento por Overliming (c); Tratamento por carvão ativado (d); e tratamento combinado Overliming-POAs (e).



Fonte: O Autor.

O tratamento por Processos Oxidativos Avançados (Figura 5.5.b) compreendeu duas etapas consecutivas, um ajuste de pH até 8,5 com centrifugação (Figura 5.5.b.1), seguido da etapa de POAs (Figura 5.5.b.2), as quais são mostradas de forma separadas. Verificou-se que após o ajuste de pH e centrifugação foram recuperados cerca de 88% de volume de hidrolisado, e que durante a etapa de tratamento por POAs não houve variação significativa de volume de hidrolisado.

Desta forma, ao fim do tratamento por POAs englobando todas as suas etapas, foram recuperados 88% do volume inicial de hidrolisado. Foi possível verificar que o hidrolisado tratado por Overliming e o processo combinado (Overliming + POAs) resultaram nas maiores perdas de volume (cerca de 69% e 62%, respectivamente) quando comparado com os outros tratamentos estudados neste trabalho. Com relação ao tratamento combinado, verificou-se que a etapa de Overliming foi responsável pela perda de 65% do volume, como consequência do ajuste de pH e remoção do precipitado formado, e que a etapa de POAs não levou a variação significativa de volume. Quando comparado o tratamento combinado com o tratamento por Overliming, observa-se que a perda de volume de hidrolisado no tratamento por Overliming é maior devido ao ajuste de pH de 10 para 6,5, no qual houve novamente a formação de precipitado e a necessidade de separação do mesmo por centrifugação, proporcionando mais uma pequena perda de volume. A perda de volume pode estar relacionada ao uso do Ca(OH)_2 , formando um precipitado de alto volume de sulfato de cálcio (MATEO *et al.* 2013). No processo combinado, o hidrolisado teve seu pH ajustado até pH 10, e após o tempo de tratamento, foi ajustado para o pH 8,5, onde prosseguiu para o tratamento por POAs. No processo de destoxificação por carvão ativado, o tratamento teve uma perda de 54% de hidrolisado.

É importante destacar que o ajuste de pH e centrifugação que precede a fermentação resulta em uma recuperação de 95% de volume de hidrolisado, ou seja, leva a uma perda mínimo de 5%. Quando comparado com a perda mínima no ajuste do pH para fermentação, verifica-se que a recuperação de volume relativa a esta perda mínima para o hidrolisado tratado por POAs foi de 93%; por Overliming foi de 36%; por Carvão Ativado foi de 51%; e por processo combinado (Overliming + POAs), a recuperação foi de 40%. Dentre os tratamentos avaliados, o POAs proporcionou a maior recuperação de volume de hidrolisado tratado, e a menor geração de resíduos (precipitados).

5.1.4.2 Influência dos tratamentos de destoxificação sobre a concentração de açúcares totais

Na Figura 5.6 são apresentados os resultados referentes a variação da concentração de açúcares totais (glicose, xilose e arabinose) no hidrolisado

hemicelulósico de palha de arroz não tratado e tratado com os diferentes processos de destoxificação avaliados: Processos Oxidativos Avançados (POAs); Overliming; Carvão ativado; e Processo combinado (Overliming + POAs). A manutenção da concentração de açúcares após a etapa de tratamento de destoxificação é um aspecto de grande importância. Segundo Zabed *et al.* (2016a), a concentração de açúcares no meio influencia a quantidade de produto, possibilitando alcançar maiores concentrações de etanol no mosto fermentado e reduzindo o custo de produção durante o processo na etapa de destilação.

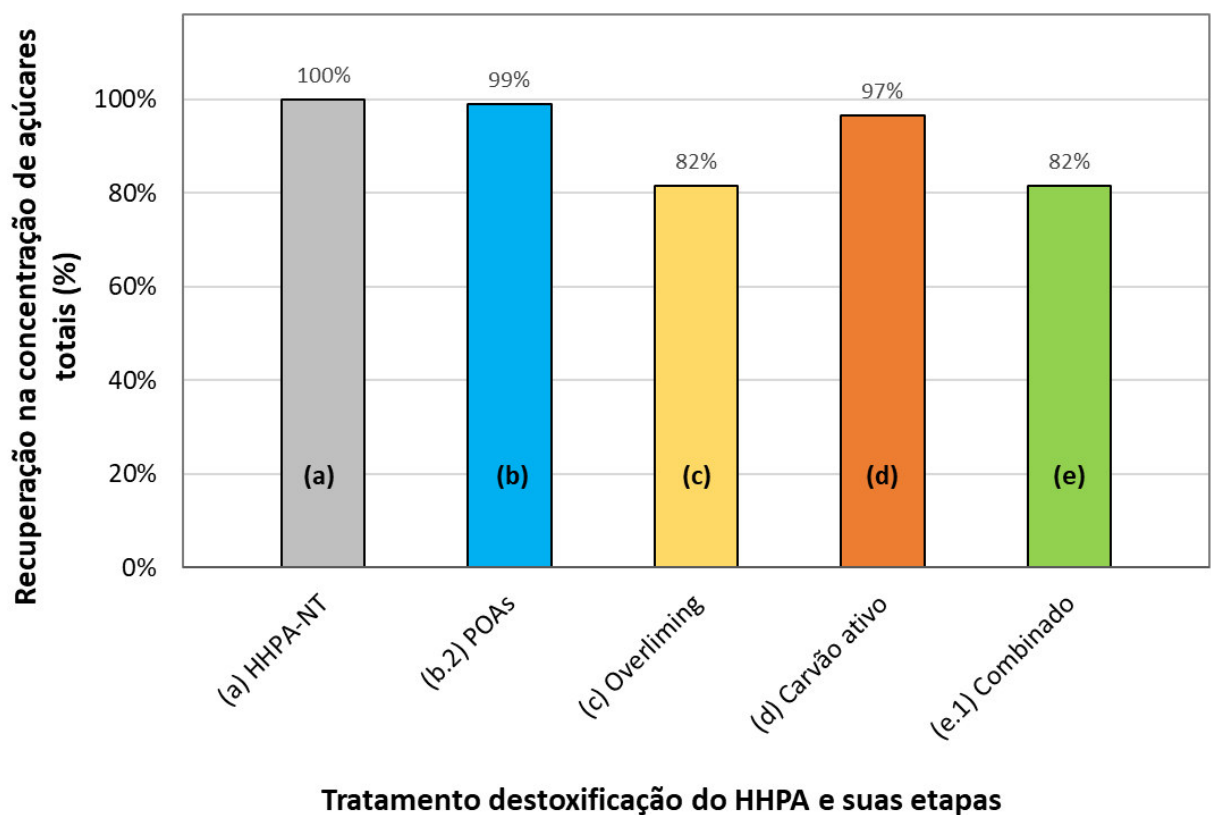
As menores variações da concentração de açúcares totais foram observadas para os tratamentos por POAs (1,5%) e carvão ativado (3,5%). O tratamento por POAs foi iniciado com o hidrolisado na concentração de açúcares totais de 163,8 g/L, e ao final do tratamento, apresentou uma concentração de 161,3 g/L, demonstrando uma variação de aproximadamente 1,5%. É importante destacar que esta variação está dentro da margem de erro dos procedimentos analíticos utilizados para quantificação de açúcares. Com relação ao tratamento por carvão ativado, o hidrolisado apresentava uma concentração inicial de açúcares totais de 163,8 g/L, e após o tratamento, o hidrolisado apresentava uma concentração de 158,3 g/L, representando uma redução de 3,4%.

Para o tratamento por Overliming, o hidrolisado não tratado apresentava uma concentração de açúcares totais de 163,8 g/L, e, após o tratamento, houve uma redução de concentração para 133,3 g/L, indicando uma perda de cerca de 18,6% na concentração de açúcares totais no hidrolisado tratado. De fato, é relatado por Mohagheghi, Ruth e Schell (2006) que o aumento do pH durante o processo por Overliming pode acarretar na redução da concentração de xilose no hidrolisado, alcançando diminuições de até 34% quando ajustado para pH 11. E segundo o referido autor, esta redução se dá pelo fato da conversão dos açúcares no hidrolisado para compostos não fermentáveis. A perda na concentração de açúcares durante o tratamento por overliming pode ser atribuída a conversão destes em ácido láctico, que é formado a partir da degradação dos açúcares presentes no hidrolisado em meio alcalino (MILLATI; NIKLASSON; MOHAMMAD, 2002).

No tratamento Combinado (Overliming + POAs), o tratamento por Overliming foi iniciado em hidrolisado não tratado com concentração de 163,8 g/L, onde após essa primeira etapa do tratamento, a concentração de açúcares totais no hidrolisado foi reduzida para 133,5 g/L. A segunda etapa de POAs foi iniciada com esta

concentração de açúcares totais (133,5 g/L), não sendo verificada variação significativa da concentração de açúcares decorrer desta etapa, mantendo a concentração final de 133,5 g/L.

Figura 5.6 - Porcentagem de recuperação da concentração de açúcares totais (xilose, glicose e arabinose) no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido após ajuste direto de pH para condição de fermentação (a); e após tratamento de destoxificação por processos: POAs (b); tratamento por Overliming (c); Tratamento por carvão ativado (d); e tratamento combinado Overliming-POAs (e).



Fonte: O Autor.

5.1.5 Avaliação da fermentabilidade no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz após diferentes tratamentos de destoxificação

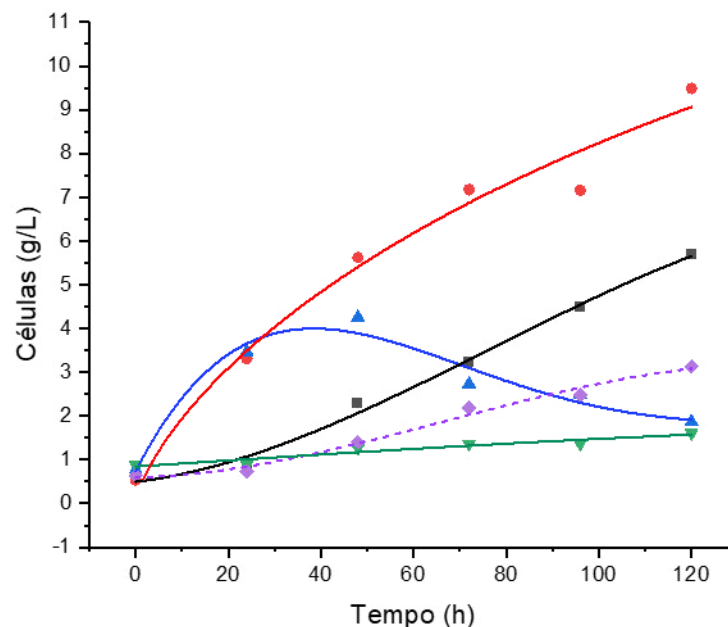
Na Figura 5.7 são apresentados os perfis de crescimento celular da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 ao longo dos cultivos nos hidrolisados tratados por diferentes métodos de destoxificação: Carvão ativado, Overliming, Processos Oxidativos Avançados (POAs) e Processo combinado (Overliming + POAs). De modo geral, durante o tempo de cultivo observado, a levedura foi capaz de apresentar crescimento celular em todos os hidrolisados tratados. Porém, o tipo de tratamento empregado teve grande influência sobre o perfil de crescimento celular da levedura, demonstrando que a capacidade de destoxificação teve grande variação entre os diferentes tratamentos avaliados.

Nos cultivos realizados nos hidrolisados tratados por processo Overliming e processos combinado Overliming-POAs, verificou-se que, já nas primeiras 24 h a levedura foi capaz de alcançar concentrações celulares de cerca de 3 g/L. Após este período verificou-se ainda que, em hidrolisado tratado por Processo combinado Overliming-POAs, houve um aumento da concentração celular durante todo o período de cultivo acompanhado (120 h), alcançando ao fim deste período cerca de 9,5 g/L. Sendo esta, a maior concentração celular observada entre todos os cultivos em hidrolisado tratado pelos diferentes métodos. Com relação ao hidrolisado tratado por processo Overliming, após as primeiras 24 h, houve pouca variação na concentração celular até o tempo de 72 h, e após este período foi observado um decréscimo da concentração celular estimada. Neste sentido é importante esclarecer que, após 72 h, foi notada a ocorrência de floculação pela levedura, o que certamente proporcionou distorções na quantificação da concentração celular deste tempo em diante, uma vez que a concentração celular nos ensaios foi estimada por técnica de turbidimetria. Desta forma, não foi possível inferir sobre o real comportamento do crescimento da levedura entre 72 h e 120 h de cultivo.

Em hidrolisado tratado por POAs, a levedura apresentou um crescimento constante durante todo o período de 120 h observado, alcançando ao final deste período uma concentração de 5,7 g/L. Comparado à concentração celular alcançada nos cultivos em hidrolisado não destoxificado (3,1 g/L em 120 h), quando cultivado em hidrolisado tratamento por POAs, a levedura apresentou uma concentração

celular 83% superior, demonstrando que o tratamento foi capaz de proporcionar uma redução de inibição do metabolismo microbiano. Este aumento é superior ao relatado por Reis *et al.* (2020) que verificou um aumento de 35% referente ao acúmulo de biomassa da cepa fúngica *Mucor circinelloides* URM 4182 em vinhaça da cana de açúcar como meio de cultura tratada por Processos Oxidativos Avançados.

Figura 5.7 - Crescimento celular durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado com 80g/L de xilose (♦) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲).



Fonte: O Autor.

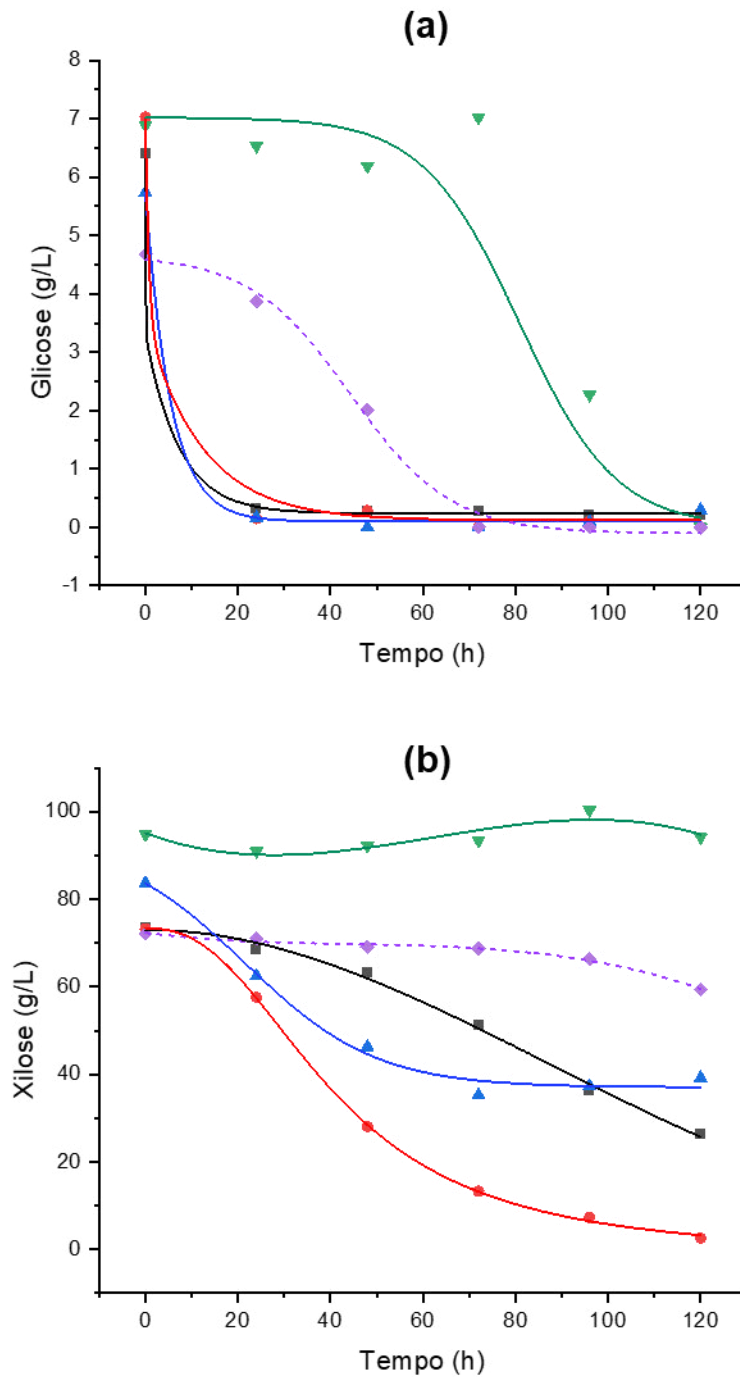
No cultivo da levedura em hidrolisado tratado por Carvão ativado foi observado o menor crescimento celular, alcançando apenas 1,6 g/L após 120h de cultivo. Este crescimento foi bastante inferior ao observado para os demais tratamentos, e sendo inferior até mesmos que o observado em hidrolisado não tratado. A menor formação de biomassa celular pode indicar que a remoção de compostos inibidores não foi suficiente para levar a uma redução da inibição. O processo de adsorção em carvão ativado pode ainda ter removido do hidrolisado, possíveis nutrientes, que contribuíam para o crescimento celular. É importante destacar ainda que a concentração inicial de xilose no cultivo em hidrolisado tratado

por carvão ativado (cerca de 95 g/L), foi superior a concentração em hidrolisado não tratado (cerca de 75 g/L), em possíveis decorrências no preparo dos meios de cultivo. Esta diferença foi, provavelmente, análoga para os compostos potencialmente inibidores, explicando assim o crescimento celular inferior em hidrolisado tratado por carvão ativado, inferior até mesmo que o hidrolisado não tratado.

Na Figura 5.8 são apresentados os consumos de açúcares (glicose e xilose) para os cultivos realizados em hidrolisado não tratado e após os diferentes tratamentos de destoxificação avaliados. De modo geral, verificou-se que o consumo de substrato foi influenciado pelo tipo de tratamento de destoxificação avaliado, sendo notadas maiores consumos de açúcares nos hidrolisados tratados por Overliming, POAs e Combinado (Overliming e POAs). Verificou-se ainda que o hidrolisado tratado por carvão ativado foi o único que apresentou um consumo inferior ao hidrolisado não tratado.

Verifica-se na Figura 5.8.a, que nos cultivos em hidrolisados tratados por Overliming, Processos Oxidativos Avançados e Combinado, a levedura foi capaz de consumir praticamente toda a glicose em 24 h de cultivo, enquanto em hidrolisado não tratado a glicose só foi completamente consumida em 72 h de cultivo. Já no cultivo em hidrolisado tratado por Carvão ativado, o consumo completo da glicose somente ocorreu após 120 horas de cultivo. Quanto ao consumo de xilose (Figura 5.8), verificou-se que os cultivos em hidrolisado tratado por Overliming, POAs e pela Combinação destes processos, apresentaram maior consumo deste açúcar. No cultivo em hidrolisado não tratado, a levedura foi capaz de assimilar cerca de 15% da xilose disponível durante as 120 h de cultivo. Entretanto, em hidrolisado tratado com carvão ativado, a levedura se mostrou incapaz de assimilar xilose durante as 120 h de cultivo observadas. Dentre o tratamento, a combinação de Overliming e POAs proporcionou os maiores consumos de açúcares, havendo um consumo completo da xilose em cerca de 96 h de cultivo. Nos cultivos em hidrolisados tratados de forma isolada, por Overliming ou por POAs, a levedura foi capaz de consumir cerca de 60% da xilose inicial em 120 h, mostrando um importante aumento em relação ao observado em hidrolisado não tratado, que alcançou 15% neste mesmo período.

Figura 5.8 - Consumo de glicose (a) e xilose (b) durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado com 80g/L de xilose (◆) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲).

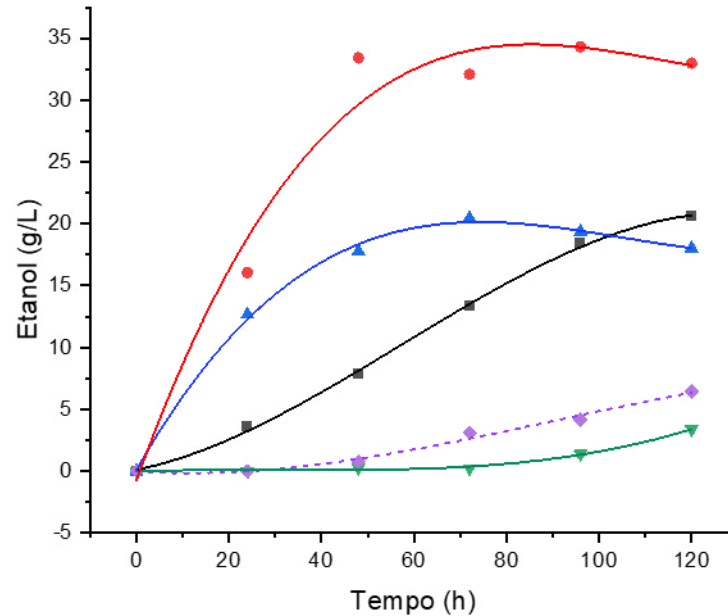


Fonte: O Autor.

A Figura 5.9 mostra a produção de etanol nos hidrolisados tratados por diferentes processos de destoxificação. No cultivo em hidrolisado não tratado, a máxima concentração de etanol, cerca de 5 g/L, foi alcançada após 120 h de cultivo. Dentre os hidrolisados tratados, o resultante do tratamento com Carvão ativado obteve um menor acúmulo de etanol, alcançando somente 3,8 g/L de etanol ao final de 120 h. Valor este inferior ao observado para o hidrolisado não tratado. De modo geral, verificou-se que o tratamento por Carvão ativado não acarretou em nenhum benefício para a etapa de bioconversão. Para os cultivos em hidrolisado tratado por processos Overliming e POAs, a levedura alcançou um acúmulo máximo de 18,7 g/L e 21,6 g/L de etanol, respectivamente, em períodos de 72 h e 120 h. Embora as concentrações alcançadas sejam próximas, o tratamento por Overliming possibilitou alcançar uma produtividade volumétrica em etanol ($Q_P = 0,26$ g/L.h) superior àquela alcançada com o tratamento por POAs ($Q_P = 0,18$ g/L.h). É importante destacar que, apesar da maior produtividade alcançada com o tratamento por Overliming, este ocasionou uma perda de 69% de volume de hidrolisado, enquanto o hidrolisado tratado por POAs proporcionou a recuperação quase que completa do volume tratado. O tratamento do hidrolisado por processo combinado (Overliming e POAs) foi o que possibilitou à levedura alcançar as maiores concentrações de etanol, 33,2 g/L após 120 horas de cultivo, e conseqüentemente a maior produtividade ($Q_P = 0,28$ g/L.h).

A comparação dos diferentes tipos de tratamento de destoxificação, quanto a seus efeitos sobre a fermentabilidade do hidrolisado, mostraram que o emprego de Overliming, POAs ou sua combinação, são capazes de proporcionar importantes melhorias ao processo de bioconversão avaliado. É importante considerar ainda que, embora estas técnicas de tratamento tenham possibilitado alcançar diferentes ganhos em termos de concentração de produto e produtividade do processo, cada uma tem diferentes implicações em termos de recuperação de volume e manutenção do teor de açúcares nos hidrolisados tratados. Desta forma, uma análise econômica simplificada, comparando os custos de cada processo frente à quantidade de produto obtido pode proporcionar um importante ponto de comparação, principalmente pela relevância que tais custos podem ter na aplicabilidade e competitividade de tais processos em escala industrial.

Figura 5.9 - Produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado com 80g/L de xilose (♦) e após os tratamentos: POAs (■), Combinado (●), Carvão Ativado (▼), Overliming (▲).



Fonte: O Autor.

5.1.6 Avaliação comparativa de custos operacionais dos diferentes métodos de destoxificação

Visando uma comparação mais ampla das características dos diferentes métodos de destoxificação avaliados neste estudo (POAs, Overliming, Carvão ativado e Combinado), uma análise econômica simplificada, baseada em estimativas de custos operacionais de insumos para uma escala de 1000 L foi também realizada. Para comparação foram estimados os custos relativos por unidade volumétrica de hidrolisado submetido aos tratamentos, assim como o custo relativo por unidade volumétrica de etanol produzido na etapa subsequente de fermentação (Tabela 5.4). Para as estimativas foram consideradas as informações do balanço material coletadas durante a realização dos tratamentos em escala de bancada, tais como: volume de hidrolisado recuperado após cada etapa dos tratamentos, variações das concentrações de açúcar, quantidades de insumos químicos e quantidade de etanol obtido na etapa subsequente de bioconversão dos açúcares dos hidrolisados tratados em etanol. Foram considerados ainda dados referentes

aos valores de mercado de cada insumo químico, obtidos de levantamentos na literatura, e em base de dados e plataformas de comércio.

Para comparação, foram avaliados os custos referentes ao hidrolisado não tratado, referentes a etapa de ajuste de pH, a qual demandou 27 kg de hidróxido de sódio, e possibilitou a recuperação de 950 L de hidrolisado. Como resultado da bioconversão deste volume de hidrolisado foi estimada a obtenção de 5 kg de etanol. A baixa quantidade de etanol obtida se deve à limitação da etapa de bioconversão, provavelmente decorrente da presença de compostos inibidores. Desta forma, considerando o uso de hidrolisado não destoxificado, seriam gastos cerca de USD 9,54/m³ de hidrolisado tratado. Se considerado em termos de volume de etanol produzido, os custos seriam da ordem de USD 1.481,23/m³.

Considerando o tratamento de 1000 L de hidrolisado por POAs, foram estimadas a adição de 52 kg de hidróxido de sódio na primeira etapa de ajuste do pH, com a recuperação de 879 L de hidrolisado. A etapa seguinte do tratamento refere-se à adição ao hidrolisado de 0,09 Kg de peróxido e 0,24 Kg de ozônio, para o desenvolvimento do Processo Oxidativo Avançado. Nesta segunda etapa foi recuperado a totalidade do volume de hidrolisado submetido ao tratamento (879 L), já em pH de fermentação. Como resultado do processo de bioconversão, para cada 1000 L de hidrolisado submetido ao processo de tratado por POAs (equivalente a 879 L de hidrolisado tratado) foram obtidos 18 kg de etanol. É importante mencionar que a quantidade de etanol (18 kg por 1000L de hidrolisado inicial) foi superior àquela obtida no processo utilizando hidrolisado não destoxificado (5 kg por 1000 L de hidrolisado inicial), o que se deve a maior desempenho do processo de bioconversão devido a redução da toxicidade do hidrolisado. Para este processo foi estimado um custo de USD 19,29/m³ relativo ao volume inicial de hidrolisado, o que corresponde a um custo por unidade volumétrica de etanol produzido de USD 859,47/m³.

No tratamento por Overliming, para cada 1000 L de hidrolisado inicial foram estimados o uso de 202 Kg de Ca(OH)₂ e 1 Kg de H₂SO₄, sendo recuperado ao fim do processo cerca de 307 L de hidrolisado tratado. Para o cultivo da levedura neste volume de hidrolisado tratado, foi estimada a obtenção de 6 kg de etanol. Apesar das importantes melhoras observadas no cultivo, a quantidade total de etanol obtida foi próxima à conseguida em hidrolisado não tratado (5 kg para cada 1000 L de hidrolisado inicial). Isso se deve a grande perda de volume de hidrolisado decorrente

do tratamento. O custo total do tratamento por processo Overliming, relativo ao volume de hidrolisado submetido ao tratado foi de USD 33,77/m³. Quando a comparação foi relativizada por volume de etanol produzido ao fim do processo foi estimado um custo de cerca de USD 4356,93/m³, um custo 2,1 vezes superior ao obtido em hidrolisado não tratado (USD 1.481,23/m³) e cerca de 4,4 vezes superior ao estimado para o tratamento por POAs (USD 859,47/m³).

No tratamento por carvão ativado, foram utilizados 51 Kg de hidróxido de sódio e 2 Kg de ácido sulfúrico para ajuste do pH, e 18 Kg de carvão ativado para realização do tratamento por adsorção, obtendo um custo final do processo de USD 37,60/m³ relativo ao volume de hidrolisado submetido ao tratamento. Para cada 1000 L iniciais de hidrolisado foram recuperados cerca de 520 L de hidrolisado tratado. Para o cultivo da levedura em tal volume foi estimada a obtenção de 2 Kg de etanol. Desta forma, para este processo foi estimado um custo relativizado por volume de etanol produzido de USD 17.238,29/m³. Para o tratamento por carvão ativado, o custo estimado por unidade volumétrica de etanol produzido foi cerca de 11 vezes superior ao estimado para hidrolisado não tratado (USD 1.481,23/m³). O elevado custo do tratamento por carvão ativado se deve à combinação de uma grande perda de hidrolisado decorrente do tratamento (48% do volume inicial), sem ganhos importantes na produção de etanol durante o cultivo (permanecendo próximo do observado em hidrolisado não tratado), estando o custo deste tratamento próximo limite superior entre os processos de destoxificação comparados neste estudo.

No tratamento combinado (Overliming seguido de POAs), foram utilizados 202 Kg de hidróxido de cálcio e 1 Kg de ácido sulfúrico, para ajuste do pH na primeira etapa do processo (Overliming). Na segunda etapa em que foi realizado o tratamento por POAs, foram utilizados 0,04 Kg de peróxido de hidrogênio e 0,10 Kg de ozônio. O volume de hidrolisado recuperado após o tratamento combinado é de 381 L, e, após o cultivo em hidrolisado tratado, foi estimada a obtenção de 13 Kg de etanol. Em termos econômicos, para o processo combinado foi estimado um custo de processo de USD 34,21/m³ relativo ao volume de hidrolisado submetido ao tratamento. Este está entre um dos maiores custos observados entre os processos avaliados, sendo próximo ao observado para o tratamento com carvão ativado (USD 37,60/m³), e cerca de 3,6 vezes superior ao do hidrolisado não tratado. Apesar do custo por unidade de hidrolisado tratado ser um dos mais elevados, quando comparado o custo por unidade volumétrica de etanol produzido, o processo

combinado Overliming-POAs (USD 2.122,35/m³) apresentou um menor custo comparado aos tratamentos por carvão ativado (USD 17.238,29/m³), Overliming (USD 4.356,93/m³), mas foi superior ao estimado para o hidrolisado não tratado (USD 1.481,23/m³) e para o tratamento por POAs (USD 859,47/m³).

É interessante observar que a perda de volume de hidrolisado em decorrência do tratamento de destoxificação teve um importante impacto sobre o custo por unidade volumétrica de produto obtido. Sendo assim, elevadas porcentagens de recuperação de hidrolisado após o tratamento tem fundamental importância para um processo competitivo. Por exemplo, para os tratamentos POAs e Overliming, ambos atingem uma concentração máxima de etanol durante o cultivo de cerca de 21 Kg/m³, entretanto, o tratamento por Overliming teve uma recuperação de volume de hidrolisado tratado de apenas 30%, resultando em uma quantidade final de etanol obtida de 6 Kg. Já o tratamento por POAs, apresentou uma recuperação próxima a 90% do volume, alcançando 18 Kg de etanol obtido após o cultivo. O processo combinado (Overliming-POAs), dentre todos os processos estudados neste trabalho, foi o que proporcionou alcançar a maior concentração de etanol durante o cultivo, cerca de 34 Kg/m³, entretanto, por ter apresentado uma baixa recuperação do volume de hidrolisado após a primeira etapa do processo (Overliming), cerca de 38%, a quantidade de etanol obtida ao final do cultivo foi de 13 Kg. Quantidade 28% inferior àquela obtida quando tratado apenas por POAs.

Dentre os tratamentos estudados, o tratamento empregando POAs apresentou o menor custo por unidade volumétrica de etanol produzido (USD 859,47/m³), sendo o único que apresentou este custo inferior ao estimado para o processo sem destoxificação (USD 1.481,23/m³). Desta forma, tais resultados evidenciam o potencial competitivo deste processo frente a técnicas mais frequentemente estudadas para esta finalidade, como o uso de carvão ativado e overliming.

Tabela 5.4 - Comparação dos diferentes tipos de tratamentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, quanto a demanda de insumos e ao custo de tratamento, normalizados pelo volume de hidrolisado tratado e pelo volume de etanol produzido na fermentação. Dados referentes ao hidrolisado não tratado são apresentados para fins de comparação.

	Hidrolisado não tratado	Tratamentos de destoxificação do hidrolisado			
		POAs	Overliming	Carvão Ativado	Overliming/POAs (combinado)
Volume inicial de hidrolisado (L)	1000	1000	1000	1000	1000
Insumos empregados nos tratamentos					
Hidróxido de cálcio (kg)	0	0	202	0	202
Hidróxido de sódio (kg)	27	52	0	51	0
Ácido sulfúrico (kg)	0	0	0,7	2	1,3
Carvão ativado (kg)	0	0	0	18	0
Peróxido de hidrogênio (kg)	0	0,09	0	0	0,04
Ozônio (kg)	0	0,24	0	0	0,10
Produção de etanol nos hidrolisados tratados					
Volume de hidrolisado tratado recuperado (L)	950	879	307	520	381
Máxima concentração de etanol no cultivo (kg/m ³)	6	21	21	3	34
Quantidade de etanol obtido (kg)	5	18	6	2	13
Custo operacional referentes aos insumos químicos					
Hidróxido de cálcio (USD)	\$0,00	\$0,00	\$33,64	\$0,00	\$33,64
Hidróxido de sódio (USD)	\$9,54	\$18,51	\$0,00	\$18,19	\$0,00
Ácido sulfúrico (USD)	\$0,00	\$0,00	\$0,14	\$0,35	\$0,28
Carvão ativado (USD)	\$0,00	\$0,00	\$0,00	\$19,06	\$0,00
Peróxido de hidrogênio (USD)	\$0,00	\$0,06	\$0,00	\$0,00	\$0,03
Ozônio (USD)	\$0,00	\$0,62	\$0,00	\$0,00	\$0,27
Custos estimados para cada tratamento					
Custo por volume hidrolisado inicial (USD/m ³)	\$9,54	\$19,29	\$33,77	\$37,60	\$34,21
Custo normalizado por volume de etanol produzido (USD/m ³)	\$1.481,23	\$859,47	\$4.356,93	\$17.238,29	\$2.122,35

Fonte: O Autor:

5.2 Avaliação do emprego de Processos Oxidativos Avançados para destoxificação de hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas

Este capítulo aborda a avaliação do emprego de Processos Oxidativos Avançados (POAs) como método de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar e de borra de café, comparando ainda tais biomassas com os resultados alcançados no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Desta forma, foram abordados neste capítulo a caracterização das biomassas (bagaço de cana-de-açúcar e borra de café) a caracterização de seus hidrolisados quanto aos principais constituintes, o perfil de remoção dos compostos potencialmente inibidores (compostos fenólicos de baixa massa molecular e furanos) durante o tratamento por POAs, assim como os efeitos do tratamento sobre a fermentabilidade dos hidrolisados.

5.2.1 Caracterização do bagaço de cana de açúcar e borra de café.

Observa-se na Tabela 5.5 a caracterização das biomassas de acordo com suas frações de celulose, hemicelulose e lignina. Quanto à fração de celulose, o valor encontrado para o bagaço de cana de açúcar, de 38,14%, está de acordo com a faixa de variação reportada por Rocha et al. (2015), que encontrou teores entre 36,9% e 45,7%. Os referidos autores estudaram a caracterização de bagaço de cana de açúcar de diferentes épocas da colheita, cultivados em diferentes solos, além de variações de clima e diversas variáveis que poderiam influenciar na estrutura química da biomassa. Para a borra de café, a fração de 8,78% está próxima ao reportado no estudo de Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014), em que identificou um teor de 12,40% de celulose na borra de café. É importante lembrar que as diferenças na composição destes materiais podem estar relacionadas a safra do café estudado e ao seu processo de extração (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014).

Para o bagaço de cana de açúcar utilizado neste estudo foi determinado um teor de hemicelulose de o teor de 23,02%. Rocha et al. (2015), reportaram em seu estudo, para o bagaço de cana de açúcar, uma fração de hemicelulose na faixa de 25,6% a 29,6%, valor próximo, mas ligeiramente superior ao encontrado no presente estudo. Entretanto, este valor é muito semelhante ao reportado no estudo de

Candido, Godoy e Gonçalves (2017), no qual identificou o teor de hemicelulose de 23,97% para o bagaço de cana de açúcar. Para a borra de café, o teor de hemicelulose encontrado neste estudo, 39,63%, foi semelhante ao teor identificado por Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014), que reportaram um teor de 39,10% para a fração de hemicelulose presente na borra de café.

Quanto à fração de lignina presente no bagaço de cana de açúcar, no presente estudo foi identificado um teor de 22,2%. Este valor está dentro da faixa de variação reportada no estudo de Rocha *et al.* (2015), que foi de 18,9% a 26,1% de lignina no bagaço de cana de açúcar. Em relação a borra de café, a fração de lignina teve um teor de 27%. Sendo este valor superior ao reportado por Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014), em que foi identificada uma fração de lignina de 23,90%.

Tabela 5.5 - Composição do bagaço de cana de açúcar e da borra de café utilizados comparados com outros trabalhos na literatura.

Componente	Palha de arroz ** (%p/p)	Bagaço de cana (%p/p)	Bagaço de cana (a) (%p/p)	Borra de café (%p/p)	Borra de café (b) (%p/p)
Celulose	30,3	38,14	36,9 – 45,7	8,78	12,40
Hemicelulose	24,6	23,02	25,6 – 29,6	39,63	39,10
<i>Xilanas</i>	21,1				
<i>Arabinanas</i>	3,5				
Lignina total	20,4		18,9 – 26,1		23,90
<i>Lig.insolúvel</i>	19,2	22,22		32,77	
<i>Lig.solúvel</i>	1,2				
Grupos acetil	0,55	3,27		0,26	
Cinzas	10,9	3,45	1,4 – 5,96	1,60	1,30
Extrativos*	13,2				

*Determinado por diferença. (a) Rocha *et al.* 2015; (b) Ballesteros, Teixeira e Mussatto, 2014.

**Dados retirados da tabela 5.1 do presente trabalho.

Fonte: O Autor.

Os teores de cinzas para o bagaço de cana de açúcar (3,45%) e borra de café (1,60%) estão próximos aos mencionados por Rocha et al. (2015) para o bagaço de cana-de-açúcar (entre 1,4% e 5,96%) e por Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014), para a borra de café (1,30%).

De modo geral, ambos os materiais usados no presente estudo, bagaço de cana de açúcar e borra de café, aparentam teores de suas principais frações semelhantes aos reportados na literatura, demonstrando que tais materiais são representativos e, portanto, adequados para a realização deste estudo.

Na Tabela 5.6 são apresentadas as composições dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz, bagaço de cana e borra de café, quanto as suas frações de carboidratos (Xilose, Galactose/Manose, Glicose e Arabinose), ácido acético, furanos (furfural e 5-HMF) e compostos fenólicos de baixa massa molecular. É importante destacar que as composições apresentadas se referem aos hidrolisados já concentrados, ou seja, após serem submetidos ao processo de concentração à vácuo, visando alcanças concentrações de açúcares superiores a 100 g/L. Estes hidrolisados foram então utilizados como modelos na etapa de avaliação dos efeitos do processo de tratamento de destoxificação por POAs sobre hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas. Para o hidrolisado de palha de arroz, foi alcançado um teor de carboidratos totais de 121,8 g/L, tendo uma proporção de 12:3:1 para xilose, arabinose e glicose. Para o hidrolisado de bagaço de cana, obteve-se uma concentração total de açúcares de 114,9 g/L, com uma proporção de 19:2:1 de xilose, arabinose e glicose, respectivamente. No hidrolisado de borra de café, alcançou uma concentração de carboidratos de 123,5 g/L, tendo uma proporção de 21:3:1 de galactose/manose, arabinose e glicose, respectivamente. Para o hidrolisado de borra de café, não foi possível quantificar de forma separada os açúcares manose e galactose (devido a necessidade de colunas cromatográficas específicas e não disponíveis no momento), desta forma, foi quantificado em sua totalidade considerando que sua hemicelulose composta por manose, galactose e arabinanas, sendo as duas primeiras eludias no mesmo tempo de retenção. Segundo Mussatto et al. (2013) os açúcares manose e galactose estão presentes na borra de café em proporções próximas a proporção a 2:3, respectivamente, não sendo identificado nesta biomassa a presença de xilose.

Tabela 5.6 - Composição do hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz, bagaço de cana e borra de café obtidos pelo processo de hidrólise ácida.

Compostos	Hidrolisado de palha de arroz	Hidrolisado de bagaço de cana	Hidrolisado de borra de café
Carboidratos e ácidos alifáticos (g/L)			
Xilose	92,3	97,3	0
Galactose/Manose	0	0	105,2
Glicose	8,1	5,1	4,9
Arabinose	21,4	12,5	13,5
Ácido acético	1,9	5,9	6,3
Furanos (mg/L)			
Furfural	43,4	10,3	37,2
Hidroximetilfurfural	14,7	10,9	68,3
Compostos fenólicos de baixa massa molecular derivados de lignina (mg/L)			
Siringaldeído	494,2	489,8	58,3
Ácido ferúlico	415,9	286,8	24,2
Ácido siríngico	25,8	23,4	n.d.
Vanilina	16,9	18,4	6,4
Ácido vanílico	29,3	61,0	17,8
Ácido furóico	136,4	128,2	244,0
Ácido p-cumárico	36,5	4,1	35,7
Álcool vanilil	210,2	214,3	1735,0
Ácido gálico	19,0	8,8	83,3
Total	1384	1235	2152

Fonte: O Autor.

Além dos açúcares estavam presentes nos hidrolisados quantidades importantes de compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, tais como furanos e compostos fenólicos de baixa massa molecular derivados de lignina (CFBMM). Nos hidrolisado de palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café foram verificadas a presença de furfural (43,4 mg/L, 10,3 mg/L e 37,2 mg/L, respectivamente), hidroximetilfurfural (14,7 mg/L, 10,9 mg/L e 68,3 mg/L, respectivamente) e CFBMM (1384 mg/L, 1235 mg/L e 2152 mg/L, respectivamente). Quanto aos principais compostos derivados de lignina, para o hidrolisado de palha de arroz e de bagaço de cana-de-açúcar, siringaldeído e ácido ferúlico somados, corresponderam a mais de 62% do total de CFBMM. Para o hidrolisado de borra de

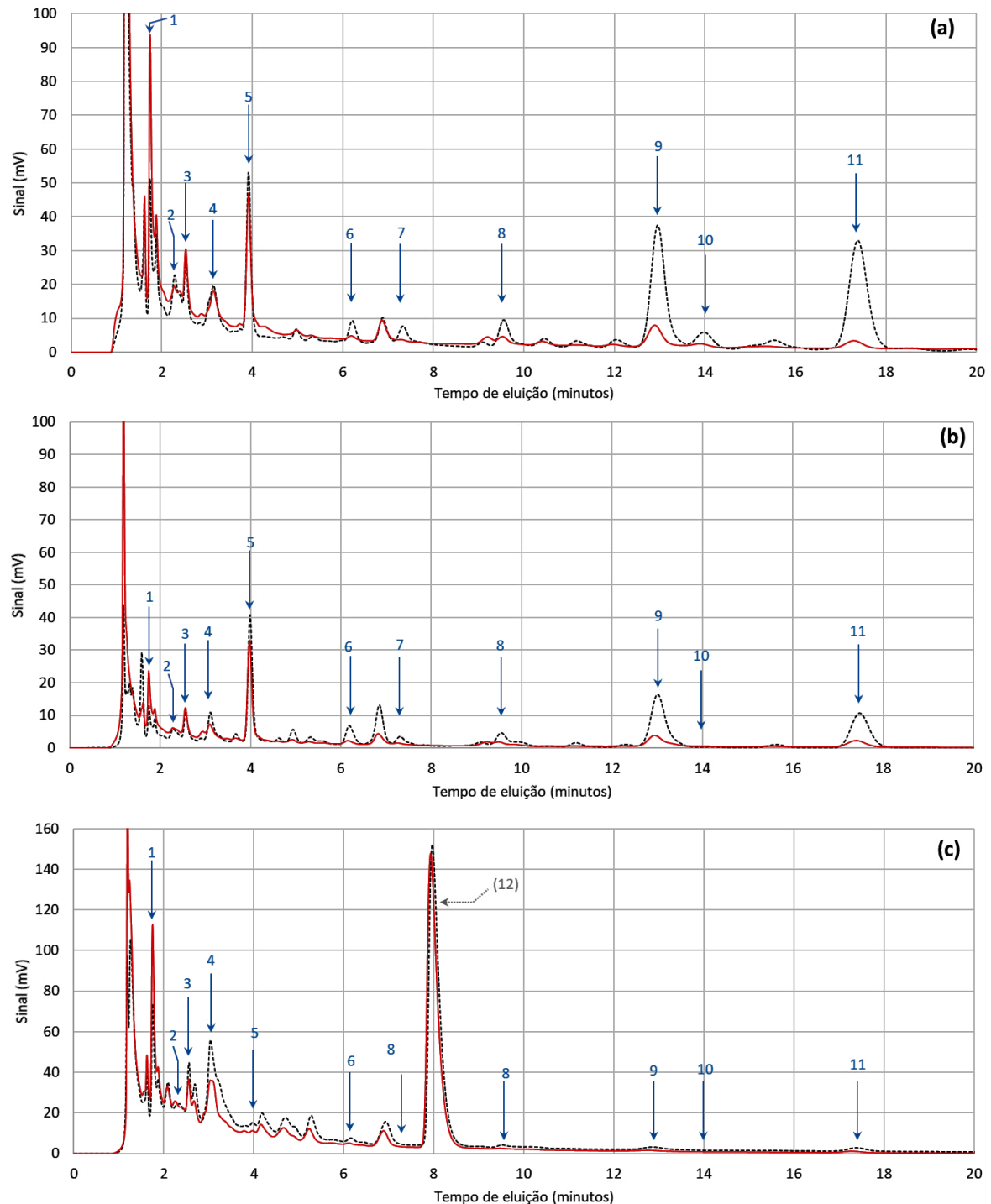
café, álcool vanilil sozinho correspondeu a cerca de 80% dos CFBMM identificados. Considerando a presença de diversos compostos potencialmente inibidores nos hidrolisados das três diferentes biomassas, em quantidades expressivas (cuja soma supera 1200 mg/L), e com composição variadas nas proporções dos compostos, estes hidrolisado foram considerados como modelos para avaliar os efeitos do tratamento por POAs sobre tais compostos, assim como suas consequências no uso dos hidrolisados tratados como substrato em processos de bioconversão microbiana, como apresentado nos tópicos a seguir.

5.2.2 Ação dos POAs sobre a concentração de compostos fenólicos de baixa massa molecular durante os tratamentos de destoxificação

Na Figura 5.10 são apresentados os cromatogramas dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (Figura 5.10.a), bagaço de cana-de-açúcar Figura 5.10.b) e Borra de café (Figura 5.10.c), antes dos tratamentos de destoxificação por POAs (linha preta pontilhada) e após tratados (linha vermelha). De modo geral, verifica-se nesta figura que o tratamento dos diferentes hidrolisados por POAs proporcionou uma redução da concentração de furanos (Figura 5.10, picos referentes à HMF (2) e Furfural (5)) e de praticamente todos os compostos fenólicos de baixa molecular identificados (Figura 5.10, Ácido furóico (3); Álcool vanilil (4); Ácido vanílico (6); Ácido siríngico (7); Vanilina (8); Siringaldeído (9); Ácido p-cumárico (10); Ácido ferúlico (11)), com exceção apenas do Ácido gálico (1). As reduções observadas ocorreram em diferentes graus, dependendo do composto analisado e do tipo de hidrolisado.

Na Figura 5.10.c, foi notada ainda a presença de um pico (identificado na figura com o número 12) que se destaca por corresponder a cerca de 50% da área total dos picos do cromatograma. Apesar de tal composto não ter sido identificado por não corresponder a nenhum dos padrões, tal pico pode ser considerado sugestivo da presença de ácido cafeico, composto comumente encontrados em hidrolisado derivados de borra de café (LIU, Y.; LU; LIU, S.Q., 2021). Verificou-se ainda que o composto referente a este pico (12) não se mostrou suscetível ao tratamento, visto que sua área permaneceu praticamente inalterada.

Figura 5.10 - Cromatogramas da análise de compostos fenólicos de baixa massa molecular por HPLC, dos hidrolisados de palha de arroz (a), bagaço de cana (c) e borra de café (c), tratado por POAs (linha vermelha) e antes de seu tratamento (linha preta pontilhada). As setas azuis apontam os picos dos compostos identificados como: Ácido gálico (1); HMF (2); Ácido furóico (3); Álcool vanilil (4); Furfural (5); Ácido vanílico (6); Ácido siríngico (7); Vanilina (8); Siringaldeído (9); Ácido p-cumárico (10); Ácido ferúlico (11). Enquanto a seta cinza pontilhada (número 12) mostra um pico não confirmado, mas muito provavelmente um indicador da presença de ácido cafeico.



Fonte: O Autor.

Na Tabela 5.7 são apresentados, de forma detalhada, a variação de concentração dos compostos supracitados, decorrentes do tratamento dos hidrolisados. Para os hidrolisados de palha de Arroz e de bagaço de cana-de-açúcar, foram observadas reduções superiores a 70% para ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido p-cumárico e ácido ferúlico. Estes mesmos compostos, referentes aos hidrolisado de borra de café apresentaram reduções próximas a 70%. O tratamento também se mostrou capaz de reduzir a concentração de álcool vanilil dos hidrolisados das diferentes biomassas, sendo neste caso alcançadas reduções da ordem de 38% a 52%. Quanto o ácido furóico, sua concentração foi pouco reduzida nos tratamentos dos hidrolisados de palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar (5% e 8%, respectivamente), porém para o hidrolisado de borra de café a redução na concentração deste composto foi de 52%. Dentre os compostos analisados, o ácido gálico foi o único que apresentou aumentos entre em decorrência do tratamento, para todos os hidrolisados avaliados da ordem de 52% para o hidrolisado de borra de café, e superiores a 90% para os hidrolisados de palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar.

Com relação aos furanos, foram observados comportamentos semelhantes nos hidrolisados de Palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, nos quais as reduções de hidroximetilfurfural (HMF) foram de 49% e 40%, respectivamente, e as de furfural foram de 11% e 20%, respectivamente. Para o hidrolisado de borra de café a redução de ambos os furanos (HMF e furfural) foi da ordem de 60%. É interessante observar ainda os efeitos do tratamento sobre os hidrolisados de palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram maior semelhança entre si, ambos obtidos de espécies vegetais da família das gramíneas. Porém, mesmo o hidrolisado de borra de café tendo origem em um grão de uma dicotiledônea e, portanto, características bastante distintas das outras duas biomassas, o tratamento por POAs se mostrou eficaz na redução da concentração de compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, como furanos e compostos fenólicos de baixa massa molecular.

Tabela 5.7 - Variação das concentrações de compostos fenólicos de baixa massa molecular (CFBMM) e furanos nos hidrolisado de palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café, antes e após tratamento por POAs.

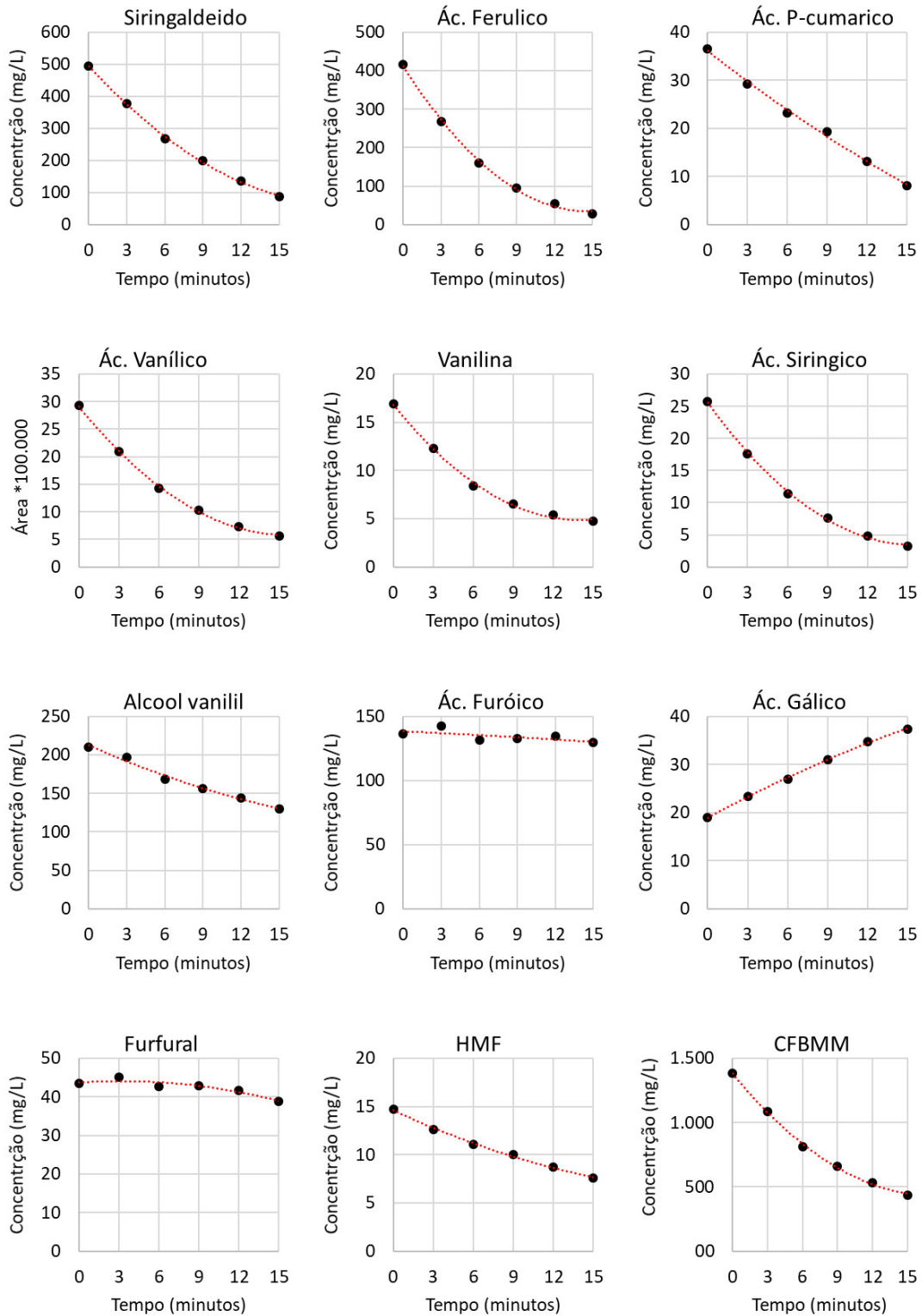
Composto	Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz			Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar			Hidrolisado hemicelulósico de borra de café		
	Concentração (mg/L)		Var. (%)	Concentração (mg/L)		Var. (%)	Concentração (mg/L)		Var. (%)
	Inicial	Final		Inicial	Final		Inicial	Final	
Furanos									
HMF	14,7	7,6	-49%	8,6	5,1	-40%	29,1	11,3	-61%
Furfural	43,4	38,8	-11%	73,6	58,9	-20%	7,5	2,9	-62%
CFBMM									
Ác. Gálico	19,0	37,4	97%	8,8	16,8	91%	54,9	83,3	52%
Ác. Furóico	136,4	129,4	-5%	128,2	118,5	-8%	244,0	124,4	-49%
Álcool vanilil	210,2	130,2	-38%	214,3	103,3	-52%	1735,0	855,2	-51%
Ác. Vanílico	29,3	5,6	-81%	61,0	8,8	-86%	17,8	5,3	-70%
Ác. Siríngico	25,8	3,3	-87%	23,4	5,3	-78%	n.d.	n.d.	-
Vanilina	16,9	4,7	-72%	18,4	4,7	-74%	6,4	1,8	-72%
Siringaldeído	494,2	88,8	-82%	489,8	109,6	-78%	58,3	19,1	-67%
Ác. P-cumárico	36,5	8,1	-78%	4,1	0,0	-100%	n.d.	n.d.	-
Ác. Ferúlico	415,9	29,4	-93%	286,8	46,2	-84%	35,7	11,9	-67%
Total	1384	437	-68%	1235	413	-67%	2152	1101	-49%

n.d. – não detectado. Var. – variação de concentração.

Fonte: O Autor.

Na Figura 5.11 observa-se a variação da concentração dos componentes fenólicos e furanos, durante o tratamento por Processos Oxidativos Avançados do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Componentes fenólicos de baixa massa molecular tais como siringaldeído, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vanilina, ácido siríngico apresentaram reduções constantes ao longo de todo o período de 15 min. de tratamento. Neste grupo foram alcançadas reduções de concentrações superiores a 72% ao fim do tratamento, sendo este grupo o que apresentou a maior redução proporcional dentre os compostos avaliados. O álcool vanilil e o HMF também apresentaram reduções de concentração durante todo o período de tratamento, porém, de forma menos acentuada, alcançando reduções entre 38% e 48%. Não foram observadas variações relevantes de concentração para ácido furóico e furfural, os quais apresentaram reduções entre 5% e 11%. E o ácido gálico foi o único composto que apresentou um aumento, elevando sua concentração em cerca de 97%. De modo geral, foi notada uma redução próxima a 70% para a concentração total de compostos fenólicos de baixa massa molecular (CFBMM), a qual foi constante durante o período de tratamento.

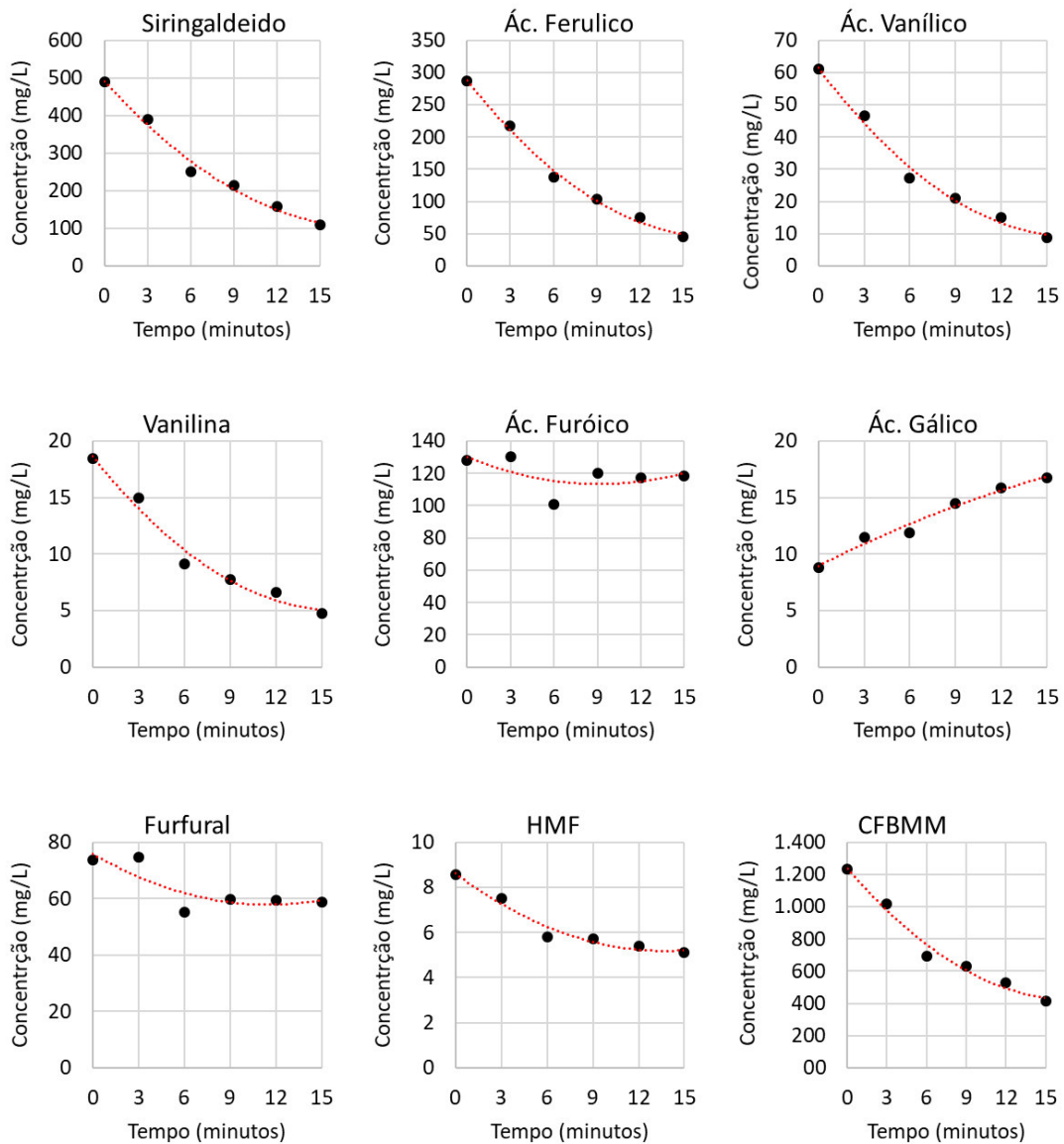
Figura 5.11 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.



Fonte: O Autor.

Na Figura 5.12 verifica-se a degradação dos compostos fenólicos durante o tratamento por Processos Oxidativos Avançados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. No tratamento deste hidrolisado foram observados comportamentos semelhantes ao observado para o hidrolisado de palha de arroz. Apresentaram reduções constantes ao longo de todo o período de 15 min. de tratamento os compostos: siringaldeído, ácido ferúlico, ácido vanílico e vanilina. Neste grupo foram alcançadas reduções de concentrações superiores a 74% ao fim do tratamento, sendo este grupo o que apresentou a maior redução proporcional dentre os compostos avaliados. O HMF também apresentou reduções de concentração durante todo o período de tratamento, porém, de forma menos acentuada, alcançando redução de apenas 40%. Não foram observadas variações relevantes de concentração para ácido furóico e furfural, os quais apresentaram reduções entre 8% e 20%. E o ácido gálico foi o único composto que apresentou um aumento, elevando sua concentração em cerca de 91%. De modo geral, foi notada uma redução de 67% para a concentração total de compostos fenólicos de baixa massa molecular (CFBMM), a qual foi constante durante o período de tratamento, resultado muito semelhante ao observado para o hidrolisado de palha de arroz (68%).

Figura 5.12 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

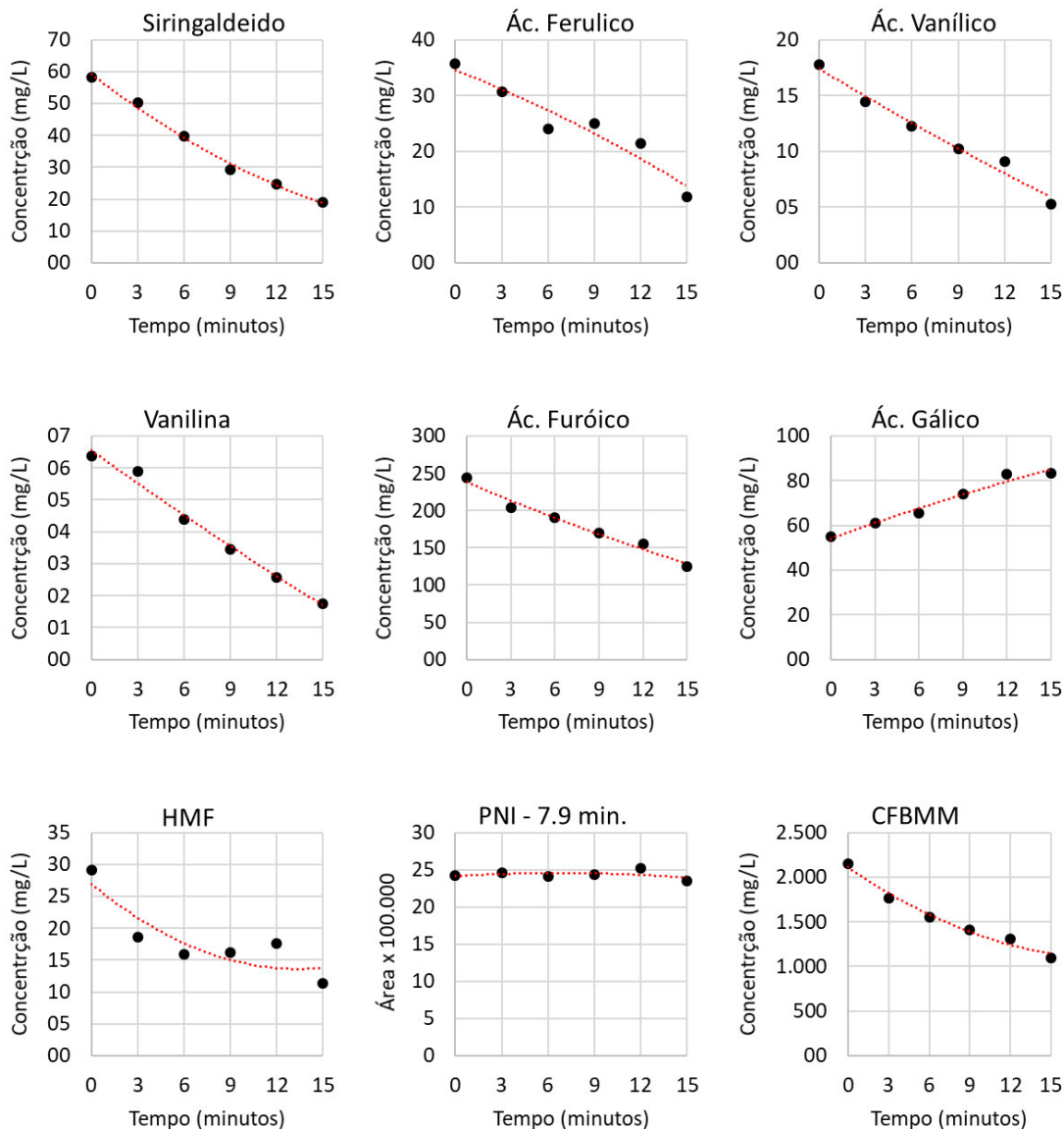


Fonte: O Autor.

Na Figura 5.13 é apresentada a cinética da decomposição dos componentes fenólicos durante o tratamento por Processos Oxidativos Avançados no hidrolisado hemicelulósico de borra de café. Observa-se que o álcool vanilil, que apresentava a maior concentração neste hidrolisado (1735 mg/L), teve uma redução de 51% ao fim do tratamento. Redução semelhante foi observada também para o ácido furóico (cerca de 50%). O siringaldeído, vanilina, ácido vanílico e ácido ferúlico apresentaram reduções próximas a redução de 70%, ao final do tratamento. E foi percebido um aumento da concentração de ácido gálico, resultado este semelhante

ao observado para os demais hidrolisados, de palha de arroz e de bagaço de cana-de-açúcar. Quanto aos furanos, furfural e HMF tiveram suas concentrações reduzidas em cerca de 60%. Foi observado ainda um pico não identificado no tempo de eluição 7,9 minutos (Figura 13, PNI -7,9 min.), o qual não teve variação durante o período de tratamento. Mesmo não sendo identificado, este pico poder ser considerado sugestivo da presença de ácido cafeico, composto comumente encontrados em hidrolisado derivados de borra de café (LIU, Y.; LU; LIU, S.Q., 2021).

Figura 5.13 - Cinética da degradação dos fenólicos no tratamento de destoxificação por Processos Oxidativos Avançados em hidrolisado hemicelulósico de borra de café.



Fonte: O Autor.

É possível observar que todos os hidrolisados hemicelulósicos avaliados apresentaram significativas reduções nas concentrações de compostos potencialmente inibidores, como furanos e fenólicos de baixa massa molecular, após o tratamento por Processos Oxidativos Avançados. Estes resultados são importantes por demonstrarem que os POAs possuem aplicabilidade a hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas, sendo capazes de reduzir de forma significativa a concentração de compostos potencialmente inibidores, e preservando a o teor de açúcares nos hidrolisados, assim como assegurando a recuperação próxima a totalidade do volume de hidrolisado submetidos ao tratamento. Além dos efeitos sobre a concentração dos compostos aqui avaliados, é importante lembrar ainda que o ponto fundamental de todo tratamento de destoxificação refere-se às melhorias percebidas durante o cultivo de microrganismos em hidrolisados tratados. Ponto este abordado no tópico seguinte.

5.2.3 Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados após tratamento por POAs

Na Figura 5.14 são apresentados o crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol para os cultivos da Levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado por POAs comparado ao cultivo em hidrolisado não tratado. Os cultivos foram realizados em hidrolisados com concentração inicial de açúcares totais de aproximadamente 100 g/L (6 g/L de glicose, 80 g/L xilose e 14 g/L de arabinose).

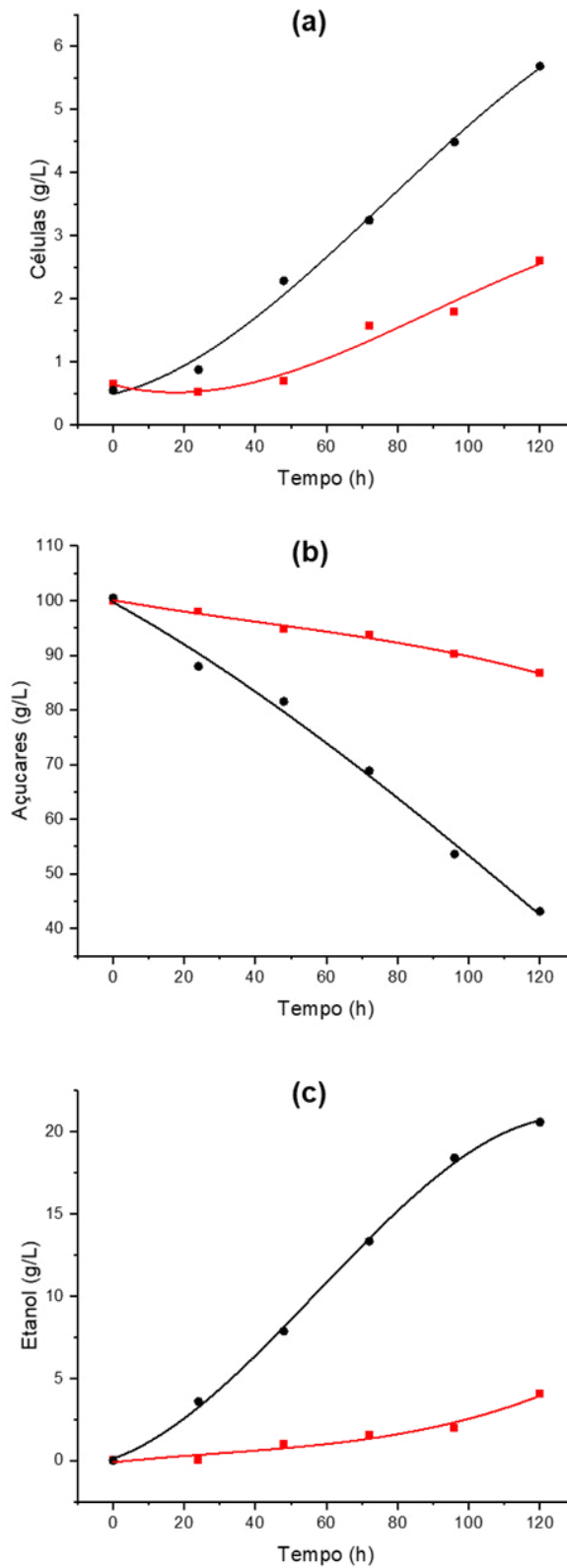
Na Figura 5.14.a estão apresentados os perfis de crescimento celular da levedura em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado e tratado por POAs. Verifica-se que em ambos os hidrolisados, a levedura foi capaz de crescer, tendo um aumento gradual da concentração celular ao longo do período de 120 h. Verifica-se ainda que em hidrolisado tratado a levedura alcançou uma concentração celular de 5,7 g/L ao final das 120 horas de cultivo, e que neste mesmo tempo, em hidrolisado não tratado, a concentração celular foi de 2,6 g/L, ou seja, o tratamento possibilitou um crescimento quase duas vezes superior em relação ao hidrolisado não tratado.

Com relação ao consumo de açúcares (Figura 5.14.b), foi observado um comportamento análogo ao crescimento celular, em que o tratamento possibilitou

uma maior assimilação de substrato pela levedura. Observa-se que houve consumo de açúcares ao longo das 120 horas de cultivo em ambos os hidrolisados (não tratado e tratado por POAs), porém este consumo foi mais acentuado em hidrolisado tratado. Em hidrolisado não tratado, a levedura foi capaz de consumir cerca de 13% (13 g/L) dos açúcares iniciais ao fim das 120 horas de cultivo. Neste mesmo período, quando em hidrolisado tratado, a levedura consumiu cerca de 57% (57 g/L) dos açúcares, o que demonstra que o tratamento possibilitou a levedura alcançar um consumo de açúcares de cerca de 4,4 vezes superior ao observado no hidrolisado não tratado.

Na Figura 5.14.c é apresentada a produção de etanol durante os cultivos da levedura em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado e não tratado. Quando em hidrolisado não tratado, a levedura alcançou uma máxima concentração de etanol de 4 g/L ao fim das 120 h. Neste mesmo período, quando em hidrolisado tratado por POAs, a levedura foi capaz de alcançar uma concentração de etanol de 21 g/L, ou seja, cerca de 5 vezes maior a obtida em hidrolisado não tratado. O coeficiente de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) também apresentou um aumento discreto em decorrência do tratamento de hidrolisado, passando de 0,31 g/g no cultivo em hidrolisado não tratado, para 0,37 g/g quando em hidrolisado tratado.

Figura 5.14 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (■).



Fonte: O Autor.

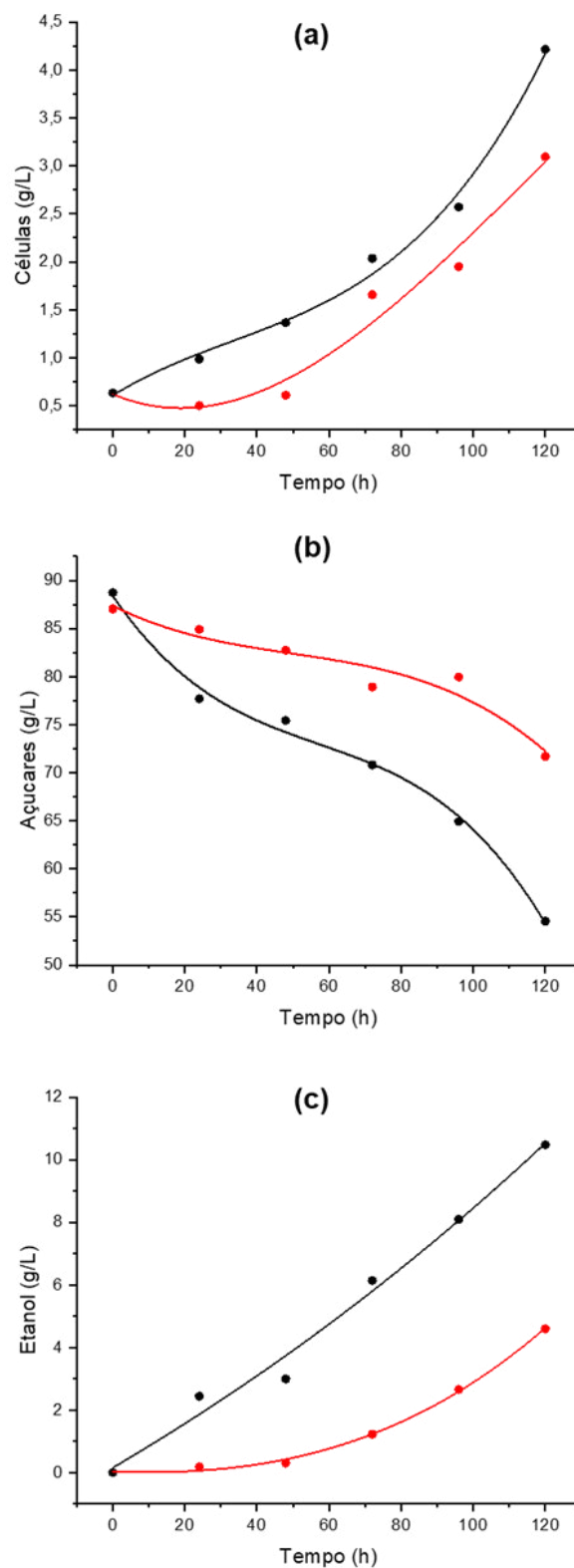
Na Figura 5.15 observa-se o crescimento celular, o consumo de açúcares e a produção de etanol durante o cultivo da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar não tratado e tratado por Processos Oxidativos Avançados. Verifica-se na Figura 5.15.a que a levedura foi capaz de crescer em ambos os hidrolisados, tratado ou não. Em hidrolisado não tratado foi observada uma fase de latência nas primeiras 48 h, nas quais o crescimento celular foi desprezível. Após este período a levedura apresentou um crescimento constante até o tempo final de 120h, alcançando neste momento uma concentração de 3,1 g/L. Quando cultivada em hidrolisado tratado, verificou-se um crescimento constante durante todo o período de 120 h de cultivo, alcançando ao final uma concentração celular de 4,2 g/L. Estes resultados demonstram que o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar possibilitou um maior crescimento da levedura, além de ter eliminado a fase de latência. Tais resultados demonstram que o tratamento promoveu uma clara redução da inibição causada à levedura por compostos presentes no hidrolisado.

Na Figura 5.15.b é apresentado o consumo de açúcares totais (glicose, xilose e arabinose) pela levedura ao longo do cultivo em presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado. Verifica-se que a levedura foi capaz de consumir os açúcares presentes em ambos os hidrolisados, porém o consumo foi ligeiramente maior em hidrolisado tratado. Após 120 horas de cultivo em hidrolisado não tratado, a levedura consumiu 15,4 g/L, o que representa cerca de 18% do substrato disponível. Neste mesmo período de cultivo, em hidrolisado tratado por POAs, a levedura consumiu 34,2 g/L, ou seja cerca de 40% do substrato, alcançando um consumo até duas vezes maior em relação ao cultivo em hidrolisado não tratado.

Em relação à produção de etanol (Figura 5.15.c), verificou-se que a levedura apresentou um acúmulo máximo de 10,5 g/L em 120 h de cultivo. O que representa uma concentração cerca de 2,3 vezes superior àquela alcançada em hidrolisado não tratado neste mesmo período (4,6 g/L).

Os resultados encontrados para os ensaios de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar corroboram com os encontrados para a palha de arroz, demonstrando que o uso de POAs como método de destoxificação pode ser estendido com sucesso a outros tipos de hidrolisados.

Figura 5.15 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (●).

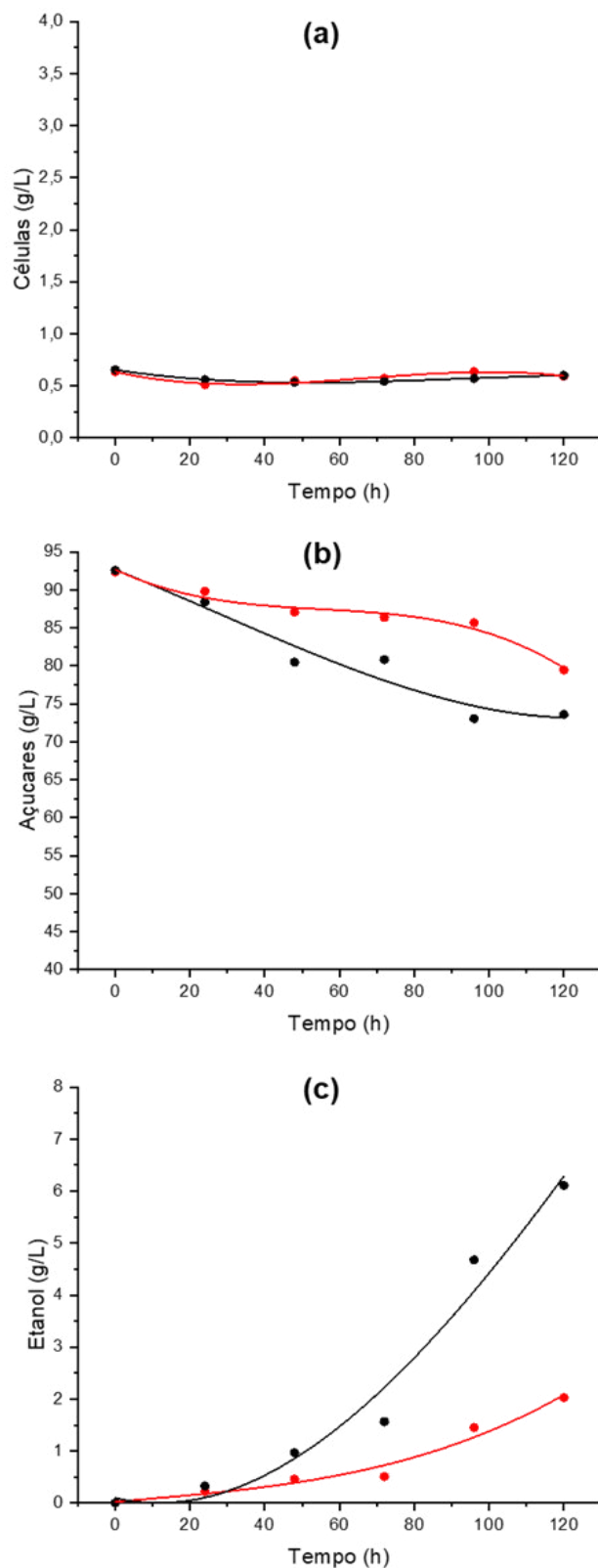


Fonte: O Autor.

Na Figura 5.16 é observado o crescimento celular, o consumo de açúcares totais (glicose, xilose e arabinose), e a produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico de borra de café não tratado e tratado por Processos Oxidativos Avançados (POAs). A concentração celular da levedura permaneceu praticamente inalterada durante todo o período de 120 h de cultivo em ambos os hidrolisados, tratado e não tratado (Figura 5.16.a). Tal resultado demonstra que a toxicidade remanescente no hidrolisado após o tratamento permaneceu em níveis ainda bastante inibitórios ao metabolismo da levedura. De fato, quando se observa as reduções de compostos fenólicos (Tabela 5.7) verifica-se que o hidrolisado de borra de café foi aquele em que o tratamento por POAs proporcionou menores efeitos sobre a redução destes compostos. Esta menor redução pode estar ligada a uma maior quantidade de compostos antioxidantes presentes neste hidrolisado, os quais teriam importante competição pelos radicais hidroxila com os compostos fenólicos derivados de lignina. Outro ponto que merece ser destacado, refere-se à presença de quantidades expressivas de compostos não identificados (Figura 5.10), inclusive com picos nos cromatogramas sugestivos da presença de ácido cafeico, composto esse comumente presente em importantes quantidades em hidrolisados de borra de café (LIU, Y.; LU; LIU, S.Q., 2021).

Nos cultivos em hidrolisado de borra de café foram notados discretos aumentos do consumo de açúcares (Figura 5.16.b) e da produção de etanol (Figura 5.16.c) em cultivos realizados em hidrolisado tratado, em comparação ao não tratado. Embora, as melhorias observadas tenham sido menos expressivas que às observadas para o tratamento dos hidrolisados de palha de arroz e de bagaço de cana-de-açúcar. Quando cultivada em hidrolisado de borra de café não tratado, a levedura foi capaz de consumir cerca de 13 g/L de substrato (cerca de 14% dos açúcares disponíveis) em 120 h. Já em hidrolisado tratado, neste mesmo tempo de cultivo o consumo foi ligeiramente maior, sendo assimilado cerca de 19 g/L de substrato, ou seja, cerca de 20% do total disponível. Porém, mesmo este discreto aumento no consumo de açúcares proporcionou um aumento na produção de etanol de cerca de três vezes, passando de 2,0 g/L em 120 h de cultivo em hidrolisado não tratado, para 6,1 g/L em hidrolisado tratado, neste mesmo período. Embora o tratamento por POAs tenha proporcionado um discreto benefício, é importante destacar que estes resultados demonstram o potencial que o processo possui para

Figura 5.16 - Consumo de açúcares (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c), durante o cultivo por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de borra de café não tratado (●) e tratado por Processos Oxidativos Avançados (●).



Fonte: O Autor.

tal aplicação, visto que tais melhorias foram alcançadas empregando-se condições de processo otimizadas para outro hidrolisado (hidrolisado de palha de arroz). Desta forma, é possível supor que, o desenvolvimento de estudos de otimização específicos para outros tipos de hidrolisados, como o de borra de café ou de bagaço de cana-de-açúcar, poderiam proporcionar reduções de toxicidade e melhores resultados para cultivos em hidrolisados tratados.

De modo geral, os resultados apresentados neste estudo demonstram que os POAs podem ser aplicados de forma eficaz como método de destoxificação de hidrolisados de diferentes biomassas lignocelulósicas, devido a sua capacidade de reduzir a concentração de compostos inibidores derivados de lignina e compostos furanos, e promovendo importantes melhoras na etapa subsequente de bioconversão por microrganismos dos açúcares presentes nos hidrolisados tratados. Além disso, os POAs demonstraram características vantajosas para sua aplicação, como seletividade em reduzir a concentração de compostos inibidores sem afetar a concentração de açúcares, menor custo e maior recuperação volumétrica de hidrolisado tratado, quando comparado a outros métodos de destoxificação.

6 CONCLUSÕES

A caracterização da palha de arroz utilizada neste estudo permitiu identificar cerca de 87% dos compostos (polissacarídeos, lignina e compostos inorgânicos) presentes na biomassa, sendo a fração restante considerada como extrativos. Verificou-se também que os teores de suas principais frações (celulose, hemicelulose e lignina) estão de acordo com os relatados na literatura e, desta forma, a palha de arroz pode ser considerada representativa para o desenvolvimento do estudo com tal biomassa.

No processo de hidrólise da palha de arroz foi alcançada uma recuperação de 77% dos açúcares da hemicelulose, mesmo com um baixo fator de severidade. Além dos açúcares, o hidrolisado apresentou em sua constituição compostos potencialmente inibidores do metabolismo microbiano, tais como ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos.

A concentração do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz proporcionou um aumento de cerca de oito vezes no teor de açúcares. Já com relação aos demais compostos quantificados (como ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos) foram verificados aumentos de concentração inferiores ao fator de concentração utilizado, o que está ligado à provável remoção de tais compostos por volatilização durante a etapa de concentração.

Na avaliação da tolerância da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y-7124 aos compostos potencialmente inibidores presentes no HHPAC, verificou-se que a levedura apresentou crescimento quando cultivada em meios compostos com hidrolisado contendo concentrações de açúcares totais de 52 e 77 g/L, entretanto, para concentrações de açúcares totais iguais ou superiores a 103 g/L, não houve um crescimento celular relevante, demonstrando um efeito inibitório, possivelmente decorrente de compostos presentes no hidrolisado, tais como ácido acético, furanos e fenólicos de baixa massa molecular.

Em relação à avaliação dos tratamentos de destoxificação, todos os processos avaliados (POAs, Overliming, Adsorção em carvão ativado e Tratamento combinado Overliming-POAs) proporcionaram reduções de concentração dos compostos potencialmente inibidores. Os tratamentos do hidrolisado por POAs, Overliming e processo combinado (Overliming-POAs), proporcionaram principalmente a redução da concentração de compostos derivados de lignina

(reduções superiores a 95% para compostos como ácido ferúlico, siringaldeído, álcool vanilil e ácido furóico). Estes tratamentos também foram capazes de remover furanos, porém com menor eficiência (reduções entre 57% e 75%). Já o tratamento por carvão ativado proporcionou as maiores reduções de furanos (entre 80% e 94%). Todos os tratamentos apresentaram baixa eficiência na remoção de ácido acético, não ultrapassando 23% de redução.

Na comparação dos diferentes processos de destoxificação do hidrolisado, verificou-se que o tratamento por POAs foi o que proporcionou a maior recuperação de volume de hidrolisado destoxificado, além de permitir a manutenção da concentração dos açúcares, sendo esta, importante vantagem frente aos demais tratamentos avaliados.

Quanto à fermentabilidade dos hidrolisados tratados, verificou-se que o processo combinado (Overliming-POAs), assim como emprego de POAs ou Overliming de forma isolada, proporcionaram importantes melhorias na etapa subsequente de bioconversão dos açúcares em etanol por *S. stipitis*, em comparação ao hidrolisado não destoxificado. Dentre estes métodos de destoxificação, o processo combinado se destacou dos demais como o mais eficaz na melhoria da etapa de bioconversão. Entretanto, na comparação dos processos em termos de custo operacional, verificou-se que os processos POAs se mostraram mais vantajosos economicamente em relação aos demais cenários avaliados, tendo o menor custo por unidade volumétrica de etanol produzido.

Na avaliação do emprego de POAs para destoxificação de hidrolisados de diferentes biomassas (palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café), verificou-se que este método foi capaz de proporcionar a redução da concentração de compostos inibidores, promovendo melhorias nas etapas subsequentes de bioconversão dos açúcares de hidrolisados após tratamento de destoxificação, demonstrando assim que os POAs podem ser aplicados com eficácia para a destoxificação de diferentes hidrolisados, evidenciando seu potencial para ampla aplicação.

De modo geral este estudo demonstra que o método de destoxificação de hidrolisados por POAs pode ser considerado eficaz, e economicamente vantajoso para aplicação em processos de bioconversão.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.; MATHEW, A.K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Potential of rice straw for bio-refining: An overview. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 29-36, 2016.
- ACHINAS, S.; EUVERINK, G.J.W. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 44-53, 2016.
- AHMED, B.; MOHAMED, H.; LIMEM, E.; BENSALAH, N. Degradation and mineralization of organic pollutants contained in actual pulp and paper mill wastewaters by a UV/H₂O₂ process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3370–3379, 2009.
- ALI BABA. Calcium hydroxide price. Disponível em: https://www.alibaba.com/premium/calcium_hydroxide_price.html?src=sem_ggl&field=UG&from=sem_ggl&cmpgn=2069068969&adgrp=80166501. Acesso em: 24 nov. 2022.
- ALI BABA. Sodium hydroxide price. Disponível em: <https://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CatId=&tab=all&SearchText=sodium+hydroxide+price&isPremium=y&secondFlag=true>. Acesso em: 01 out. 2022.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163 – 173, 2014.
- AOCS. **American Oil Chemists' Society Official Methods and Recommended Practices of AOCS**. 5th ed. AOCS Press, 2004. 1200p.
- ASGHAR, A.; RAMAN, A.A.A.; DAUD, W.M.A.W. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 826-838, 2015.
- BADIEI, M.; ASIM, N.; JAHIM, J.M.; SOPIAN, K. Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. **APCBEE Procedia**, v. 9, p. 170 – 174, 2014.
- BALLESTEROS, L.F.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATTO, S.I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 3493-3503, 2014.
- BARRETO-RODRIGUES, M.; SOUZA, J.V.B; SILVA, E.S.; SILVA, F.T.; PAIVA, C.B. Combined photocatalytic and fungal processes for the treatment of nitrocellulose industry wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1569–1573, 2009.
- BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZALES-BENITO, G.; GARCIA-CUBERO, M.T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment

on ethanol fermentation by *Pichia stipites*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10868-10874, 2011.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4767–4774, 2010.

BJORSVIK, H.R.; MINISCI, F. Fine chemicals from lignosulfonates. 1. Synthesis of vanillin by oxidation of lignosulfonates. **Organic Process Research & Development.**, v.5, p. 330-340, 1999.

CANDIDO, R.G.; GODOY, G.G.; GONÇALVES, A.R. Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 280-289, 2017.

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

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; LOPES, S.; PARAJÓ, J.C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1215-1223, 2005.

CASTRO, R.C.A.; FONSECA, B.G.; SANTOS, H.T.L.; FERREIRA, I.S.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alkalline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicelluloses and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 65-73, 2017.

CATALKAYA, E.C.; KARGI, F. Advanced oxidation treatment of pulp mill effluent for TOC and toxicity removals. **Journal of Environmental Management**, v. 87, p. 396–404, 2008.

CAVKA, A.; JÖNSSON, L.J. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 368-376, 2013.

CHAMARRO, E.; MARCO, A., ESPLUGAS, S. Use of Fenton reagent to improve organic chemical biodegradability. **Water Research**, v. 35, n. 4, p. 1047-1051, 2001.

CHANDEL, A.K.; DA SILVA, S.S.; SINGH, O.V. Destoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. **Bioenergy Research**, v. 6, p.388-401, 2013.

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

CHEN, J.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; JI, X.; ZHANG, L.; MI, X.; HUANG, H. Removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 680-683, 2013.

CHEN, W.; PEN, B.; YU, C.; HWANG, W. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2916 – 2924, 2011.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1412-1421, 2010.

CLARK, J.H.; DESWARTE, F. **Introduction to Chemicals from Biomass**. 2nd ed. UK. John Wiley & Sons, 2015.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 10 - Safra 2022/23 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-77, out. 2022.

CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZ, A.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, p. 189 – 202, 2012.

COZ, A.; LLANO, T.; CIFRIÁN, E.; VIGURI, J.; MAICAN, E.; SIXTA, H. Physico-chemical alternatives in lignocellulosic materials in relation to the kind of component for fermenting purposes. **Materials**, v. 9, n. 574, 2016.

CUNHA, J.T.; ROMANÍ, A.; COSTA, C.E.; SÁ-CORREIA, I.; DOMINGUES, L. Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 159-175, 2019.

FARIAS, D.; ANDRADE, R.R.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipites* from Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 361-379, 2014.

FAYET, A.; TEIXEIRA, A.R.S.; ALLAIS, F.; BOUIX, M.; LAMELOISE, M. Detoxification of highly acidic hemicellulosic hydrolysate from wheat straw by diananofiltration with a focus on phenolic compounds. **Journal of Membrane Science**, v. 566, p. 112-121, 2018.

FONSECA, B.G.; PUENTES, J.G.; MATEO, S.; SANCHÉZ, S.; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C. Detoxification of Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates Employing *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on the Ethanol Production by *Pichia stipitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 9658-9665, 2013.

FONSECA, B.G.; MATEO, S.; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C. Biotreatment optimization of rice straw hydrolysates for ethanolic fermentation with *Scheffersomyces stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 19-28, 2018.

FREIRE, R.S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

GERNJAK, W.; KRUTZLER, T.; GLASER, A.; MALATO, S.; CACERES, J.; BAUER, R.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. **Chemosphere**, v. 50, p. 71–78, 2003.

GHATAK, H.R. Advanced oxidation processes for the treatment of biorecalcitrant organics in wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1167-1219, 2014.

GUIMARÃES, J. R.; ALMEIDA JUNIOR, R. L.; MANIERO, M. G.; FADINI, P. S. Ozonização em meio básico para redução de cor do licor negro de indústria de celulose de algodão. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 1, p. 93-98, 2010.

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

GULLÓN, P.; ROMANÍ, A.; VILA, C.; GARROTE, G.; PARAJO, J.C. Potential of hydrothermal treatments in lignocellulose biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, p. 219-232, 2012.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, 2015.

HERMOSILLA, D.; MERAYO, N.; GASCÓ, A.; BLANCO, Á. The application of advanced oxidation technologies to the treatment of effluents from the pulp and paper industry: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 168-191, 2015.

HOU, J.; DING, C; QIU, Z.; ZHANG, Q.; XIANG, W. Inhibition efficiency evaluation of lignocellulose-derived compounds for bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 1107-1114, 2017.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **Bioenergy Research**, v. 5, p. 1043-1066, 2012.

HUANG, H.; YUAN, X.; ZHU, H.; LI, H.; LIU, Y.; WANG, X.; ZENG, G. Comparative studies of thermochemical liquefaction characteristics of microalgae, lignocellulosic biomass and sewage sludge. **Energy**, v. 56, p. 52 – 60, 2013.

IGC. International Grains Council. Grain Market Report. Disponível em: https://www.igc.int/en/gmr_summary.aspx#. Acesso em: 07 out. 2019.

IRICK, T.J.; WEST, K.; BROWNELL, H.H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J.N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood – Scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 137-149, 1988.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v.37, p. 93-99, 2012.

JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KO, J.K.; UM, Y.; PARK, Y. -C.; SEO, J.-H.; KIM, K.H. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose (Review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 4201-4212, 2015.

KOBAYASHI, H.; FUKUOKA, A. Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**, v. 15, p. 1740 – 1763, 2013.

KSHIRSAGAR, S.D.; WAGHMARE, P.R.; LONI, P.C.; PATIL, S.A.; GOVINDWAR, S.P. Dilute acid pretreatment of rice straw, structural characterization and optimization of enzymatic hydrolysis conditions by response surface methodology. **RSC Advances**, v. 5, p. 46525-46533, 2015.

KUMARI, D.; SINGH, R. Ultrasonic assisted petha waste water pretreatment of rice straw for optimum production of methane and ethanol using mixed microbial culture. **Renewable Energy**, v. 145, p.682-690, 2020.

KUMARI, D.; SINGH, R. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.90, p. 877-891, 2018.

LANZALUNGA, O.; BIETTI, M. Photo- and radiation chemical induced degradation of lignin model Compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 56, p. 85–108, 2000.

LEE, J.-W.; JEFFRIES, T.W. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5884-5890, 2011.

LEE, J.Y.; RYU, H.J.; OH, K.K. Acid-catalyzed hydrothermal severity on the fractionation of agricultural residues for xylose-rich hydrolyzates. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 84-90, 2013.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical Processes for Water Treatment, **Chemical Reviews**, v. 93, p. 671-698, 1993.

LI, Y.; CHE, D.; YANG, C.; YAO, M.; ZHAO, T.; FU, K.; ZHAO, H. Engineering practice and economic analysis of ozone oxidation wet denitrification technology. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 401-408, 2021.

LIM, J.S.; MANAN, Z.A.; ALWI, S.R.; HASHIM, H. A review on utilization of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084 – 3094, 2012.

LIN, T.-H.; GUO, G.-L.; HWANG, W.-S.; HUANG, S.-L. The addition of hydrolyzed rice straw in xylose fermentation by *Pichia stipitis* to increase bioethanol production at the pilot-scale. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 204-209, 2016.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

LIU, Y.; LU, Y.; LIU, S.Q. The potential of spent coffee grounds hydrolysates fermented with *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia kluyveri* for developing an alcoholic beverage: The yeasts growth and chemical compounds modulation by yeast extracts. **Current Research in Food Science**, v.4, p. 489-498, 2021.

MADE-IN-CHINA. Sulfuric acid price. Disponível em: https://www.made-in-china.com/products-search/hot-china-products/sulfuric_acid_price.html. Acesso em: 01 out. 2022.

MADE-IN-CHINA. Hydrogen peroxide 50% price. Disponível em: https://www.made-in-china.com/multi-search/hydrogen%2Bperoxide%2B50%2525%2Bprice/F1--CD_Oxide-Catalog/1.html. Acesso em: 24 nov. 2022.

MATEO, S.; ROBERTO, I.C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A.J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196-203, 2013.

MENANDRO, L.M.S.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H.C.J.; KÖLLON, O.T.; PIMENTA, M.T.B.; SANCHES, G.M.; RABELO, S.C.; CARVALHO, J.L.N. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 11, p. 488-504, 2017.

MENON, V. RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522 – 550, 2012.

MERIÇ, S.; KAPTAN, D.; OLMEZ, T. Color and COD removal wastewater containing Reactive Black 5 using Fenton's oxidation process. **Chemosphere**, v. 54, p. 435-441, 2004.

MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; MOHAMMAD, J.T. 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.

MILLS, T.Y.; SANDOVAL, N.R.; GILL, R.T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, n. 26, 2009.

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

MOHANTY, B.; ABDULLAHI, I.I. Bioethanol production from lignocellulosic waste – A review, **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, p. 1153-1161, 2016.

MONIZ, P.; DUARTE, L.C.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Rice straw hemicelluloses: Fractionation processes and potential added-value products. *In*:

TIMAYEV, A.; KADYROV, G. **Rice and Rice straw: Production, Cultivation and Uses**. New York: Nova Science Publishers. p. 55-88, 2017.

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

MUSSATTO, S.I.; CARNEIRO, L.M.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 368-374, 2011.

NASCIMENTO, R.F.; SOUSA NETO, V.O.; MELO, D.Q.; SOUSA, F.W.; CAVALCANTE, R.M. **Uso de bioadsorventes lignocelulósicos na remoção de poluentes de efluentes aquosos**. 274 p. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19569>. Acesso em: 04 out. 2019.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NOGUEIRA, R. F. P.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R. A.; VILLA, R. D.; OLIVEIRA, M. C. O. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 400-408, 2007.

PACHECO, J.R.; PERALTA-ZAMORA, P.G. Integration of physical chemistry and advanced oxidative processes for remediation of landfill leachate. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 306-311, 2004.

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

PARAWIRA, W; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 20-31, 2011.

PAULY, M., KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant Journal**, v. 54, p. 559–568, 2008.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R.-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 879-903, 2012.

PENG, P.; BIAN, J.; SUN, R.-C. Extractives. **Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels**, Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 49-72.

PEREZ, M. H.; PEÑUELA, G.; MALDONADO, M. I.; MALATO, O.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P.; OLLER, I.; GERNJAK, W.; MALATO, S. Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes, **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 64, p. 272–281, 2006.

PETRIDIS, L.; SMITH, J.C. Molecular-level driving forces in lignocellulosic biomass deconstruction for bioenergy. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, p. 382-389, 2018.

PORTJANSKAJA, E.; PREIS, S. Aqueous Photocatalytic Oxidation of Lignin: The Influence of Mineral Admixtures International. **Journal of Photoenergy**, v. 2007, p. 1-7, 2007.

RAMOS, W. L. S.; POZNYAK, T.; CHAIREZ, I.; CORDOVA, R. I. Remediation of lignin and its derivatives from pulp and paper industry wastewater by the combination of chemical precipitation and ozonation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 428-434, 2009.

REIS, C.E.R.; CARVALHO, A.K.F.; BENTO, H.B.S.; ALVES, T.M.; CASTRO, H.F. Lowering the inhibition of sugarcane vinasse as a culture medium for oleaginous fungi through oxidative pre-treatment aiming at the degradation of toxic compounds. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, p. 2943-2950, 2020.

REKHATE, C.V.; SRIVASTAVA, J.K. Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater – A review. **Chemical Engineering Journal Advances**, v. 3, 2020.

RICO, A.; RENCORET, J.; DEL RÍO, J.C.; MARTÍNEZ, A.T.; GUTIÉRREZ, A. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology and Biofuels**, v. 7, n. 6, 2014.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.

ROBERTO, I.C.; CARNEIRO, L. M; SILVA, J. P. A. "PROCESSO DE DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADOS DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS", Patente. Instituição de registro: **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.**, Número do registro: **PI11038217**. Depósito: 10/08/2011; Concessão: 02/02/2021

ROCHA, G.J.M. Deslignificação de Bagaço de Cana-de-açúcar. Assistida por Oxigênio. 2000. 136 p. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, USP, 2000.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

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

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

SHELDON, R.A.; VAN BEKKUM, H. **Fine Chemicals Through Heterogenous Catalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

ROBERTO, I.C.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M. **Processo de destoxificação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos**. n. PI11038217. Depósito: 10 ago. 2011. Concessão: 02 fev. 2021.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 151-156, 2011.

SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 23, 2013.

SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C. Assessment of advanced oxidative processes based on heterogeneous catalysis as a detoxification method of rice straw hemicellulose hydrolysate and their effect on ethanol production by *Pichia stipitis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.4, p, 225-236, 2014.

SINGH, R.; SRIVASTAVA, M.; SHUKLA, A. Environmental sustainability of bioethanol production from rice straw in India: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 202-216, 2016.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteus Reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SOUZA, F.S.; FÉRIS, L.A. Degradation of Caffeine by Advanced Oxidative Processes: O₃ and O₃/UV. **The Journal of the International Ozone Association**, v. 37, p. 379-384, 2015.

TUCK, C.O.; PÉREZ, E.; HORVÁTH, I.T.; SHELDON, R.A.; POLIAKOFF, M. Valorization of biomass: Deriving more value from waste (review). **Science**, v. 337, p. 695-699, 2012.

VASCONCELOS, S.M.; SANTOS, A.M.P; ROCHA, G.J.M.; SOUTO-MAIOR, A.M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v.135, p.46 – 52, 2013.

VOGNA, D.; MAROTTA, R.; NAPOLITANO, A.; ANDREOZZI, R.; d'ISCHIA M. Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. **Water Research**, v. 38, p. 414–422, 2004.

WAGNER, G.H.; WOLF, D.C. Carbon transformations and soil organic matter formation. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.J.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999, p. 218-256.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1959 – 1966, 2005.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 43.

YEBER, M. C.; RODRÍGUEZ, J.; FREER, J.; BAEZA, J.; DURÁN, N. Advanced oxidation of a pulp mill bleaching wastewater. **Chemosphere**, v. 39, p. 1679-1688, 1999.

YÜCEL, H.G.; AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipites* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel**, v. 158, p. 793-799, 2015.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J.N.; BOYCE, A.N.; GANESAN, P. A comparative study on normal and high sugary corn genotypes for evaluating enzyme consumption during dry-grind ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 691-703, 2016a.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; BOYCE, A.N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016b.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A.N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, p. 24-33, 2000.

ZHANG, Y.; LI, M.; WANG, Y.; JI, X.; ZHANG, L.; HOU, L. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation couple with adsorption. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 276-283, 2015.

ZHANG, Y.; XIA, C.; LU, M.; TU, M. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 178, 2018.