

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E
DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A
VAPOR: AVALIAÇÃO DO PODER INIBITÓRIO DOS
COMPOSTOS AROMÁTICOS DE BAIXA MASSA MOLAR EM
PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Hellen Cristiane Maciel Cunha

**Lorena – SP – Brasil
2005**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E DO BAGAÇO
DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR: AVALIAÇÃO DO
PODER INIBITÓRIO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DE BAIXA MASSA
MOLAR EM PROCESSOS FERMENTATIVOS**

Tese de doutorado apresentada como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Engenharia de
Materiais

Banca examinadora:

Dr. Flávio Teixeira da Silva (presidente)
Dr. Luiz Pereira Ramos
Dr. André Luiz Ferraz
Dr. Daltro Garcia Pinatti
Dr. Amilton Martins dos Santos

Estudante:

Hellen Cristiane Maciel Cunha

Lorena – SP – Brasil
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
DEMAR/FAENQUIL

Cunha, Hellen Cristiane Maciel
C972c Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré-tratado por explosão à vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos/ Hellen Cristiane Maciel Cunha. – Lorena, 2005.
196f.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Engenharia de Materiais.

Orientador: Flavio Teixeira da Silva

1. Engenharia de Materiais 2. Lignina 3. Bagaço de cana 4. Fermentação 5. Resíduos agro-florestais I. Silva, Flávio Teixeira da, Orient. II. Título.

CDU 574.2

***À minha querida família
Paulo, Luiza, Michelle e Matheus,
Por estarem sempre ao meu lado, mesmo à distância***

Ao meu marido Elias, meu eterno amor

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ilumina e me guia.

Ao Dr. Flávio Teixeira da Silva pela orientação ao longo desses anos.

Aos Drs. André Ferraz, Adilson Roberto Gonçalves e George Jackson de Moraes Rocha e pelas sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de muitos anos, José Carlos, José Moreira, Jussara e Fabrício pelo apoio técnico durante a execução desse trabalho.

Aos alunos do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) pela amizade de muitos anos, em especial a Sirlene, André, Luane e Prescila.

Aos Drs. Régis Marcelo Teixeira Medonça e Anderson de Almeida Guerra, que além de serem meus grandes amigos, tornaram-se profissionais exemplares e muito me ajudaram na execução desse trabalho.

Aos professores e funcionários do DEBIQ, DEQUI e DEMAR que me deram oportunidade de utilizar alguns aparelhos.

À FAPESP pela bolsa e demais apoios financeiros concedidos.

LISTA DE ABREVIATURAS:

BSTFA = N, O-bis(trimetilsilil)fluoroacetamida

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP = Grau de Polimerização

FA1 = Fase Aquosa 1

FA2 = Fase Aquosa 2

FA3 = Fase Aquosa 3

FID = Detector de Ionização de Chama

FO1 = Fase Orgânica 1

FO2 = Fase Orgânica 2

FO3 = Fase Orgânica 3

FO4 = Fase Orgânica 4

FO5 = Fase Orgânica 5

FO6 = Fase Orgânica 6

CC/MS = Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas

HPSEC = Cromatografia de Exclusão por Tamanho

TIC = Cromatograma de Íons Reconstituído

TMS = Trimetilsilil

GPC = Cromatografia de Permeação em Gel

FTIR = Fourier Transformed Infrared

LCC = Complexo Lignina-Carboidrato

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	i
Lista de figuras.....	iv
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	2
1.3. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	6
1.4. INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	9
1.4.1. Inibidores de Processos de Sacarificação Enzimática.....	10
1.4.2. Inibidores de Processos Fermentativos.....	12
1.5. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL.....	30
1.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. PREPARAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA.....	37
3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA.....	38
3.2.1. Determinação dos extraíveis.....	38
3.2.2. Determinação de lignina Klason insolúvel em meio ácido.....	39
3.2.3. Determinação de lignina Klason solúvel em meio ácido.....	39
3.2.4. Determinação do teor de cinzas no bagaço de cana.....	40
3.2.5. Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE.....	41
3.2.6. Determinação de furfural e hidroximetilfurfural.....	41
3.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR A 190°C POR 15 MIN.....	42
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE GLICOSE E XILOSE POR CLAE.....	44
3.4.1. Hidrólise de xilana.....	45
3.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO.....	45

3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO BAGAÇO NATURAL E PRÉ-TRATADO.....	46
3.7. SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS E COMPOSTOS AROMÁTICOS PRESENTES NO HIDROLISADO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	46
3.8. ISOLAMENTO DOS COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO PRESENTES NA FRAÇÃO AQUOSA FA1.....	49
3.9. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA (FA1) POR UV/VIS E FTIR.....	49
3.10. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NAS FRAÇÕES AQUOSAS FA1, FA2 E FA3.....	50
3.11. IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE XILOSE PRESENTES NA FRAÇÃO AQUOSA FA1.....	50
3.12. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS (FO1 - FO6) PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO HIDROLISADO POR SOLVENTES ORGÂNICOS.....	51
3.12.1. Identificação e quantificação de compostos aromáticos de baixa massa molar presentes no hidrolisado.....	51
3.12.1.1. Derivatização das amostras para análises de CG/EM e CG/DIC.....	51
3.12.2. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas.....	52
3.12.3. Cromatografia gasosa/detector de ionização de chama.....	52
3.12.4. Determinação da distribuição de massa molar média das frações orgânicas.....	53
3.12.4.1. Calibração da coluna cromatográfica de GPC.....	53
3.12.4.2. Cálculo dos valores de mw, mn e polidispersidade.....	54
3.12.5. Espectroscopia no UV-Visível.....	54
3.12.6. Análise por espectroscopia no infravermelho.....	55
3.12.7. Determinação de grupos funcionais.....	55
3.12.7.1. Determinação de hidroxilas fenólicas.....	55
3.12.7.2. Determinação de metoxilas.....	56
3.12.8. Análise elementar das frações orgânicas.....	56
3.12.9. Acetilação e espectroscopia de rnm das frações orgânicas (FO1-FO6).....	56
3.13. TESTES DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS EM MEIO FERMENTATIVO POR COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	57

3.13.1. Microrganismos e preparo do inoculo.....	58
3.13.2. Meio de crescimento.....	58
3.13.3. Condições de fermentação.....	59
3.13.4. Efeito da concentração de xilose na produção de etanol.....	59
3.13.5. Métodos analíticos.....	59
3.13.6. Efeito inibitório dos compostos modelo.....	59
3.13.7. Efeito inibitório dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.....	60
3.13.8. Determinação da eficiência das fermentações.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR.	61
4.2. DETERMINAÇÃO DE OLIGÔMEROS DE XILOSE POR CLAE.....	66
4.3. FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO HIDROLISADO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	68
4.3.1. Caracterização das frações aquosas obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado.....	70
4.3.2. Caracterização das frações orgânicas obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado.....	78
4.3.2.1. Caracterização das frações orgânicas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).....	79
4.3.2.1.1 Considerações finais sobre os compostos identificados por CG/EM.	93
4.3.2.2. Caracterização das frações orgânicas em relação à distribuição de massa molar média aparente.....	94
4.3.2.3. caracterização das frações orgânicas por espectroscopia no UV/Visível.....	100
4.3.2.4. Caracterização das frações orgânicas por espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	104
4.3.2.5. Análise dos grupos funcionais hidroxilas fenólicas e metoxilas nas frações orgânicas.....	111
4.3.2.6. análise elementar das frações orgânicas (FO1-FO6).....	112
4.3.2.7. espectroscopia de RMN das frações orgânicas acetiladas.....	113
4.4. CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DO BAGAÇO NATURAL E PRÉ-TRATADO.....	127

4.5. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR <i>Candida shehatae</i> Y-12858 E <i>Pichia stipitis</i> CBS 5773.....	130
4.5.1. Fermentação de xilose a etanol por <i>Candida shehatae</i> Y-12858 em meio sintético.....	130
4.5.2. Ação dos compostos aromáticos de baixa massa molar derivados da degradação dos carboidratos e da lignina sobre a fermentação de xilose a etanol por <i>Candida shehatae</i> Y-12858.....	135
4.5.3. Fermentação de xilose a etanol por <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774.....	150
4.5.4. Ação dos compostos aromáticos de baixa massa molar derivados da degradação dos carboidratos e da lignina sobre a fermentação de xilose a etanol por <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774.....	155
4.6. FERMENTAÇÃO DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO POR <i>Candida shehatae</i> Y-12858 e <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774..	171
5. CONCLUSÕES.....	177
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	179
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	180
APÊNDICES	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos inibidores de processos de sacarificação enzimática.....	13
Tabela 2. Compostos derivados de lignina identificados em hidrolisados de álamo, “switchgrass” e sabugo de milho (FENSKE et al., 1998).....	20
Tabela 3. Compostos inibidores de processos fermentativos.....	27
Tabela 4. Programas de temperatura da coluna para análises das frações orgânicas nas análises de GC/MS e GC/FID (CUNHA, 1999).....	52
Tabela 5. Composição química do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min; composição do hidrolisado e a quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco.....	61
Tabela 6: Composição química do bagaço de cana sem e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min; composição do hidrolisado e a quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco (CUNHA e SILVA, 2001).....	63
Tabela 7. Composição química do bagaço de cana sem e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min; composição do hidrolisado e a quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco (SILVA, 1995).....	63
Tabela 8. Composição química dos componentes do bagaço de cana pré-tratado a 190°C por 15 min, em comparação aos dados obtidos por CUNHA e SILVA (2001) e SILVA (1995).....	64
Tabela 9. Distribuição dos compostos identificados no hidrolisado do pré-tratamento por explosão a vapor a 190°C por 15 min. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco.....	66

Tabela 10. Quantidade de matéria seca presente nas frações aquosas (FA1 - FA3) e orgânicas (FO1 - FO6) obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.....	69
Tabela 11. Atribuição das bandas observadas no espectro de infravermelho das ligninas do tipo HGS (FAIX, 1991).....	75
Tabela 12. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO1.....	82
Tabela 13. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO2.....	84
Tabela 14. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO3.....	87
Tabela 15. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO4.....	89
Tabela 16. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO5.....	91
Tabela 17. Quantidade total de cada composto identificado por CG/EM no hidrolisado obtido do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor.....	93
Tabela 18. Padrões utilizados na calibração da coluna cromatográfica e suas respectivas massas molares e volumes de eluição.....	95
Tabela 19. Valores de Mw, Mn e polidispersidade das frações orgânicas provenientes do procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.....	97

Tabela 20. Absortividades na região do UV/Visível das frações orgânicas obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.....	102
Tabela 21. Grupos funcionais derivados de lignina encontrados nas frações orgânicas obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.....	111
Tabela 22. Porcentagens de C, H, O e N contidas nas frações orgânicas (FO1-FO6).....	112
Tabela 23. Atribuição e integração relativa dos sinais de RMN- ¹ H das frações orgânicas FO1-FO5 (* A integração dos hidrogênios em grupos OAc foi dividida por 3 para manter a proporção existente na lignina não acetilada).....	118
Tabela 24. Atribuição e integração relativa dos sinais de RMN- ¹³ C das frações orgânicas (FO1-FO5).....	123
Tabela 25. Efeito da concentração inicial de xilose nos parâmetros de fermentação da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858.....	135
Tabela 26. Efeito da concentração inicial de xilose nos parâmetros de fermentação da <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774.....	154

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula estereoquímica da celulose (FENGEL e WEGENER, 1989).....3
- Figura 2.** Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = 1,4-D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....4
- Figura 3.** Estrutura modelo da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (reproduzido com modificações de FENGEL e WEGENER, 1989).....5
- Figura 4.** (A) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML= lamela média, P= parede primária, S₁= parede secundária 1, S₂= parede secundária 2, T= parede terciária e W= camada de verrugas. (a) *Picea abies* (b) *Fagus sylvatica* (FENGEL e WEGENER 1989). (B) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células da madeira (SJÖSTRÖM, 1993).....6
- Figura 5.** Representação esquemática do processo de separação dos componentes do bagaço de cana por explosão a vapor.....38
- Figura 6.** Representação esquemática do sistema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor em escala de bancada.....43
- Figura 7.** Representação esquemática do processo de extração líquido-líquido dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana com diferentes solventes.....48
- Figura 8.** Hidrolisado hemicelulósico obtido por explosão a vapor (190°C/15 min) analisado na coluna Aminex HPX 42A para a determinação de oligômeros.....67

Figura 9. Cromatograma de uma amostra padrão contendo xilose, xilobiose e xilotriose (CUNHA, 1999).....	67
Figura 10. Xilana de bétula comercial hidrolisada com H ₂ SO ₄ 72% a 25° C e analisada na coluna Aminex HPX-42A, em um detector de Índice de Refração (CUNHA, 1999)67	
Figura 11. Oligômeros de xilose presentes na fração FA1 eluída do Sep-Pak C18. Presença de oligômeros com DP variando de 2 a 5, arabinose e uma fração de alta massa molar.....	72
Figura 12. Espectro de UV/Visível da fração FA1 que foi eluída no Sep-Pak C18.....	72
Figura 13. Espectro de UV/Visível da fração FA1 que ficou adsorvida no Sep-Pak C18 e que foi dessorvida com etanol.....	73
Figura 14. Espectro de Infravermelho dos compostos presentes na fração aquosa FA1 eluída em cartucho de extração sólida Sep-Pak C18. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da matéria orgânica presente na FA1.....	74
Figura 15. Espectro de Infravermelho dos compostos presentes na fração aquosa FA1 adsorvida em cartucho de extração sólida Sep-Pak C18, dessorvida com etanol e concentrada a pressão reduzida. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da matéria orgânica presente na FA1.....	74
Figura 16. Cromatograma obtido pelo método fenol-ácido sulfúrico da FA1 eluída no Sep-Pak C18, mostrando a coeluição de lignina e carboidratos em Kd variando de 0,3 a 0,9.....	76
Figura 17. Cromatograma obtido pelo método fenol-ácido sulfúrico da FA1 que foi eluída no Sep-Pak C18 e a fração retida foi dessorvida com etanol, mostrando a coeluição de lignina e carboidratos em Kd variando de 0,2 a 0,8.....	77

Figura 18. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO1 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.....	81
Figura 19. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO1 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).....	81
Figura 20. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO2 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.....	83
Figura 21. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO2 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).....	83
Figura 22. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO3 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.....	86
Figura 23. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO3 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).....	86
Figura 24. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO4 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.....	88
Figura 25. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO4 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).....	88

Figura 26. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO5 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.....	90
Figura 27. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO5 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).....	90
Figura 28. Cromatograma reconstituído (TIC) da fração orgânica 6 evaporada a pressão reduzida e derivatizada com BSTFA.....	92
Figura 29. Curva de calibração da coluna cromatográfica Sephadex G-50 de 57 x 1,8 cm eluída com NaOH 0,5 mol·L ⁻¹ a 0,4 mL·min ⁻¹	95
Figura 30. Cromatogramas das frações orgânicas obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana. Coluna Sephadex G-50 de 57 x 1,8 cm eluída com NaOH 0,5 mol·L ⁻¹ a 0,4 mL·min ⁻¹	97
Figura 31. Espectro de UV/Visível das frações orgânicas (FO) obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de 0,50 g·L ⁻¹ de FO em dioxano/água 96%.....	100
Figura 32. Espectro UV da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de 0,40 g·L ⁻¹ de lignina em dioxano/água 54,8% (SILVA, 1995).....	101
Figura 33. Espectro FTIR da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e extraída com NaOH 1% a 100°C. Espectros tirados de pastilhas de KBr com 0,5% de lignina (SILVA, 1995).....	105
Figura 34. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO1 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO1.....	106

Figura 35. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO2 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO2.....	107
Figura 36. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO3 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO3.....	108
Figura 37. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO4 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO4.....	109
Figura 38. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO5 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO5.....	109
Figura 39. Espectro de infravermelho da fração orgânica FO6 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO6.....	111
Figura 40. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO1 acetilada.....	114
Figura 41. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO2 acetilada.....	115
Figura 42. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO3 acetilada.....	115
Figura 43. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO4 acetilada.....	116
Figura 44. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO5 acetilada.....	116
Figura 45. Espectro de RMN- ¹ H da fração orgânica FO6 acetilada.....	117
Figura 46. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO1 acetilada.....	120

Figura 47. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO2 acetilada.....	120
Figura 48. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO3 acetilada.....	121
Figura 49. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO4 acetilada.....	121
Figura 50. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO5 acetilada.....	122
Figura 51. Espectro de RMN- ¹³ C da fração orgânica FO6 acetilada.....	122
Figura 52. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO1 acetilada.....	124
Figura 53. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO2 acetilada.....	125
Figura 54. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO3 acetilada.....	125
Figura 55. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO4 acetilada.....	126
Figura 56. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO5 acetilada.....	126
Figura 57. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de bagaço natural. (A) Seção longitudinal de um feixe de fibras; (B) Divisão de células de parênquima; (C) Seção transversal: vaso na forma de espiral (hélice simples) e (D) Seção transversal: parede celular (lamela média composta e os três componentes da parede secundária).....	128
Figura 58. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de bagaço após o pré-tratamento por explosão a vapor a 190°C por 15 min. (A) Seção longitudinal: fibras totalmente separadas e microfibrilas; (B) Seção longitudinal: feixe de fibras colapsados e (C) Seção longitudinal: aparecimento de pits.....	129
Figura 59. Variação do pH durante a fermentação de xilose a etanol por <i>C. shehatae</i> Y-12858.....	130

Figura 60. Crescimento celular da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 nas fermentações de xilose em meio sintético.....	132
Figura 61. Comparação das concentrações máximas de etanol produzidas durante 24 horas (20 g·L ⁻¹ e 40 g·L ⁻¹) e 48 horas (50 g·L ⁻¹ , 60 g·L ⁻¹ , 80 g·L ⁻¹ e 100 g·L ⁻¹) em meios contendo várias concentrações de xilose por <i>Candida shehatae</i> Y-12858.....	133
Figura 62. Produção de etanol (γ) e consumo de xilose (ξ) por <i>Candida shehatae</i> Y-12858 em diferentes concentrações de substrato.....	134
Figura 63. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	137
Figura 64. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de vanilina na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	138
Figura 65. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de siringaldeído na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	139
Figura 66. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	141
Figura 67. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido <i>trans</i> -cumárico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	142
Figura 68. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido ferúlico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	143

Figura 69. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido vanílico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	144
Figura 70. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido siríngico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	145
Figura 71. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido acético em diferentes concentrações.....	147
Figura 72. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de furfural em diferentes concentrações.....	148
Figura 73. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de hidroximetilfurfural em diferentes concentrações.....	149
Figura 74. Variação do pH durante a fermentação de xilose a etanol por <i>P stipitis</i> CBS 5774.....	150
Figura 75. Crescimento celular da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 nas fermentações de xilose em meio sintético.....	151
Figura 76. Comparação das concentrações máximas de etanol produzidas durante 36 horas de fermentação em meios contendo diferentes concentrações de xilose por <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774.....	152
Figura 77. Produção de etanol (▲) e consumo de xilose (●) por <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774 em diferentes concentrações de substrato.....	153

Figura 78. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose com adição de <i>p</i> -hidroxibenzaldeído em diferentes concentrações.....	157
Figura 79. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose com adição de vanilina em diferentes concentrações.....	158
Figura 80. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose com adição de siringaldeído em diferentes concentrações.....	159
Figura 81. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	161
Figura 82. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido <i>trans</i> -cumárico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	162
Figura 83. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido ferúlico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	163
Figura 84. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido vanílico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	164
Figura 85. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido sirínico na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	165

Figura 86. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de ácido acético na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	168
Figura 87. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de furfural na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	169
Figura 88. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L ⁻¹) com adição de hidroximetilfurfural na concentração de 5,0 g·L ⁻¹	170
Figura 89. Variação de pH em função do tempo de fermentação para os controles e para os hidrolisados pelas leveduras <i>Candida shehatae</i> Y-12858 e <i>Pichia stipitis</i> CBS 5774.....	172
Figura 90. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>C. shehatae</i> Y- 12858 cultivada em hidrolisados (15 g·L ⁻¹ e 50 g·L ⁻¹) comparadas aos controles (xilose 15 g·L ⁻¹ e 50 g·L ⁻¹).....	173
Figura 91. Curvas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de xilose da levedura <i>P. stipitis</i> CBS 5774 cultivada em hidrolisados (15 g·L ⁻¹ e 50 g·L ⁻¹) comparadas aos controles (xilose 15 g·L ⁻¹ e 50 g·L ⁻¹).....	174

Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos. Hellen Cristiane Maciel Cunha. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Flávio Teixeira da Silva. Banca examinadora: Dr. Luiz Pereira Ramos, Dr. André Luiz Ferraz, Dr. Daltro Garcia Pinatti e Dr. Durval Rodrigues Junior. Março de 2005.

Resumo

O pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor produz hidrolisado contendo polioses solúveis em H₂O, além de compostos inibidores de processos fermentativos, derivados da degradação de carboidratos e da lignina. Neste trabalho, o bagaço de cana foi pré-tratado a 190°C por 15 min. Nessas condições foram solubilizados 33% do bagaço de cana. O bagaço pré-tratado e o hidrolisado hemicelulósico foram caracterizados quimicamente. A composição do bagaço pré-tratado apresentou 57,5% de glucana, 9,9% de xilana, 0,70% de grupos acetil, 27,9% de lignina total e 2,7% de cinzas. A composição do hidrolisado apresentou 1,27% de oligômeros de glucose, 0,052% de hidroximetilfurfural, 2,64% de xilose, 12,1% de oligômeros de xilose, 0,67% de furfural, 0,573% de arabinose, 0,26% de arabinose ligada a oligômeros de xilose, 1,02% de ácido acético, 0,75% de grupos acetil e 4,49% de compostos detectados como lignina solúvel. A quantidade de compostos não identificados no hidrolisado foi de 9,2%. Foram identificados oligômeros de xilose com grau de polimerização variando entre 2 e 6, com predominância de xilobiase e xilotriose. As mudanças ocorridas na ultraestrutura da superfície do bagaço de cana, devido ao pré-tratamento, foram detectadas por microscopia eletrônica. Os compostos presentes no hidrolisado foram separados por extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos, produzindo três frações aquosas (FA1, FA2 e FA3) e seis frações orgânicas (FO1 - FO6). A fração aquosa FA1 caracterizou-se por conter predominantemente carboidratos, além de indício provável de complexos lignina-carboidrato. As frações orgânicas foram classificadas em total (FO1), ácidas (FO2 e FO3), fenólicas (FO4 e FO5) e neutra (FO6). Nestas frações foram identificados por CG/MS compostos de baixa massa molar, tais como *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácidos *cis*- e *trans*-cumárico e ácido ferúlico, os quais foram quantificados por CG/FID. A distribuição de massa molar média aparente das frações orgânicas variou de 469,9 g·mol⁻¹ a 4058,9 g·mol⁻¹. Os conteúdos de metoxilas e hidroxilas fenólicas das frações orgânicas isoladas foram bem inferiores aos valores reportados para a lignina de bagaço de cana. A fração orgânica FO6 não apresentou derivados de lignina. Foram feitos testes de fermentação de xilose a etanol utilizando-se duas leveduras: *Candida shehatae* Y-12858 e *Pichia stipitis* CBS 5774, variando-se as concentrações iniciais do substrato. A avaliação do efeito dos compostos aromáticos derivados de carboidratos e da lignina sobre a fermentação foi efetuada em meio contendo 50 g·L⁻¹ de xilose, para ambas as leveduras. Apenas os ácidos siríngico e ácido *p*-hidroxibenzóico, na concentração de 5,0 g·L⁻¹, não apresentaram inibição considerável ao crescimento celular e à produção de etanol para ambas as leveduras, além do furfural na fermentação com *P. stipitis*. Todos os demais compostos testados foram extremamente tóxicos nessa concentração, mostrando que o grau de inibição depende da natureza e da concentração dos inibidores. Quando os hidrolisados nas concentrações de 15 g·L⁻¹ e 50 g·L⁻¹ foram inoculados com as leveduras *C. shehatae* e *P. stipitis*, observou-se a inibição da produção de etanol e do crescimento microbiano, indicando a necessidade de destoxificação do hidrolisado previamente à fermentação.

Characterization of hemicellulosic hydrolysate and sugarcane bagasse pretreated by steam explosion: investigation of inhibitory effect of low molecular weight aromatic compounds for fermentative process. Hellen Cristiane Maciel Cunha. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Flávio Teixeira da Silva. Banca examinadora: Dr. Luiz Pereira Ramos, Dr. André Luiz Ferraz, Dr. Daltro Garcia Pinatti e Dr. Durval Rodrigues Junior. March 2005.

Abstract

Sugar cane bagasse pretreatment by steam explosion produces hydrolysates containing polyoses soluble in H₂O, as well as compounds that are inhibitors of the fermentative processes, such products of sugar and lignin degradation. In this study, sugar cane bagasse was pretreated at 190°C for 15 minutes. The pretreatment solubilized 33% of the sugar cane bagasse. The pretreated bagasse and hemicellulosic hydrolysate were chemically characterized. The pretreated bagasse contained glucan (57.5%), xylan (9.9%), acetyl groups (0.7%), total lignin (27.9%) and ashes (2.7%). The hydrolysate contained glucose oligomers (1.27%), hydroxymethylfurfural (0.052%), xylose (2.64%), xylose oligomers (12.1%), furfural (0.67%), arabinose (0.573%), arabinose linked to xylose oligomers (0.26%), acetic acid (1.02%), acetyl groups (0.75%) and compounds detected as soluble lignin (4.49%). The amount of unidentified compounds in hydrolyzed bagasse was 9.2%. The qualitative analyses of the hydrolysate showed the presence of xylose oligomers with polymerization levels ranging from 2 to 6, xylobiose and xylotriose being predominant. The changes occurred in the surface ultrastructure of sugarcane bagasse, due to pretreatment, were detected by electronic microscopy. The compounds present in hydrolysate were separated by liquid-liquid extraction with different organic solvents, producing three aqueous fractions (FA1-FA3) and six organic fractions (FO1 - FO6). FA1 fraction was characterized to include carbohydrates, besides possible lignin-carbohydrate complexes. The organic fractions were classified as total (FO1), acid (FO2-FO3), phenolic (FO4-FO5) and neutral (FO6). In these fractions were identified low molecular weight compounds, as well as *p*-hydroxybenzaldehyde, vanillin, syringaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, *cis*- and *trans*- coumaric acids and ferulic acid by GC/MS, that were quantified by GC/FID. The apparent average weight molecular distribution of organic fractions ranged from 469,9 g·mol⁻¹ to 4058,9 g·mol⁻¹. The methoxyl and phenolic hydroxyl contents were lower than the values encountered to sugarcane bagasse lignin. In the neutral fraction (FO6) no lignin derivate compound was identified. *Candida shehatae* Y-12858 e *Pichia stipitis* CBS 5774 were used in xylose to ethanol fermentation. The tests were made in synthetic medium varying the initial substrate concentrations. The valuation of the effect from carbohydrates and lignin derivatives aromatic compounds under xylose fermentation was done with 50 g·L⁻¹ xylose for both yeasts. In 5,0 g·L⁻¹ concentration, only syringic and *p*-hydroxybenzoic acids no showed considerable inhibition to cellular growth and ethanol production for both yeasts, besides furfural in *P. stipitis* fermentations. The another compounds were very toxic in this concentration, showing that the degree of inhibition of tested toxic compounds greatly depended on the nature and concentration of inhibitors as well as the nature of the microorganisms. When hydrolysates with 15 g·L⁻¹ and 50 g·L⁻¹ were inoculated with *C. shehatae* e *P. stipitis* yeasts, was observed the cellular growth and ethanol production inhibition, showing the necessity to remove the inhibitors prior to fermentation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Resíduos agro-florestais apresentam não só um problema econômico em consequência do desperdício, como também um sério problema ambiental. Pesquisas para a valorização de resíduos agro-florestais vêm sendo realizadas com maior frequência nos últimos tempos visando reduzir o impacto ao meio ambiente, além de apresentarem-se como alternativas para a produção de energia combustível e insumos químicos de maior valor agregado para diversos fins.

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) cresce na maioria dos países tropicais e subtropicais e é usada principalmente para a obtenção de açúcar e álcool. Após sua moagem para a extração do caldo, o principal subproduto é o bagaço, que representa de 12% a 14% da massa seca da cana (ICIDCA, 1987).

Bagaço de cana é um dos resíduos agrícolas mais abundantes e de maior importância econômica no Brasil, além de ser um dos principais sub-produtos lignocelulósicos da agro-indústria brasileira. O bagaço de cana é frequentemente citado na literatura como o material lignocelulósico mais promissor para a obtenção de açúcares (pentoses e hexoses), que podem ser transformados em etanol ou outros compostos químicos (AGUILAR et al., 2002; SASKA e OZER, 1995; DOMINGUEZ et al., 1996).

Além do bagaço, a palha de cana também tem sido considerada um dos principais resíduos gerados, pois, devido à mecanização na colheita, a queima não se faz mais necessária (CARVALHO, 1999). Aproximadamente 25% da biomassa vegetal da cana-de-açúcar é composta de topos, folhas e palha, sendo que a produção calculada de palha pode chegar a 30 milhões de toneladas anuais (LORA et al., 1997).

A produção de etanol a partir do bagaço é uma opção extremamente interessante para o Brasil e para o Estado de São Paulo, considerando-se as quantidades deste produto anualmente disponíveis e o potencial de ampliação desta produção. Segundo a União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo (UNICA), a safra 2003/2004 do Brasil totalizou 350,3 milhões de toneladas de cana colhida, sendo que 298 milhões de toneladas foram provenientes da região centro-sul, gerando quantidades superiores a 98 milhões de toneladas de bagaço (UNICA, 2004). Em geral, 1 tonelada de cana-de-açúcar gera 280 kg de bagaço (SUN et al., 2004). Cerca de 90% do bagaço

obtido nas indústrias de açúcar e álcool tem sido utilizado principalmente dentro das próprias usinas como fonte de vapor e energia (poder calorífico de $18,322 \text{ kJ.kg}^{-1}$), pois substitui o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras (MARTÍN et al., 2002; PANDEY et al., 2000). Já a palha também pode ser misturada ao bagaço para ser queimada para geração de energia, devido ao seu poder calorífico ser um pouco maior que o do bagaço ($18,870 \text{ kJ.kg}^{-1}$) (RIPOLI et al., 2000). Mesmo assim, ainda existe um grande excedente que não é utilizado, causando sérios problemas de estocagem e de impacto ambiental. MARTIN et al. (1999) estimaram que as usinas de açúcar e álcool podem liberar de 30% a 50% do bagaço produzido para usos alternativos, empregando tecnologia para a produção de compostos de maior valor econômico (PANDEY et al., 2000; CASTRO et al., 1995; DESCHAMPS et al., 1996; LACORTE et al., 1986).

Vários processos e produtos têm sido relatados por utilizarem bagaço de cana como matéria-prima. Isto inclui: geração de eletricidade; produção de polpa celulósica papel e papelão; produtos baseados em fermentação; produção de furfural e outros produtos químicos como álcoois, amino-ácidos, ácidos orgânicos e outros compostos de importância farmacêutica; ração animal de maior digestibilidade; enzimas e produção de chapas de partículas (SUN et al., 2004; PANDEY et al., 2000).

1.2. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A dificuldade de se converter o bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são um composto de microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina, que age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL e WEGENER, 1989). A compreensão da complexidade estrutural e da reatividade dos materiais lignocelulósicos requer o conhecimento das características e das propriedades de cada um de seus componentes.

Celulose: a celulose é um polissacarídeo linear constituído de subunidades de glucose associadas por ligações β -(1→4), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero (Figura 1). As cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que são insolúveis em água e apresentam regiões

cristalinas e amorfas (SJÖSTRÖM e WESTERMARK, 1999; PARHAM, 1993; FENGEL e WEGENER, 1989). As ligações de hidrogênio inter- e intramolecular são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas, e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (CONVERSE e WARE, 1994; WOOD e SADDLER, 1988).

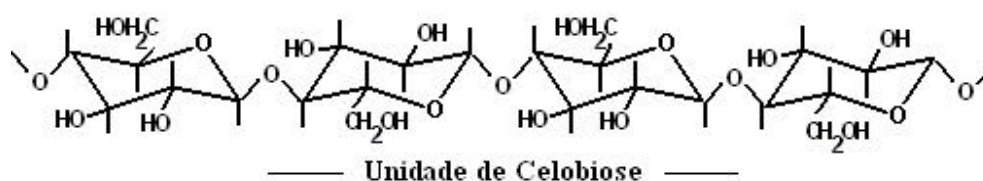


Figura 1. Representação tridimensional da molécula de celulose (FENGEL e WEGENER, 1989).

Polioses: as polioses ou hemiceluloses são polissacarídeos e diferem-se substancialmente da celulose por serem amorfas, com estrutura ramificada e compostas pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxiexoses) (SJÖSTRÖM e WESTERMARK, 1999; PARHAM, 1993; FENGEL e WEGENER, 1989). As polioses são classificadas basicamente de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polissacarídeo: xilanas, glucomanas e galactanas.

A cadeia principal pode ser um homopolissacarídeo, como no caso das xilanas, ou um heteropolissacarídeo, como no caso das glucomanas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. As coníferas apresentam maior proporção de galactoglucomanas, enquanto as folhosas e gramíneas são mais ricas em xilanas (RAMOS, 2003; PARHAM, 1993). A representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas está representada na Figura 2 (McDOUGALL et al., 1993).

Lignina: Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais importante e abundante do reino vegetal. A lignina aumenta a resistência mecânica das plantas, de tal forma que árvores de mais de cem metros podem se manter em pé (FENGEL e WEGENER, 1989).

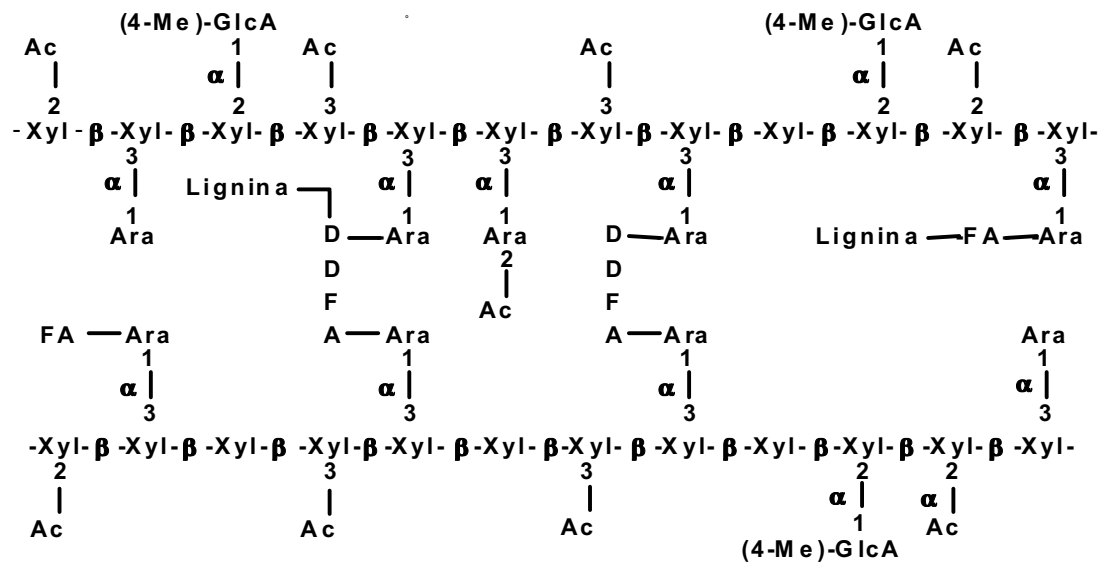


Figura 2. Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = 1,4-D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-OMe)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glucopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).

A lignina é uma macromolécula tridimensional altamente complexa e ramificada, gerada pela polimerização desidrogenativa de três álcoois hidroxicinâmicos: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A lignina é principalmente constituída de unidades fenilpropano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes β -(O-4) e α -(O-4) (40-60%), β -5 (10%), β -1 (5-10%), 5-5 (10%), β - β (5%) e 4-O-5 (5%) (HIGUCHI, 1985). Um modelo proposto para a estrutura da lignina de abeto é mostrado na Figura 3.

Extrativos: representam uma fração menor na composição química dos materiais lignocelulósicos. São formados por resinas, ácidos graxos, ceras, terpenos e compostos fenólicos que podem ser extraídos com solventes orgânicos, embora alguns deles também sejam solúveis em água (FENGEL E WEGENER, 1989). Estes compostos são responsáveis por características como odor, cor e sabor dos materiais lignocelulósicos e estão presentes em pequenas quantidades (SJÖSTRÖM E WESTERMARK, 1999).

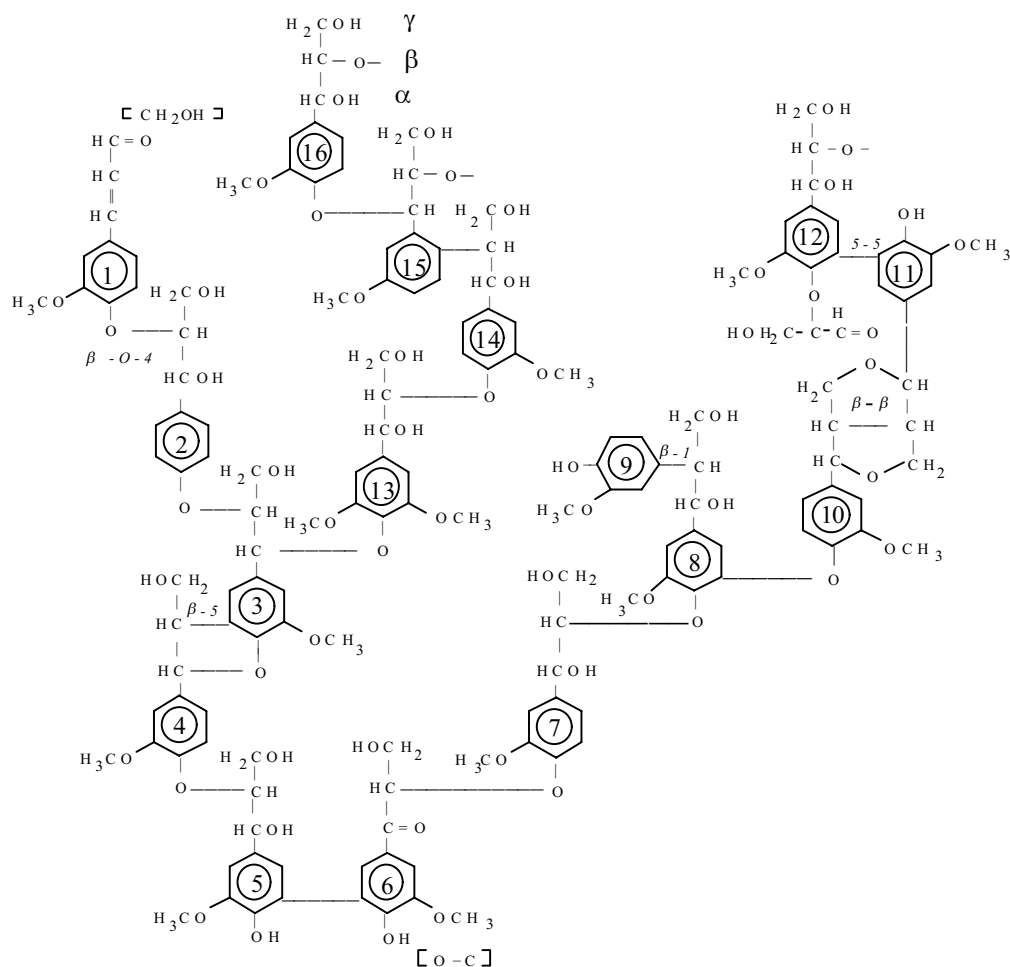


Figura 3. Estrutura modelo da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (reproduzido com modificações de FENGEL e WEGENER, 1989).

É importante ressaltar que os três principais componentes dos materiais lignocelulósicos encontram-se intimamente associados para assim constituir o complexo celular da biomassa vegetal. Na parede celular, celulose, polioses e lignina, organizam-se formando diferentes camadas (Figura 4A): as paredes primária (P), secundária (S) e terciária (T). As diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (ML), que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido das plantas. A parede primária (P) é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. Do lado de dentro da parede primária é formada a parede secundária, em uma seqüência de três lamelas, S₁, S₂ e S₃ (ou T). Nestas regiões, as microfibrilas de celulose possuem distintas orientações com respeito ao eixo longitudinal da célula. A parede mais espessa é a S₂, na qual as microfibrilas de celulose se encontram orientadas de forma quase paralela ao eixo axial da célula. As

fibrilas de celulose próximas ao lúmen da célula compreendem a camada terciária e estão orientadas quase perpendicularmente ao eixo da célula.

Na parede celular, as fibrilas elementares estão separadas umas das outras por uma camada de polioses, formando as microfibrilas, que são envolvidas em uma matriz de lignina, formando a parede celular (FENGEL e WEGENER, 1989).

A maior quantidade de lignina é encontrada na camada S₂, mas sua concentração é maior na lamela média. A Figura 4(B) apresenta um modelo da construção da parede celular dos materiais lignocelulósicos, ilustrando a descrição acima.

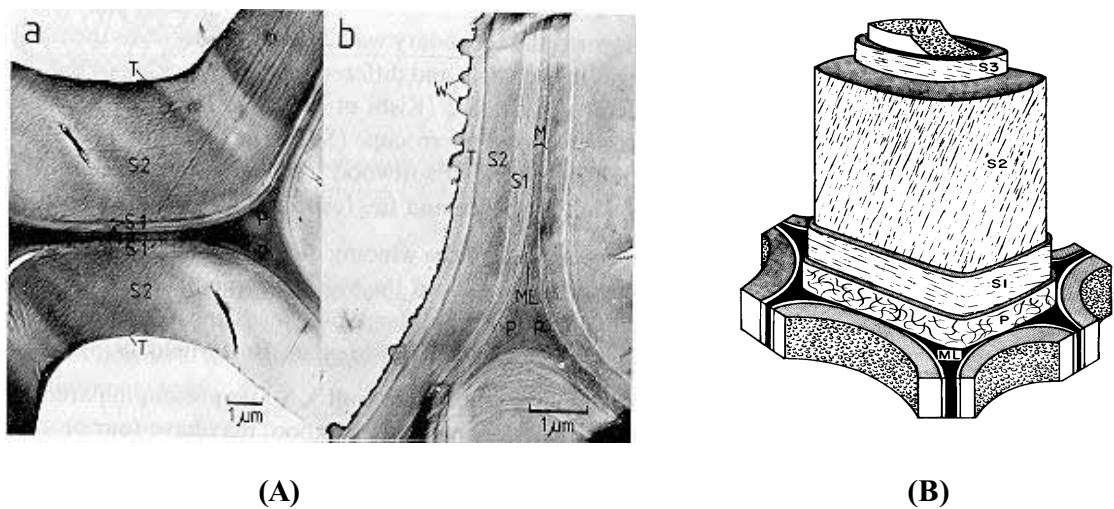


Figura 4. (A) Microscopia eletrônica de transmissão das células de madeira mostrando as camadas da parede celular: ML= lamela média, P= parede primária, S₁= parede secundária 1, S₂= parede secundária 2, T= parede terciária e W= camada de verrugas. (a) *Picea abies* (b) *Fagus sylvatica* (FENGEL e WEGENER 1989). (B) Corte ilustrativo do sistema de camadas na parede das células da madeira (SJÖSTRÖM, 1993).

1.3. SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Para se obter uma conversão efetiva dos três principais componentes dos materiais lignocelulósicos (celulose, polioses e lignina) em produtos de maior valor econômico, é necessário a separação seletiva dos mesmos. Há, portanto, a necessidade de se romper o complexo lignina-celulose-poliose para a remoção de cada constituinte,

se se quer utilizar os materiais lignocelulósicos para fins químicos ou biotecnológicos (SILVA, 1995).

Várias técnicas de pré-tratamento baseadas na combinação de processos mecânicos, físicos, químicos e biológicos estão associadas aos processos de separação e aproveitamento dos componentes dos materiais lignocelulósicos (RAMOS, 2003; NEGRO et al., 2003; FERRAZ et al., 1996; McMILLAN, 1994a). Nestas inclui-se o emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor e uso de fluídos supercríticos, todas usadas ou propostas com o objetivo de produzir combustíveis renováveis e insumos químicos a partir de biomassa (McMILLAN, 1994a).

Entre os processos disponíveis, a explosão a vapor tem sido considerada um dos mais promissores no pré-tratamento de biomassa para a produção de insumos químicos, combustíveis, alimentos e polímeros. A explosão a vapor permite a recuperação de grande parte dos componentes dos materiais lignocelulósicos, minimizando a sua degradação (SUN et al., 2004; ROBINSON et al., 2003; AVELLAR e GLASSER, 1998). Trata-se de uma técnica que tem sido proposta como uma possível alternativa para o tratamento termo-mecânico de materiais lignocelulósicos (FOCHER et al., 1998). Além disso, é considerado um pré-tratamento efetivo para processos de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS), nos quais combina-se hidrólise enzimática da celulose com fermentação simultânea dos açúcares provenientes das hemiceluloses para a produção de etanol (KOBAYASHI et al., 2004).

Os materiais lignocelulósicos, quando pré-tratados por processos envolvendo altas pressões de vapor, sofrem inicialmente reações de hidrólise (EXCOFFIER et al., 1991; LORA e WAYMAN, 1978). Essas reações ocorrem a temperaturas superiores às temperaturas de amolecimento da lignina e das polioses. Ao longo do processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em parte quebradas. Quando as técnicas de explosão a vapor são incluídas no processo, o material, no momento da descompressão, é desfibrado e reduzido a partículas menores, o que acarreta um aumento da sua susceptibilidade ao ataque de enzimas e reagentes químicos (SUN et al., 2004; BARNET et al., 1989).

A hidrólise ocorre sobre todos os componentes da biomassa, porém as pentosanas são as mais susceptíveis a este tipo de reação (BROWNELL e SADDLER, 1986). Sob a ação da temperatura e da pressão, os grupos acetil presentes nas polioses são hidrolisados a ácido acético. O ácido acético liberado catalisa a ruptura das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das

polioses e de uma pequena fração de lignina (auto-hidrólise) (SUN et al., 2004; RAMOS, 2003; BOUCHARD et al., 1990 e 1990). A auto-hidrólise tem sido citada como um pré-tratamento que apresenta um custo efetivo baixo, pois não necessita da adição de ácidos, como H_2SO_4 , HCl e HF (NEGRO et al., 2003; BALLESTEROS et al., 2002).

No estágio inicial do pré-tratamento, as polioses são hidrolisadas a oligômeros e monômeros (principalmente xilose, no caso de madeiras duras e gramíneas) e a celulose permanece praticamente insolúvel, embora sofra redução no seu grau de polimerização (SUN et al., 2004; RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004; SILVA, 1995; BARNET et al., 1989; MARCHESSAULT et al., 1980).

O aumento da severidade do pré-tratamento (aumento da temperatura e/ou do tempo de exposição do material à pressão) favorece as reações de hidrólise da celulose e das polioses, provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses para furfural e hidroximetilfurfural (SUN et al., 2004; BROWNELL e SADDLER, 1986; BROWNELL et al., 1986) e aumenta as reações de condensação dos taninos que compõem os extrativos (LOMAX et al., 1994).

Durante a explosão a vapor, a lignina sofre amolecimento (MICHALOWICZ et al., 1991; WONG et al., 1988), é parcialmente despolimerizada e torna-se, inicialmente, mais solúvel. Por outro lado, reações posteriores de condensação e polimerização revertem essa tendência de solubilização (HISHIYAMA e SUDO, 1989; LOMAX et al., 1994; LORA e WAYMAN, 1978).

Do ponto de vista energético e químico, o pré-tratamento por explosão a vapor é bastante eficiente e pode proporcionar a conversão efetiva dos carboidratos, por exemplo, a açúcares fermentescíveis, com alto rendimento. O rendimento total de carboidratos é o fator mais importante nos processos de conversão de biomassa em escala comercial. Para o melhor aproveitamento do processo de pré-tratamento, os açúcares presentes nos hidrolisados hemicelulósicos também devem ser utilizados. É essencial que as hemiceluloses, em adição à celulose hidrolisada, sejam eficientemente fermentadas para a produção de etanol (WILSON et al, 1989).

A hidrólise quantitativa das hemiceluloses pode ser feita quase que sem danos à estrutura da celulose, pois as ligações nas hemiceluloses são mais fracas que na celulose. Entretanto, um resíduo sólido formado por celulose e lignina é obtido na pré-hidrólise do bagaço de cana. Este resíduo pode ser utilizado na produção de soluções de açúcares para a obtenção de ácido lático ou etanol, através de processos de

Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS), ou para a produção de polpa e papel (RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004; AGUILAR et al., 2002). Entretanto, um dos maiores problemas associados aos processos de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos para a obtenção de hidrolisados é a geração de produtos considerados tóxicos ao metabolismo celular dos microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo (ROBINSON et al., 2003; MARTIN et al., 2001; EKEN-SARAÇOGLU e ARSLAN, 2000; FENSKE et al., 1998; PALMQVIST et al., 1996a,b; HAHN-HÄGERDAL, B., 1996; DOMINGUEZ et al., 1996; McMILLAN, 1994a).

1.4. IDENTIFICAÇÃO DOS INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

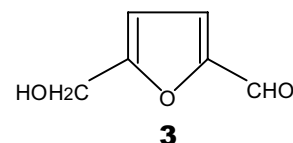
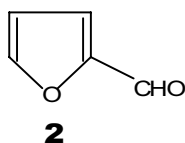
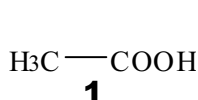
Hidrolisados hemicelulósicos provenientes do tratamento da biomassa por explosão a vapor contêm carboidratos como principais produtos. Entretanto, como mencionado anteriormente, esses açúcares são contaminados com pequenas quantidades de uma grande variedade de outros compostos, que inibem a fermentação e o crescimento de microrganismos. Esses inibidores podem ser divididos em grupos, em função de sua origem (MARTÍN et al., 2002; SREENATH e JEFFRIES; 2000; CONVERTI et al., 1999; PALMQVIST et al., 1999; JÖNSSON et al., 1998; FENSKE, 1998, HAHN-HÄGERDAHL, 1996, McMILLAN, 1994b):

- (1) Compostos liberados durante o pré-tratamento, tais como o ácido acético;
- (2) Produtos de degradação dos açúcares, tais como furfural e hidroximetilfurfural;
- (3) Produtos de degradação da lignina, como siringaldeído, vanilina, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico;
- (4) Íons metálicos liberados pela corrosão dos equipamentos usados no processo, como cromo, ferro, etc.

A natureza e a concentração de inibidores potenciais dos processos de sacarificação enzimática e fermentativo, presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, variam de acordo com o tipo do material lignocelulósico utilizado no processo e com as condições de pré-tratamento empregado, havendo uma relação entre a concentração

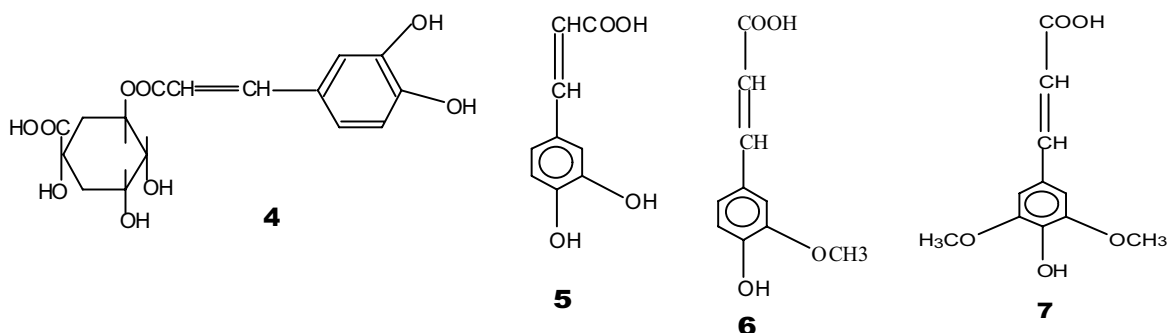
desses compostos e o efeito inibitório que estes causam no meio fermentativo (PALMQVIST et al., 1996a,b; MCMILLAN, 1994b).

A presença de compostos inibidores da ação de microrganismos nos processos de bioconversão dos componentes de madeira pré-tratada com vapor tem sido relatada por vários autores (MARTÍN et al., 2002; PALMQVIST et al., 1996a,b; ANDO et al., 1986; MES-HARTREE e SADDLER, 1983). Geralmente, estes inibidores são compostos de baixa massa molar, solúveis em água e incluem o ácido acético (**1**), derivados de açúcares e produtos de degradação da lignina (SILVA, 1995; PULS et al., 1985). Ácido acético (**1**) é liberado através da hidrólise parcial das poliooses durante o pré-tratamento; os produtos de desidratação dos açúcares incluem inicialmente o furfural (**2**) e o hidroximetilfurfural (**3**) e os produtos de degradação da lignina incluem uma grande variedade de compostos aromáticos. Todos esses compostos podem inibir tanto os processos de hidrólise ou sacarificação enzimática (item 1.4.1 e Tabela 1) como os processos fermentativos (item 1.4.2 e Tabela 3).



1.4.1. Inibidores de Processos de Sacarificação Enzimática

SINEIRO et al. (1997) reportaram a inibição da atividade de celulasas de *Trichoderma reesei* por compostos fenólicos, na extração aquosa de resíduo das sementes de girassol. O ácido clorogênico (**4**), testado em concentrações que variaram de 1,20 mM a 4,50 mM, foi o composto que apresentou a menor capacidade inibitória, seguido pelos ácidos caféico (**5**) (0,22 – 0,70 mM), ferúlico (**6**) (0,58 – 2,00 mM) e sinápico (**7**) (0,83 – 1,64 mM). Nas concentrações testadas, a inibição causada pelos ácidos sinápico (**7**) e ferúlico (**6**) foi 100 e 10 vezes maior do que a do ácido clorogênico (**4**), respectivamente. A inibição causada por fenóis e polifenóis foi muito maior que a causada pela glucose, pelo etanol e mesmo pela celobiose, que é considerada um inibidor forte de celulasas em processos de sacarificação enzimática. O ácido sinápico (**7**), por exemplo, apresentou um poder inibitório 1000 vezes maior do que a celobiose (SINEIRO et al., 1997; HOLTZAPPLE et al., 1990).



EXCOFFIER et al. (1991) mostraram que as reações de sacarificação enzimática de madeira de álamo pré-tratada por explosão a vapor (20-50 bar e 210-260°C, usando H₂SO₄ 0,4% (m /m do substrato)) são afetadas pela inativação das celulasas causada por fenóis solúveis em água. O rendimento da hidrólise de celulose cristalina por celulasas de *Trichoderma reesei* foi reduzido em até 24% na presença de fenóis. Adicionalmente, esses autores demonstraram a adsorção e a inativação de endo-1,4-β-glucanases por fenóis. Eles também isolaram e estudaram a ação sobre a atividade das celulasas de ácidos triidroxibutíricos (THBA) (**8**) e fenóis formados durante o processo de pré-tratamento. Os resultados mostraram uma diminuição no rendimento de glucose, o que pode ser explicado pela inibição das β-glucosidases pelos fenóis e pelos THBA, mesmo em baixas concentrações. Os THBA podem formar lactonas em soluções aquosas, cuja ação inibitória sobre as reações de sacarificação enzimática de substratos lignocelulósicos já foi descrita por DEKKER (1986).

MES-HARTREE e SADDLER (1983) estudaram o efeito de inibidores produzidos no pré-tratamento por explosão a vapor sobre a hidrólise enzimática de celulose usando celulasas de *Trichoderma harzianum*. Como substrato, usaram palha de trigo e madeira de álamo pré-tratados a vapor. A sacarificação enzimática da celulose presente nos substratos pré-tratados a 250°C por 20 s, com e sem a impregnação com H₂SO₄, só foi eficiente após a remoção dos compostos de baixa massa molar, através da lavagem dos substratos com água.

1.4.2. Inibidores de Processos Fermentativos

Os processos fermentativos são mais sensíveis aos inibidores do que os processos de sacarificação enzimática. Em um artigo sobre a fermentação de D-xilose a etanol por *Candida shehatae* e *Pichia stipitis*, PRIOR et al. (1989) relacionaram a eficiência das fermentações a fatores nutricionais, temperatura, pH, concentração de substrato e produto, presença de outros açúcares, demanda de oxigênio e compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos. Mostraram, por exemplo, que para diferentes cepas de uma mesma levedura, açúcares outros que a D-xilose, como D-galactose, D-celobiose, L-arabinose, D-glucose e D-manose, podem funcionar tanto como co-substratos quanto inibidores. Entretanto, segundo McMILLAN (1994b) e ANDO et al. (1986), os maiores problemas dessas fermentações são causados por outros compostos presentes nos hidrolisados, tais como, ácido acético (**1**), furfural (**2**), hidroximetilfurfural (**3**) e derivados de lignina (ácidos, álcoois e cetonas) que inibem a fermentação por leveduras.

A forma de ação de alguns inibidores tem sido descrita na literatura. O ácido acético (**1**) é, em geral, um inibidor do metabolismo de leveduras e o seu grau de toxicidade é dependente do pH (HERRERO et al., 1985), mesmo para microrganismos modificados geneticamente (LAWFORD e ROUSSEAU, 1993).

WEIGERT et al. (1988), citado em PRIOR et al. (1989), relatou que o furfural (**2**) inibiu diretamente a respiração e o crescimento de *P. stipitis*, sendo imediatamente reduzido a álcool furfurílico (**14**), que também diminuiu a velocidade da produção de etanol.

Furfural (**2**) e hidroximetilfurfural (**3**) foram durante muito tempo considerados os principais inibidores produzidos durante o pré-tratamento de lignocelulósicos. MESHARTREE e SADDLER (1983) testaram esses compostos nas concentrações normalmente encontradas em hidrolisados de palha de trigo ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ - $0,5 \text{ gL}^{-1}$) e de madeira de álamo ($0,01 \text{ gL}^{-1}$ - $0,05 \text{ gL}^{-1}$) e não constataram a inibição das reações de sacarificação. Testaram também xilanas e xilose nos níveis produzidos durante hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos. Nenhum efeito inibitório foi constatado.

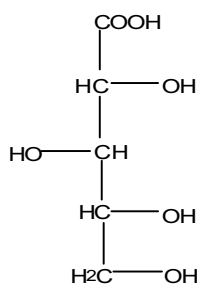
Tabela 1. Compostos inibidores de processos de sacarificação enzimática.

Substrato	Pré-tratamento	Microorganismo	Compostos inibidores	Referências
Resíduo da extração de óleo de Girassol	Extração aquosa	Celulases de <i>Trichoderma reesei</i>	Ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido clorogênico	Sineiro et al (1997)
Hidrolisado de álamo	Explosão a Vapor 20-50 bar 210-260°C H ₂ SO ₄ 0,4%	Celulases de <i>Trichoderma reesei</i>	Fenóis solúveis em água	Excoffier et al. (1991)
Hidrolisados de palha de trigo e madeira de álamo	Explosão a vapor a 250°C/20 s com e sem a impregnação dos cavacos com H ₂ SO ₄	Celulases de <i>Trichoderma harzanium</i>	Compostos furânicos, furfural e hidroximetilfurfural	Mes-Hartree e Saddler (1983)

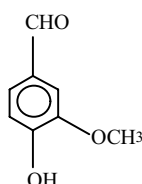
Aparentemente, as xilanas foram usadas em parte como substrato para enzimas hemicelulolíticas presentes nos extratos enzimáticos. Por outro lado, a adição do extrato aquoso, isolado do hidrolisado, no substrato das reações de sacarificação, reduziu drasticamente a produção de glicose, sem afetar significativamente a quantidade de açúcares redutores totais, o que indica inibição das β -glucosidases.

Além do ácido acético (**1**) e dos compostos furânicos, alguns autores têm estudado de forma sistemática a ação de alguns compostos aromáticos derivados da lignina no metabolismo celular dos microrganismos empregados em processos fermentativos (DELGENES et al., 1996; BUCHERT et al., 1988, 1989; NISHIKAWA et al., 1988; TRAN e CHAMBERS, 1986; ANDO et al., 1986; CLARK e MACKIE, 1984; PFEIFER et al., 1984).

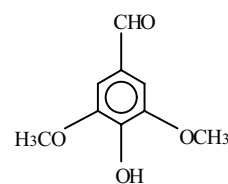
A susceptibilidade de diferentes microrganismos a um mesmo hidrolisado contendo inibidores de fermentação foi estudado por BUCHERT et al. (1988; 1989). Em um desses trabalhos, madeira de bétula foi pré-tratada à 200°C por 15 min (BUCHERT et al., 1989). Uma parte do extrato aquoso foi pós-hidrolisado por enzimas de *Trichoderma reesei* e outra por ácido sulfúrico. Xilose pura e os pós-hidrolisados foram usados como substrato para a produção de ácido xilônico (**9**), etanol e proteína unicelular por *Gluconobacter oxydans*, *Fusarium oxysporum* e *Candida utilis*, respectivamente. Todos os microrganismos fermentaram eficientemente xilose pura. Entretanto, quando os pós-hidrolisados foram usados como fonte de carbono, a fermentescibilidade foi fortemente afetada. *C. utilis* apresentou tolerância aos inibidores nos experimentos contendo xilose em concentrações de até 20 g·L⁻¹. Por outro lado, *F. oxysporum* e *G. oxydans* sofreram forte inibição por parte dos compostos presentes nos dois hidrolisados. Além disso, a inibição variou de um microrganismo para outro em função da concentração de inibidores no hidrolisado. Apesar de terem sido identificados vanilina (**10**), siringaldeído (**11**), álcool coniferílico (**12**), álcool sinapílico (**13**), furfural (**2**), hidroximetilfurfural (**3**) e alguns ácidos orgânicos nos hidrolisados, nenhum teste de toxicidade foi efetuado com esses compostos isolados.



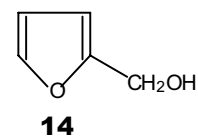
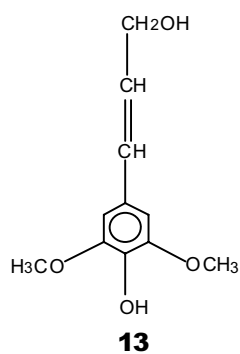
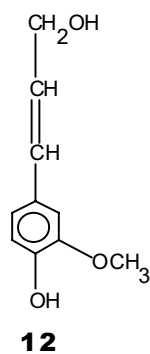
9



10

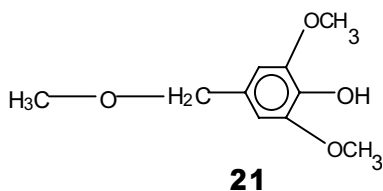
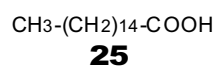
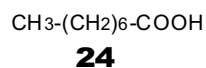
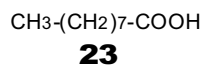
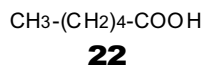
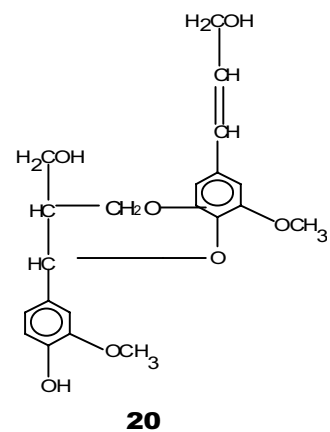
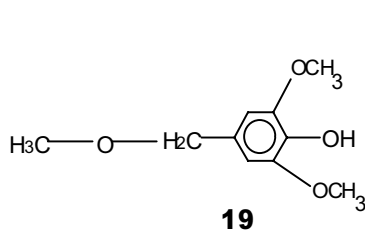
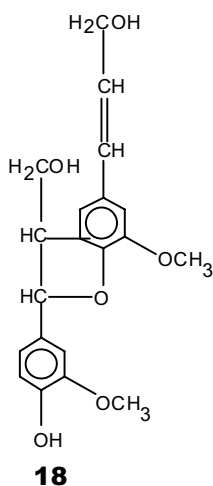
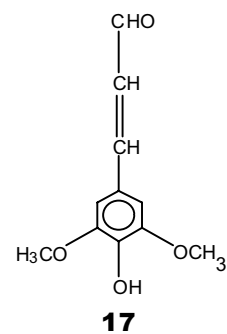
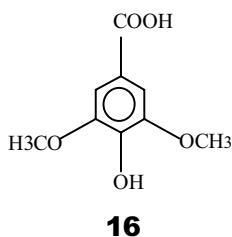
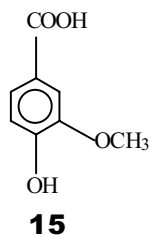


11



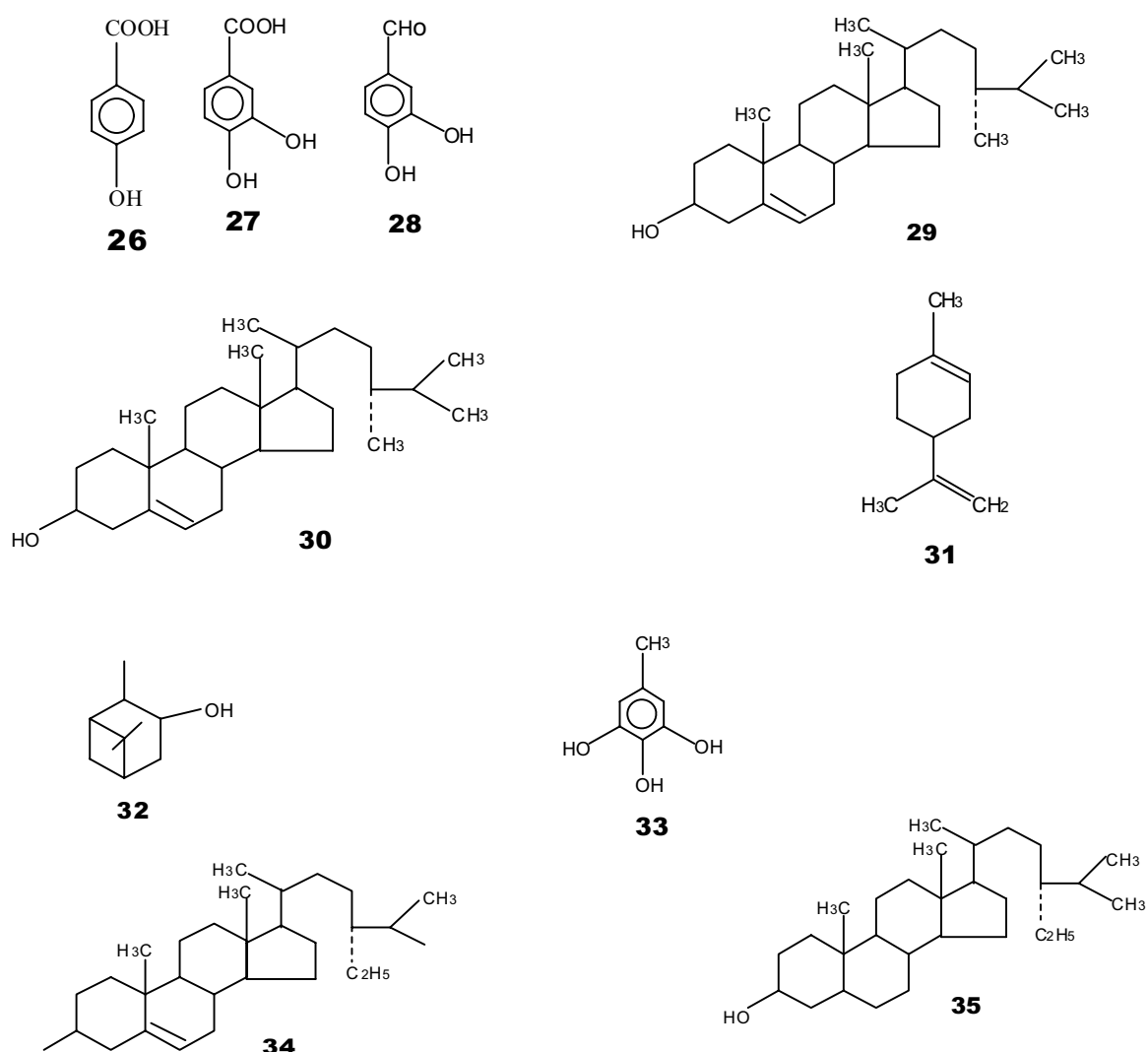
TRAN e CHAMBERS (1985) investigaram a fermentescibilidade, por *Pichia stipitis*, de hidrolisados de xilose produzidos no pré-tratamento de madeira de carvalho na presença de H_2SO_4 . Identificaram e examinaram o efeito inibitório de compostos modelo derivados das polioses, lignina e extrativos dessa madeira. Foram identificados e quantificados no hidrolisado, vanilina (**10**), siringaldeído (**11**), ácido vanílico (**15**), álcool coniferílico (**12**), ácido siríngico (**16**), aldeído sinapílico (**17**), álcool diidroconiferílico (**18**), siringilmetilcetona (**19**), álcool diidrosinapílico (**20**) e álcool β -oxisinapílico (**21**), todos derivados da lignina. Dos extrativos foram identificados os ácidos capróico (**22**), pelargônico (**23**), caprílico (**24**) e palmítico (**24**). Além desses compostos, o hidrolisado continha outros componentes não identificados.

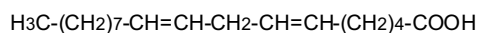
Cada um desses compostos foram misturados a soluções contendo 50 gL^{-1} de xilose e nutrientes (como controle) antes da esterilização e fermentação. Os resultados mostraram que o furfural (**2**) foi mais inibitório que o ácido acético (**1**). Dos modelos de lignina, siringaldeído (**11**) foi menos tóxico que vanilina (**10**) e ácido siríngico (**16**) menos tóxico que o ácido vanílico (**15**). O efeito inibitório em ordem decrescente foi: vanilina > siringaldeído > ácido vanílico > ácido siríngico. Isto significa que os ácidos aromáticos foram menos tóxicos que os aldeídos e que um grupo metoxílico adicional reduziu a toxicidade dos derivados da lignina. Entre os extrativos, os ácidos caproico (**22**), caprílico (**24**) e pelargônico (**23**) foram mais inibitórios do que o ácido palmítico (**25**). O efeito inibitório em ordem decrescente foi: ácido pelargônico > ácido caprílico > ácido capróico > ácido palmítico. Esses resultados mostram que o aumento de tamanho das moléculas é inversamente proporcional ao efeito inibitório. Esses compostos modelo foram testados em concentrações similares às encontradas no hidrolisado de carvalho e o estudo sugeriu que os efeitos inibitórios seriam cumulativos.



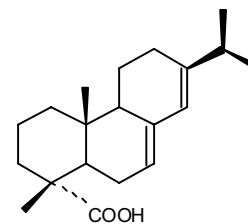
Em outro trabalho, TRAN e CHAMBERS (1986) estudaram a fermentescibilidade de manose para butanodiol por *Klebsiella pneumoniae*, além de identificar e examinar o efeito inibitório dos compostos derivados de lignina e dos extrativos de madeira de pinho pré-tratada com vapor e ácido sulfúrico. Foram testados como compostos modelo, os seguintes derivados de lignina: vanilina (10), ácido vanílico (15), ácido *p*-hidroxibenzóico (26), ácido protocatecólico (27) e protocatecoldeído (28), álcool coniferílico (12) e álcool diidroconiferílico (18); como modelos dos extrativos: campesterol (29), α -pineno (30), D-limoneno (31), borneol (32), pirogalol (33), β -sitosterol (34), estigmastanol (35) e os ácidos linoleico (36), abiético (37) e palmítico (25). Todos os compostos modelo derivados de lignina

exibiram efeito inibitório sobre a fermentação de manose. Os ácidos protocatecúico (**27**) e *p*-hidroxibenzóico (**26**) foram os mais tóxicos. A vanilina (**10**) apresentou a menor toxicidade e a ordem decrescente do efeito inibitório foi: ácido *p*-hidroxibenzóico > ácido protocatecúico > álcool coniferílico > protocatecaldeído > ácido vanílico > álcool diidroconiferílico > vanilina. A combinação de todos os compostos modelo causou toxicidade cumulativa sobre a fermentação de manose a butanodiol. A toxicidade dos compostos modelo dos extrativos decresceu na seguinte ordem: esteróis > resinas ácidas > ácidos graxos > monoterpenos > álcoois mono- ou triterpênicos. Para os compostos em específico, a ordem foi: ácido linoléico > β -sitosterol > ácido abiético > D-limoneno > α -pineno > campesterol > ácido palmítico > borneol > estigmastanol > pirogalol. A comparação dos resultados mostrou ainda que os derivados da lignina foram mais tóxicos do que os extrativos.





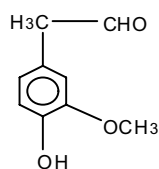
36



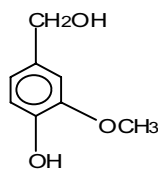
37

Esses autores compararam os resultados de fermentação do hidrolisado sem e com a presença dos compostos citados acima por diferentes métodos. A remoção dos inibidores proporcionou uma melhora no rendimento das fermentações.

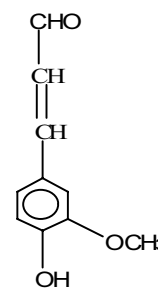
Além dos compostos modelo testados, TRAN e CHAMBERS (1986) identificaram vários derivados da lignina: 4-hidroxi-3-metoxifenilacetaldeído (**38**), álcool vanílico (**39**), aldeído coniferílico (**40**) e álcool β -oxiconiferílico (**41**). Também identificaram os seguintes derivados dos extrativos: α -terpineol (**42**), D-verbenona (**43**) e os ácidos nonanóico (= pelargônico) (**23**), oléico (**44**), esteárico (**45**) e desidroabiético (**46**). Apesar de não terem estudado a toxicidade desses compostos, postularam, com base nos estudos com compostos modelo, que os mesmos devem apresentar efeito inibitório sobre a fermentação de manose para butanodiol.



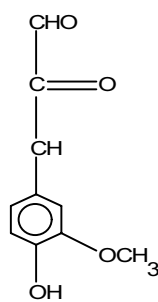
38



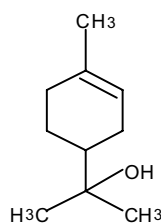
39



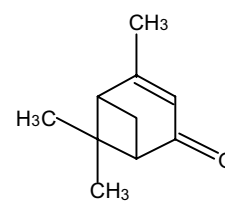
40



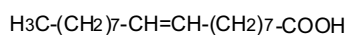
41



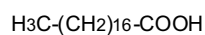
42



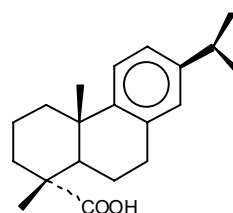
43



44

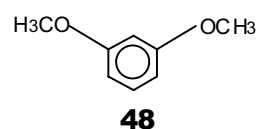
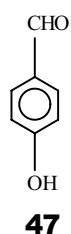


45



46

NISHIKAWA et al. (1988) estudaram a influência de produtos de degradação da lignina sobre a fermentação de xilose para etanol em meio sintético, a partir do mesmo microrganismo (*K. pneumoniae*) estudado por TRAN e CHAMBERS (1986). Ácido *p*-hidroxibenzóico (26), *p*-hidroxibenzaldeído (47), ácido vanílico (15), vanilina (10), álcool vanílico (39), ácido siríngico (16), siringaldeído (11) e dimetoxibenzeno (48) foram testados em concentrações de 0,1 a 0,6 g·L⁻¹. O ácido *p*-hidroxibenzóico (26) e o *p*-hidroxibenzaldeído (47) foram mais inibitórios ao crescimento dos microrganismos e à produção de etanol do que os derivados do tipo guaiacil e siringil. Logo, o efeito inibitório pode estar associado com a ligação desses compostos com enzimas, através das posições 3 e 5 do anel aromático.



LEE e McCASKEY (1983) testaram o efeito de uma mistura de siringaldeído (11) e vanilina (10) no crescimento da levedura *Pachysolen tannophilus* usando como substrato o hidrolisado de *Pinus radiata* e concluíram que o crescimento foi completamente inibido a uma concentração de 2,5 g·L⁻¹, com 50% de inibição a 1,0 g·L⁻¹. Os autores também testaram a toxicidade da vanilina (10) e ácido vanílico (15) na fermentação com *S. cerevisiae* e os resultados mostraram que ocorreu uma inibição completa pela vanilina (10) a 5,0 g·L⁻¹, enquanto 50% da inibição correspondeu a 1,3 g·L⁻¹. Ácido vanílico (15) foi menos inibitório, apresentando 50% de inibição a 3,7 g·L⁻¹.

DELGENES et al. (1996) estudaram o efeito dos produtos de degradação da lignina na fermentação de glucose e xilose a etanol por *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. Para *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*, a intensidade da inibição foi fortemente relacionada com a concentração inicial dos compostos testados. Vanilina (10) apresentou o maior efeito inibitório. Tanto o crescimento quanto a produção de etanol foram totalmente inibidos a uma concentração inicial de vanilina (10) de 1,0 g·L⁻¹. Uma comparação dos compostos modelos de lignina indicaram que siringaldeído (11) foi menos tóxico que *p*-hidroxibenzaldeído (47) para as duas cepas. *S. cerevisiae* foi significativamente inibida pela presença de

furfural (**2**), hidroximetilfurfural (**3**) e vanilina (**10**), que inibiram a ação dessa levedura quando presente em concentrações muito baixas (0,5 g·L⁻¹). *Zymomonas mobilis* foi fortemente inibida na fermentação de glucose por *p*-hidroxibenzaldeído (**47**) (0,5 g·L⁻¹).

RANATUNGA et al. (1997) estudaram a fermentação de xilose para obtenção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* usando como substrato o hidrolisado de uma mistura de madeiras (carvalho vermelho, carvalho branco e álamo amarelo). Vários compostos fenólicos foram testados. Vanilina (**10**) e siringaldeído (**11**), com concentrações de 43 mg·L⁻¹ e 130 mg·L⁻¹, respectivamente, apresentaram os mais altos níveis inibitórios. Ácido vanílico (**15**) (84 mg·L⁻¹) e ácido siríngico (**16**) (93 mg·L⁻¹) tiveram efeitos inibitórios fracos.

FENSKE et al. (1998) compararam os efeitos inibitórios de alguns compostos derivados de lignina em três substratos diferentes: madeira de álamo, “switchgrass” e sabugo de milho. Os compostos aromáticos encontrados no hidrolisado foram ácido *p*-hidroxibenzóico (**26**), ácido cumárico (**49**), siringaldeído (**11**) e vanilina (**10**), cujas concentrações estão mostradas na Tabela 2.

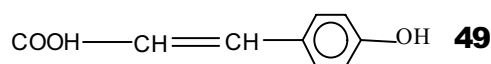


Tabela 2. Compostos derivados de lignina identificados em hidrolisados de álamo, “switchgrass” e sabugo de milho (FENSKE et al., 1998).

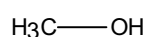
Compostos Substratos	[Ácido <i>p</i> - hidroxibenzóico] (mg·L ⁻¹)	[Ácido cumárico] (mg·L ⁻¹)	[Siringaldeído] (mg·L ⁻¹)	[Vanilina] (mg·L ⁻¹)
Álamo	11,1	n.d.	29,3	15,1
“Switchgrass”	n.d.	7,7	n.d.	16,5
Sabugo de milho	n.d.	10,9	10,0	19,6

n.d. = não detectado.

Os compostos identificados nos três hidrolisados são conhecidos por inibir o metabolismo da levedura *Pichia stipitis*. Desses compostos, siringaldeído (**11**) e vanilina (**10**) são particularmente mais inibidores da produção de etanol e do crescimento microbiano, especialmente quando comparados ao ácido acético ou a

compostos de degradação de açúcares. A vanilina **(10)**, um composto contendo grupo guaiacil, foi mais inibitório que compostos contendo grupos siringil e *p*-hidroxibenzil.

CONVERTI et al. (2000) testaram o efeito de uma mistura de metanol **(50)**, furfural **(2)** e ácido acético **(1)** na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, usando como substrato um meio sintético de xilose. Os níveis iniciais das concentrações desses compostos inibidores variaram de 0 a 100 gL⁻¹ de metanol **(50)**, 0 a 0,7 gL⁻¹ de furfural **(2)** e 0 a 1,3 gL⁻¹ de ácido acético **(1)**. Os resultados mostraram que o metanol **(50)** foi o composto inibidor mais fraco, sendo necessária uma concentração de 17 gL⁻¹ para se obter uma produtividade específica com metade do valor máximo na ausência de inibição. Por outro lado, furfural **(2)** e ácido acético **(1)** foram muito mais fortes, sendo capazes de reduzir a produtividade específica a concentrações de 0,62 gL⁻¹ de furfural **(2)** e 0,71 gL⁻¹ de ácido acético **(1)**. Esses resultados mostraram, portanto, que o furfural **(2)** foi o composto inibidor mais forte na fermentação de xilose por *C. guilliermondii*, seguido por ácido acético **(1)** e metanol **(50)**.

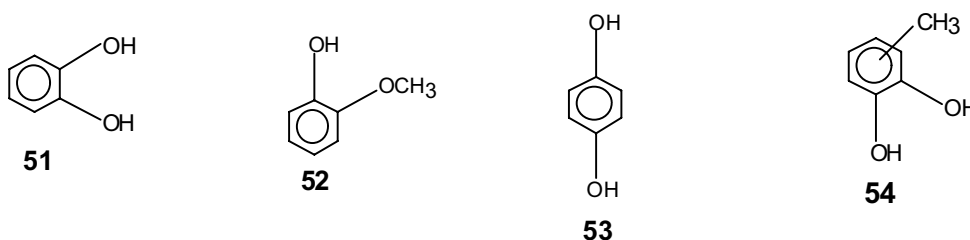


50

ZALDIVAR et al. (2000) estudaram o efeito de álcoois aromáticos encontrados em hidrolisados hemicelulósicos sobre a fermentação de xilose a etanol por *Escherichia coli* recombinante. Sete compostos foram investigados individualmente e em combinações binárias: catecol **(51)**, álcool coniferílico **(12)**, álcool furfurílico **(14)**, guaiacol **(52)**, hidroquinona **(53)**, metilcatecol **(54)** e álcool vanílico **(39)**. Os resultados mostraram que, individualmente, todos os álcoois aromáticos foram mais tóxicos que o álcool furfurílico **(14)**. Metilcatecol **(54)** foi o mais tóxico de todos.

Em relação às combinações binárias, embora muitas delas tivessem apresentado adição da toxicidade (40 – 60% de inibição), as combinações com álcool furfurílico **(14)** foram mais tóxicas (60 – 80% de inibição) que as outras pela soma dos efeitos individuais (sinergismo). Combinações de guaiacol **(52)** e metilcatecol **(54)** apresentaram também efeito sinérgico para inibição de crescimento. Em contraste, as combinações de álcool vanílico **(39)** com todos os álcoois, exceto álcool furfurílico **(14)** foram aditivas (25 – 40% de inibição). As combinações dos álcoois aromáticos com etanol (produto de fermentação) e com furfural **(2)** também foram examinadas. As toxicidades combinadas de etanol com a maioria dos álcoois foram aditivas; etanol e

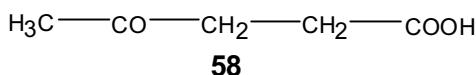
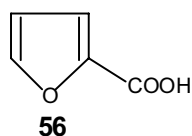
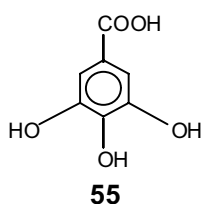
álcool vanílico (**39**) foram as menos aditivas. As combinações de furfural (**2**) foram aditivas com catecol (**51**), álcool coniferílico (**12**) e hidroquinona (**53**), mas os efeitos foram menores com metilcatecol (**54**) e álcool vanílico (**39**). Combinações de furfural (**2**) com álcool furfurílico (**14**) ou guaiacol (**52**) foram muito tóxicas e inibiram o crescimento em 80% e 97%, respectivamente. O estudo do efeito desses álcoois aromáticos na fermentação de xilose mostrou que todos os álcoois inibiram fortemente a fermentação.



Em outro trabalho, ZALDIVAR e INGRAM (1999) estudaram o efeito de ácidos orgânicos encontrados em hidrolisados hemicelulósicos na fermentação de xilose a etanol por *Escherichia coli*. Os compostos testados incluíram ácidos aromáticos derivados da lignina: ácido ferúlico (**6**), ácido gálico (**55**), ácido *p*-hidroxibenzóico (**26**), ácido siríngico (**16**) e ácido vanílico (**15**); ácido acético (**1**), derivado da hidrólise de acetilxilana; e outros derivados da degradação de açúcares: ácido furóico (**56**), ácido fórmico (**57**), ácido levulínico (**58**) e ácido capróico (**22**). Os resultados mostraram que individualmente, o ácido capróico (**22**) foi o composto mais tóxico, seguido de ácido ferúlico (**6**), ácido furóico (**56**) e ácido *p*-hidroxibenzóico (**26**). Ácido fórmico (**57**) foi mais tóxico que os ácido acético (**1**) e levulínico (**58**).

Quanto às combinações binárias, todas as combinações foram aditivas na toxicidade e causaram um decréscimo na massa celular de 40% a 60%. Efeitos combinados com furfural (**2**) foram aditivos para todos os ácidos, exceto com ácido acético (**1**). A combinação de furfural (**2**) e ácido acético (**1**) foi inesperadamente tóxica e causou uma redução no crescimento celular de 80%. As combinações de etanol e ácidos orgânicos também foram testadas e mostraram ser aditivas para a maioria dos ácidos, mas menos aditivas em combinações com ácido fórmico (**57**), ácido ferúlico (**6**) ou ácido *p*-hidroxibenzóico (**26**). O estudo do efeito dos ácidos orgânicos na fermentação de xilose mostraram que a produção de etanol foi inibida em aproximadamente 80% na presença de ácido levulínico (**58**), ácido ferúlico (**6**), ácido *p*-

hidroxibenzoico (**26**) e ácido vanílico (**15**). Inibições menores foram observadas com ácido acético (**1**), ácido capróico (**22**), ácido siríngico (**16**) e ácido gálico (**55**).



MARTÍN et al. (2002) estudaram a produção de etanol a partir de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana utilizando *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente. O bagaço de cana foi pré-tratado por explosão a vapor na faixa de temperatura de 205°C a 215°C e, posteriormente, com enzimas celulolíticas. Os hidrolisados obtidos foram submetidos a dois diferentes processos de destoxificação, com o objetivo de aumentar a fermentescibilidade, ou seja, remover os inibidores anteriormente ao processo de fermentação. Os métodos utilizados foram destoxificação enzimática com lacase e detoxificação química por “overliming”, que envolve o tratamento do hidrolisado hemicelulósico com hidróxido de cálcio - Ca(OH)₂ - até pH 10 ou maior e posterior reacidificação do hidrolisado a pH 5,5 - 6,5 com ácido sulfúrico. Após o tratamento com “overliming”, o hidrolisado é separado do precipitado por filtração e está pronto para ser fermentado (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Aproximadamente 80% dos compostos fenólicos foram removidos pelo tratamento com lacase. “Overliming” removeu parcialmente os compostos fenólicos, como também outros inibidores de fermentação como ácido acético (**1**), furfural (**2**) e hidroximetilfurfural (**3**). Os hidrolisados foram fermentados com uma cepa de *S. cerevisiae* (TMB 3001) geneticamente modificada em laboratório, contendo genes fermentadores de xilose de *Pichia stipitis* e com uma cepa industrial *S. cerevisiae* ATCC 96581. O desempenho fermentativo da cepa obtida em laboratório sobre o hidrolisado não-destoxificado foi maior que o da cepa industrial. Houve um aumento de quase duas vezes na produtividade específica da cepa TMB 3001 sobre o hidrolisado destoxificado, quando comparado com os hidrolisados não-destoxificados. O rendimento de etanol na fermentação com a cepa recombinante do hidrolisado destoxificado por “overliming” foi 0,18 g etanol·g⁻¹ bagaço seco, enquanto que no

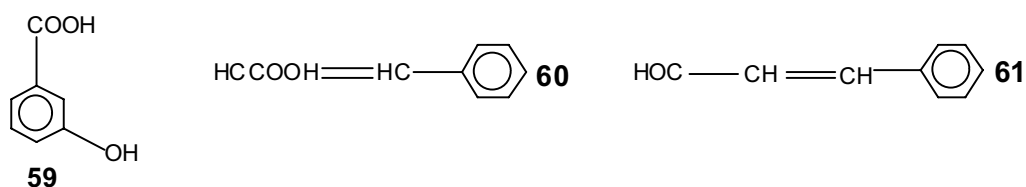
hidrolisado não-destoxificado, o rendimento foi de 0,13 g etanol·g⁻¹ bagaço seco, representando 35% e 25% do rendimento teórico, respectivamente.

Em um outro trabalho, HELLE et al. (2003) compararam o efeito de inibidores na cepa fermentadora de xilose desenvolvida geneticamente *S. cerevisiae* 259ST a três cepas diferentes, incluindo uma cepa mãe (*S. cerevisiae* 259A) e uma cepa industrial. Os inibidores investigados foram ácido acético (**1**), amônia (NH₃) e furfural (**2**). *S. cerevisiae* 259ST mostrou ser uma cepa resistente em relação aos inibidores estudados. Para todos os inibidores testados, a taxa de crescimento celular foi mais severamente inibida que o rendimento de etanol durante a fermentação de glucose. A habilidade da cepa *S. cerevisiae* 259ST para fermentar xilose foi mais severamente afetada que a habilidade de fermentar glucose. Em determinadas concentrações, ácido acético (**1**) pode diminuir a taxa de crescimento celular em 15% e o rendimento de etanol a partir de xilose em 50%, enquanto que amônia pode diminuir o crescimento celular em 20% e o rendimento de etanol a partir de xilose em 45%. A inibição por furfural (**2**) foi verificada apenas nas primeiras horas do processo, pois foi sendo metabolizado a álcool furfurílico, que é um composto menos inibidor. Amônia, quando testado em concentrações acima de 24 g·L⁻¹, não afetou a taxa inicial de produção de etanol a partir de glucose e teve apenas um leve efeito no rendimento de etanol, enquanto que concentrações menores de amônia afetaram a quantidade de etanol obtido a partir de xilose, com um decréscimo de 75% na produção de etanol com 12 g·L⁻¹ de amônia.

Esses trabalhos trataram principalmente do efeito inibitório dos compostos formados em diferentes processos de pré-tratamento sobre a fermentescibilidade de xilose. Resultados semelhantes foram obtidos em fermentações alcoólicas de hidrolisados contendo glucose como substrato, usando-se diferentes microrganismos (CLARK e MACKIE, 1984; DELGENES et al., 1996; PFEIFER et al., 1984).

ANDO et al. (1986) identificaram e determinaram quantitativamente vários compostos aromáticos em hidrolisado de madeira de álamo pré-tratada por explosão a vapor a 205°C por 10 min. A influência desses compostos sobre a fermentação de glucose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada em meio sintético. Siringaldeído (**11**), ácido *m*-hidroxibenzóico (**50**) e ácido siríngico (**16**), em concentrações de até 0,1% (massa /massa seca da madeira pré-tratada), não afetaram a fermentação. Vanilina (**10**) apresentou inibição moderada e foi maior do que o ácido *p*-hidroxibenzóico (**26**), que por sua vez foi maior que do *p*-hidroxibenzaldeído (**47**). O

ácido cinâmico (**51**) e o cinamaldeído (**52**) interromperam a fermentação quase completamente e promoveram um efeito tóxico nas leveduras durante a incubação. A vanilina (**10**) afetou a fermentação no estágio inicial da incubação, mas após 25 h a fermentação foi recuperada e o rendimento final de etanol foi o mesmo do controle. Considerando os resultados de fermentação, os autores estimaram valores empíricos foram estimados para o grau de inibição de cada substituinte presente nos compostos aromáticos examinados: CH=CH = +3,0; CHO = +1,5; *p*-OH = +1,0; COOH = +0,5; *m*-OH = 0 e OCH₃ = -1,0. Segundo esses autores, os valores atribuídos a cada grupo funcional podem ser usados para simular o poder inibitório do mesmo sobre a fermentação. Os resultados obtidos na simulação mostraram-se concordantes com os resultados das fermentações.



LARSSON et al. (1999) estudaram a geração de inibidores na fermentação de manose e glucose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, usando como substrato um hidrolisado de *Picea abies* (conífera). Os efeitos do ácido acético (**1**), ácido fórmico (**57**), ácido levulínico (**58**), furfural (**2**) e hidroximetilfurfural (**3**) no meio de fermentação foram estudados. Os resultados mostraram que, em relação aos efeitos individuais de ácido acético (**1**), ácido fórmico (**57**), ácido levulínico (**58**), quando encontrados a baixas concentrações, o rendimento de etanol foi aumentado, em comparação com a referência de fermentação. A altas concentrações, o ácido fórmico (**57**) foi mais inibitório que o ácido levulínico (**58**), que por sua vez, foi mais inibitório que o ácido acético (**1**). Quando os três ácidos carboxílicos foram adicionados, o rendimento de etanol diminuiu. Quando furfural (**2**) e hidroximetilfurfural (**3**) foram adicionados aos ácidos, o rendimento de etanol foi o mesmo; entretanto, a produtividade diminuiu. O rendimento de etanol, obtido após a adição dos cinco compostos no meio, foi similar ao rendimento obtido nos modelos de fermentação, onde somente o ácido fórmico (**57**) foi adicionado.

PALMQVIST et al. (1996a) estudaram o efeito inibitório de compostos solúveis em água provenientes da madeira de salgueiro, pré-tratada com vapor na presença de SO₂ a 205°C por 6 min, sobre a hidrólise enzimática e a fermentação etanólica por

S. cerevisiae. Os sólidos foram separados do hidrolisado por filtração. O filtrado foi fracionado por destilação a vácuo para render duas frações, uma de voláteis e outra de não voláteis, que foram usadas para a determinação do potencial inibitório dos compostos presentes em cada fração. Os resultados mostraram que os compostos voláteis não afetaram nem a hidrólise enzimática nem a fermentação subsequente da glucose para etanol. Por outro lado, a fração do hidrolisado contendo os compostos não voláteis afetou não só a sacarificação, mas também a fermentação de glucose por *S. cerevisiae*.

Esses trabalhos descritos anteriormente (resumidos nas Tabelas 1 e 3) demonstram que a questão da toxicidade dos compostos presentes nos hidrolisados é bastante complexa. Dependendo do substrato e das condições de pré-tratamento pode-se formar diferentes inibidores em diferentes concentrações. Também para um mesmo hidrolisado, a ação inibitória dos compostos formados no meio depende do tipo de microrganismo utilizado e dos tipos de produtos gerados nos processos fermentativos.

Tabela 3. Compostos inibidores de processos fermentativos.

Substrato	Pré-tratamento	Microorganismo	Reação	Compostos inibidores	Referências
Hidrolisado de bétula	Vapor a 200°C/15 min	1) <i>G. oxydans</i> 2) <i>F. oxysporum</i> 3) <i>C. utilis</i>	Xilose → 1) ácido xilônico 2) etanol 3) proteína unicelular	1) e 2) forte inibição por: vanilina, siringaldeído, álcool coniferílico, álcool sinapílico, furfural, HMF, ácido orgânicos 3) tolerância a concentrações até 20 g·L ⁻¹	BUCHERT et al. (1989)
Hidrolisado de carvalho	H ₂ SO ₄ a 150°C/1h	<i>Pichia stipitidis</i>	Xilose → etanol	Vanilina, siringaldeído, ácido vanílico, álcool coniferílico, ácido siringico, aldeído sinapílico, álcool dihidroconiferílico, álcool β-oxisinapílico, ácido capróico, ácido pelargônico, ácido caprílico, ácido palmítico, furfural, ácido acético	TRAN e CHAMBERS (1985)
Hidrolisado de madeira de pinho	Vapor e H ₂ SO ₄	<i>K. pneumoniae</i>	manose → butanodiol	Vanilina, ácido vanílico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido protocatecico, protocatecoldeído, álcool coniferílico, álcool dihidroconiferílico, campesterol, α-pineno, D-limoneno, borneol, pirogalol, β-sitosterol, estigmastanol, ácido linoleico, ácido abiético, ácido palmítico	TRAN e CHAMBERS (1986)
Hidrolisado de "aspen"	Vapor	<i>K. pneumoniae</i>	Xilose → etanol	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, vanilina, álcool vanílico, siringaldeído, ácido siringico, dimetoxibenzeno	NISHIKAWA et al. (1988)

Tabela 3.(Continuação). Compostos inibidores de processos fermentativos.

Substrato	Pré-tratamento	Microorganismo	Reação	Compostos inibidores	Referências
Hidrolisado de <i>Pinus radiata</i>	Vapor	1) <i>P. tannophilus</i> 2) <i>S. cerevisiae</i>	Xilose → etanol	1) Siringaldeído e vanilina 2) Vanilina e ácido vanílico	LEE e McCASKEY (1983)
Meios sintéticos	-	1) <i>S.cerevisiae</i> e <i>Z. mobilis</i> 2) <i>P. stipititis</i> e <i>C. shehatae</i>	1) glucose→etanol 2) xilose→etanol	Vanilina, siringaldeído, furfural, hidroximetilfurfural, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído	DELGENES et al. (1986)
Hidrolisado de mistura madeiras	Explosão a vapor a 205°C/10 min	<i>Z. mobilis</i>	xilose→etanol	Siringaldeído, vanilina, ácido siringico, ácido vanílico	RANATUNGA et al. (1997)
Hidrolisados de álamo, <i>switchgrass</i> e sabugo de milho	Hidrólise ácida 180°C, H ₂ SO ₄ 1%, 1 min	<i>P. stipititis</i>	xilose→etanol	Siringaldeído, vanilina, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico e ácido cumárico	FENSKE et al. (1998)
Meios sintéticos	-	<i>C. guilliermondii</i>	xilose→xilitol	Metanol, furfural, ácido acético	CONVERTI et al. (2000)
Meios sintéticos	-	<i>E. coli</i>	xilose→etanol	Catecol, álcool coníferico, álcool furfurílico, guaiacol, hidroquinona, metilcatecol, álcool vanílico	ZALDIVAR et al. (2000)

Tabela 3 (Continuação). Compostos inibidores de processos fermentativos.

Substrato	Pré-tratamento	Microorganismo	Reação	Compostos inibidores	Referências
Meios sintéticos	-	<i>E. coli</i>	xilose→etanol	Ácido ferúlico, ácido gálico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido acético, ácido furóico, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido capróico	ZALDIVAR e INGRAM (1999)
Hidrolisados de bagaço de cana	Explosão a vapor/Enzimas celulolíticas	<i>S. cerevisiae</i> Recombinante	xilose→etanol glucose→etanol	Ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, compostos fenólicos	MARTÍN et al. (2002)
Meios sintéticos	-	<i>S. cerevisiae</i> Recombinante	xilose→etanol glucose→etanol	Ácido acético, amônia, furfural	HELLE et al. (2003)
Hidrolisado de álamo	Explosão a vapor a 205°C/10 min	<i>S. cerevisiae</i>	Glucose → etanol	Siringaldeído, ácido <i>m</i> -hidroxibenzoico, ácido siríngico, vanilina, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, <i>p</i> -hidroxibenzaldeído, ácido cinâmico, cinamaldeído	ANDO et al. (1986)
Hidrolisado de <i>Picea abies</i>		<i>S. cerevisiae</i>	manose→etanol glucose→etanol	Ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural, hidroximetilfurfural	LARSSON et al. (1999)
Madeira de salgueiro	Vapor-SO ₂ 205°C/6 min	<i>S. cerevisiae</i>	Glucose → etanol	Compostos não-voláteis → afetaram a fermentação Compostos voláteis → não afetaram a fermentação	PALMQVIST et al. (1996a)

1.5. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL

O etanol tem atraído interesse como combustível líquido, especialmente para transporte, por duas razões: (a) a crise do petróleo em meados dos anos 70 enfatizou a dependência mundial pelo suprimento do petróleo, que pode ser reduzida pelo uso de combustíveis alternativos a partir de fontes renováveis, como o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos (SUN e CHENG, 2002; MARTINEZ et al., 2000) e (b) o processo de produção do etanol utiliza somente energia a partir de fontes renováveis, ocorrendo menos adição de dióxido de carbono na atmosfera em comparação aos combustíveis fósseis, pois o CO₂ emitido é aproveitado na fotossíntese das plantas, contribuindo menos para o agravamento do aquecimento global, o chamado “efeito estufa”, fazendo do etanol uma fonte de energia ambientalmente benéfica. (GRASSI, 1998; ALVO et al., 1996; HAHN-HÄGERDAL, 1996; VON SIVERS e ZACCHI, 1995, 1996).

Em adição, as emissões e a toxicidade dos gases provenientes da combustão do etanol são menores que as dos combustíveis derivados de petróleo (NIGAM, 2002; OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). Deve-se levar em consideração que 2/3 do monóxido de carbono e 1/3 do ozônio produzido atualmente nas grandes cidades são provenientes dos combustíveis usados em veículos de transporte (NIGAM, 2002).

A xilose pode ser fermentada diretamente a etanol por bactérias, leveduras e fungos. Até o momento, as leveduras têm apresentado maior rendimento e produtividade. *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Pichia stipitis* são conhecidas como as leveduras que fermentam mais eficientemente xilose a etanol (EKEN-SARAÇOGLU E ARSLAN, 2000; MEYRIAL et al., 1997; OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996; McMILLAN, 1994b; HAHN-HÄGERDAL et al., 1991; ROBERTO et al., 1991; PRIOR et al., 1989; PAREKH et al., 1988).

A utilização desses microrganismos em processos fermentativos proporciona a obtenção de produtividades razoáveis (0,02-0,66 g de etanol·L⁻¹·h⁻¹) e rendimentos altos de etanol (0,28-0,48 g de etanol por g de substrato), pois o rendimento teórico de etanol a partir de xilose é de 0,51 g de etanol por g de substrato. A fermentação direta requer uma oxigenação baixa e cuidadosamente controlada (PRIOR et al, 1989), bem como a remoção dos inibidores anteriormente à etapa de fermentação. Em adição, o crescimento das leveduras fermentadoras de xilose é completamente inibido por concentrações de etanol acima de 30 g·L⁻¹ (MEYRIAL et al., 1997; HAHN-HÄGERDAL et al., 1991). As

duas principais razões para se obter um rendimento de etanol abaixo do valor teórico são: a co-produção de xilitol, especialmente por *P. tannophilus* e a reassimilação de etanol (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996).

A habilidade de *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para fermentar eficientemente xilose a etanol tem recebido grande atenção, pois podem ser utilizadas sob condições aeróbicas, apesar de serem susceptíveis à inibição por compostos tóxicos, como vanilina, siringaldeído, ácido acético e furfural (NIGAM, 2001; EKEN-SARAÇOGLU e ARSLAN, 2000; SREENATH e JEFFRIES, 2000; FENSKE et al., 1998; DELGENES et al., 1996; SREENATH e JEFFRIES, 1996).

FERRARI et al. (1992) investigaram a produção de etanol partir do hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) usando *Pichia stipitis*. A levedura primeiro consumiu glucose e manose. Depois que as hexoses foram exauridas do meio, a assimilação da xilose foi iniciada. O consumo de xilose foi total.

Em um trabalho apresentado por PAREKH et al. (1988) foram reportados os resultados da pré-hidrólise com vapor catalisada com SO₂ de materiais lignocelulósicos, como pinho, álamo e sabugo de milho. O pré-tratamento permitiu produzir uma mistura de açúcares derivados da hemicelulose e da celulose, que foram fermentados por *Pichia stipitis*. O resultado foi uma eficiente utilização de xilose, com altos rendimentos de etanol e boa tolerância a inibidores. Após o sucesso dos testes de laboratório, uma série de experimentos foi feita em um reator de escala ampliada de 1 m de diâmetro por 5 m de comprimento. Fermentações de hidrolisados por *P. stipitis* contendo tanto pentoses quanto hexoses apresentaram rendimentos de 372, 346 e 388 L de etanol/tonelada seca de biomassa, a partir de pinho, álamo e sabugo de milho, respectivamente.

A pré-hidrólise e a hidrólise podem influenciar a fermentescibilidade do hidrolisado, como, por exemplo, afetar a quantidade e a característica dos inibidores presentes nos hidrolisados. Em um estudo, madeira de álamo foi pré-hidrolisada com vapor e depois hidrolisada, tanto por ácido, como enzimaticamente (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). *P. stipitis* CBS 5776 foi usada para fermentar ambos os hidrolisados e um rendimento de 0,41 g de etanol por g de açúcar e uma produtividade de 0,08 g de etanol·L⁻¹·h⁻¹ foram encontradas no hidrolisado enzimático, enquanto o rendimento de 0,29 g de etanol por g de açúcar e uma produtividade de 0,05 g de etanol·L⁻¹·h⁻¹ foi encontrada no hidrolisado ácido.

FERRARI et al. (1992) relataram a fermentação de hidrolisados de eucalipto usando *P. stipitis* NRRL-Y7124, com um rendimento máximo de etanol de 0,35 g de etanol por g de açúcar (consumo de açúcar de 99%). Por outro lado, *P. tannophilus* produziu 0,39 g de etanol por g de açúcar a partir de hidrolisado ácido de madeira de álamo.

Candida shehatae NCL 3501 foi identificada como uma candidata em potencial para utilizar glicose e xilose rapidamente. Fermentação de xilose pura e de hidrolisado de palha de arroz por *C. shehatae* NCL 3501 livre ou imobilizada sob diferentes condições de cultura foram reportadas por ABBI et al. (1996). Hidrolisados foram obtidos por hidrólise ácida e posterior tratamento com “overliming” e por auto-hidrólise. Quando o hidrolisado obtido através do processo de auto-hidrólise foi usado como substrato para a produção de etanol, rendimentos de 0,45 e 0,5 g de etanol por g de açúcar com células livres e imobilizadas, respectivamente, foram obtidos após 48 horas de fermentação. Com o hidrolisado ácido, o rendimento máximo de etanol baseado no consumo de açúcar foi de 0,43 e 0,47 g de etanol por g com células livres e imobilizadas, respectivamente. O bom desempenho efetuado pelas células imobilizadas, em ambos os tipos de hidrolisados foi possivelmente devido à proteção aos inibidores pelos suportes.

A maior desvantagem do processo de pré-tratamento da biomassa é a produção de compostos tóxicos durante a hidrólise, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural e derivados de lignina (ácidos, álcoois e cetonas), que inibem a fermentação por leveduras. Aparentemente, *C. shehatae* é mais sensível que *P. tannophilus*, *P. stipitis* ou *S. cerevisiae* a inibidores presentes nos hidrolisados. O método de ajuste de pH também tem sido usado na fermentação de hidrolisados ácidos por leveduras. Fermentação por *P. stipitis* CBS 7126 é mais eficiente quando o hidrolisado ácido de bagaço de cana é neutralizado com Ca(OH)_2 do que com MgCO_3 , NaOH ou NH_4OH (PRIOR et al., 1989).

Em algumas investigações, relatadas em PRIOR et al. (1989), os rendimentos e produtividades volumétricas de etanol obtidos nos hidrolisados destoxificados foram similares ou maiores que os reportados para fermentações de xilose pura por várias cepas de *C. shehatae* e *P. stipitis*. Isto sugere que, se os compostos tóxicos são removidos, a composição dos hidrolisados não é afetada, melhorando a habilidade das leveduras a converterem açúcares a etanol.

Como nenhum microrganismo que ocorra naturalmente pode satisfazer todas as especificações necessárias (ex. alto rendimento, alta produtividade, alta tolerância a etanol, tolerância a inibidores presentes no hidrolisado), isto pode ser realizado pela utilização de técnicas modernas de engenharia genética. Esforços têm sido feitos para incorporar as vias metabólicas de pentoses em produtores naturais de etanol, como *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* (ARISTIDOU e PENTTILA, 2000; INGRAM E DORAN, 1995).

A tecnologia de DNA recombinante tem sido desenvolvida para tornar viáveis os processos de fermentação de pentoses. Duas técnicas têm sido utilizadas: incorporação da capacidade de fermentar etanol dentro de bactérias como *E. coli* e *K. oxytoca* e incorporação da capacidade de fermentar pentoses dentro de *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*, bactérias fermentativas capazes de produzir etanol com muita eficiência, mas utilizando hexoses e não pentoses (NOTÍCIAS FAPESP, 1998; DUFF e MURRAY, 1996; HAHN-HÄGERDAL, 1996; GULATI et al., 1996).

As mais promissoras bactérias etanologênicas (que possuem genes capazes de produzir etanol) são *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* e *Klebsiella oxytoca*. Com o uso dessas bactérias, obtêm-se altos rendimentos de etanol, altas produtividades específicas e altas tolerâncias a etanol (ARISTIDOU e PENTTILA, 2000).

No caso da *E. coli* recombinante, as enzimas da via fermentativa de produção de etanol de *Z. mobilis* são inseridas dentro das células de *E. coli*, que utilizam pentoses eficientemente. Isto confere alta produção de etanol por essa bactéria, resultando em microrganismos fermentadores de pentoses que produzem etanol (GULATI et al., 1996) com altos rendimentos (0,44-0,52 g etanol·g açúcar⁻¹) e altas produtividades (0,18-0,96 g etanol·L⁻¹·h⁻¹) (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). Trocas adicionais nos genes foram feitas para prevenir a formação de ácidos orgânicos (HAHN-HÄGERDAL, 1996; OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996).

O uso da cepa *E. coli* B modificada com genes de *Z. mobilis* foram estudados, usando meio sintético e hidrolisados preparados por diferentes processos termo-químicos a partir de uma variedade muito grande de substratos, incluindo madeiras duras (álamo) e madeiras moles (pinho), jornais, licor residual da polpação sulfito e resíduos de milho (LAWFORD e ROUSSEAU, 1993).

HAHN-HÄGERDAL (1996) comparou o desempenho da fermentação de diferentes microrganismos em um hidrolisado ácido de sabugo de milho rico em pentoses e concluíram que *E. coli* recombinante KO11 foi o melhor microrganismo

utilizado para fermentar xilose a etanol. *E. coli* recombinante KO11 fermenta monossacarídeos com alto rendimento e produtividade de etanol mas, em alguns casos, sofre inibição. Apesar da boa fermentescibilidade apresentada por este microrganismo, *E. coli* KO11 é fenotipicamente instável quando cultivada em bateladas repetidas ou culturas contínuas, mostrando um declínio no rendimento de etanol. Em outras experiências, KO11 foi fenotipicamente instável quando incubada por mais que 24 horas em meio sólido a 30°C (DIEN et al., 1998).

OLSSON e HAHN-HÄGERDAL (1996) compararam a ação de *P. stipitis*, *S. cerevisiae* recombinante, *S. cerevisiae* em combinação com xilose isomerase, *F. oxysporum* e *E. coli* recombinante e constataram que a *E. coli* KO11 recombinante foi a melhor escolha para a fermentação de um hidrolisado ácido de sabugo de milho. Com a adição de nutrientes e destoxificação do hidrolisado por “overliming”, o rendimento foi de 0,54 g de etanol/g de açúcar e a produtividade máxima de 1,32 g·L⁻¹·h⁻¹.

DORAN et al. (1994) investigaram o uso de hidrolisado ácido de bagaço de cana para a produção de etanol. A partir de uma tonelada deste material lignocelulósico, aproximadamente 300 kg de açúcar foram produzidos por hidrólise ácida, que puderam ser fermentados para produzir 170 L de etanol (90% de eficiência) pela cepa *E. coli* recombinante KO11. A celulose remanescente pode ser digerida por celulasas comerciais em um processo de SSF usando a bactéria recombinante *Klebsiella oxytoca* P2. Em condições ótimas, a porção celulósica de cada tonelada de celulose tratada com ácido pode render 185 L de etanol adicionais. Dessa maneira, o rendimento projetado de etanol (355 L·ton⁻¹) foi similar ao obtido por tonelada de milho em processos tradicionais de fermentação utilizados nos EUA. A lignina remanescente e os resíduos de carboidratos podem produzir energia necessária para o processo de destilação.

A desvantagem de se utilizar *E. coli* ou *K. oxytoca* recombinantes é que eles crescem em pH neutro, tornando o meio mais susceptível ao crescimento de microrganismos contaminantes. Em adição, o tempo necessário para a fermentação de pentoses a etanol é bem maior que quando se utiliza hexoses. No processo convencional de produção de etanol a partir do caldo de cana, a fermentação por levedura (*S. cerevisiae*) ocorre entre 8 a 10 horas. Em contrapartida, materiais lignocelulósicos são fermentados por *E. coli* recombinante em um período de 30 a 40 horas (NOTÍCIAS FAPESP, 1998).

Com o objetivo de combinar as propriedades fermentadoras de xilose da *Pichia stipitis* com a tolerância a inibidores de *S. cerevisiae*, alguns genes da *Pichia stipitis*

foram clonados e expressos na *S. cerevisiae*. Teoricamente, *S. cerevisiae* modificada pôde fermentar xilose a etanol. Todavia, esta técnica é limitada, pois apenas baixos rendimentos de etanol foram obtidos (HAHN-HÄGERDAL, 1996).

1.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em todos os trabalhos descritos anteriormente, os hidrolisados foram obtidos a partir de um número restrito de madeiras moles, madeiras duras e algumas gramíneas. Além disso, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho sistemático que trate da formação, identificação e inibição dos compostos gerados no pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor e autohidrólise. O uso do bagaço de cana neste estudo é de grande originalidade e importância no país, visto que o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar, gerando, por conseguinte, toneladas de bagaço.

Dessa forma, o estudo do efeito inibitório dos compostos derivados da degradação da lignina e dos carboidratos é de grande importância quando se tem em vista a fermentação de xilose a etanol a partir do bagaço de cana, pois sabe-se que o etanol combustível produzido diretamente, via fermentação de biomassa, é ambientalmente benéfico, diminuindo a emissão de CO₂ na atmosfera, além de ser renovável, ao contrário do petróleo.

O presente trabalho visou caracterizar o hidrolisado hemicelulósico e o bagaço de cana pré-tratado proveniente do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor; identificar e quantificar os compostos presentes no hidrolisado e determinar o efeito inibitório de compostos de baixa massa molar derivados das reações de degradação de carboidratos e da lignina na fermentação de xilose a etanol.

Os testes de fermentação foram feitos com compostos de baixa massa molar utilizando-se *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* e verificou-se que a intensidade de inibição varia com a concentração inicial dos compostos testados. Verificou-se que a grande maioria dos compostos, quando testados em concentrações mais altas, inibiram totalmente o crescimento celular e a produção de etanol.

Verificou-se também que o crescimento celular foi afetado com maior intensidade que o parâmetro de produção de etanol para todos os compostos testados quando utilizada a levedura *Pichia stipitis*, ao contrário da levedura *Candida shehatae*, na qual a ação dos compostos de baixa massa molar foi mais pronunciada para a produção de etanol do que para o crescimento microbiano.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi a caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço pré-tratado proveniente do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor, a identificação e a quantificação dos compostos presentes no hidrolisado e a determinação do efeito inibitório de compostos de baixa massa molar derivados das reações de degradação de carboidratos e da lignina, frente aos processos fermentativos que utilizam xilose como substrato para a obtenção de etanol. Para atingirmos esse objetivo, foram propostas as seguintes etapas de trabalho:

- Caracterização química do bagaço de cana utilizado no pré-tratamento por explosão a vapor;
- Pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana a 190°C por 15 minutos, para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico;
- Caracterização química da fração solubilizada durante o pré-tratamento;
- Caracterização química do bagaço pré-tratado;
- Caracterização microestrutural do bagaço natural, bagaço extraído por etanol 95% e pré-tratado;
- Identificação dos oligômeros de xilose presentes no hidrolisado;
- Isolamento e caracterização dos complexos lignina-carboidrato presentes no hidrolisado;
- Caracterização das frações aquosa e orgânica obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado;
- Realização dos testes de fermentação em meio sintético com compostos modelo e com o hidrolisado obtido no pré-tratamento do bagaço de cana usando como microrganismos *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O procedimento experimental foi dividido em 5 tópicos principais:

1. Preparação (item 3.1) e caracterização química do bagaço de cana (item 3.2);
2. Pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor, em escala de bancada, a 190°C por 15 min (item 3.3);
3. Caracterização química do bagaço pré-tratado (item 3.5) e sua caracterização microestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (item 3.6).
4. Separação, caracterização e quantificação das frações e substâncias geradas no processo de pré-tratamento (itens 3.4; 3.7; 3.8; 3.9; 3.10; 3.11 e 3.12).
5. Testes de fermentação com microrganismos usando-se meios sintéticos e diferentes frações contendo compostos inibidores potenciais de processos fermentativos (item 3.13).

A representação esquemática geral do procedimento experimental é mostrada no diagrama de blocos da figura 5.

3.1. PREPARAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

O bagaço de cana, gentilmente cedido pela Usina Guarani (Olímpia – SP), foi misturado, homogeneizado, quarteado, embalado em sacos de polietileno contendo aproximadamente 1 kg, com umidade média de 50% e armazenado em câmara fria a -20°C, até sua utilização no experimento de explosão a vapor.

Uma amostra de aproximadamente 200 g foi seca em estufa a 60°C, por cerca de 12 h, moída, classificada em partículas de tamanho menor ou igual a 20 mesh e caracterizada quimicamente, de acordo com o procedimento descrito no item 3.2. Uma amostra de fibras de bagaço foi seca ao ar e posteriormente em pentóxido de fósforo (P₂O₅) para análises morfológicas (item 3.6).

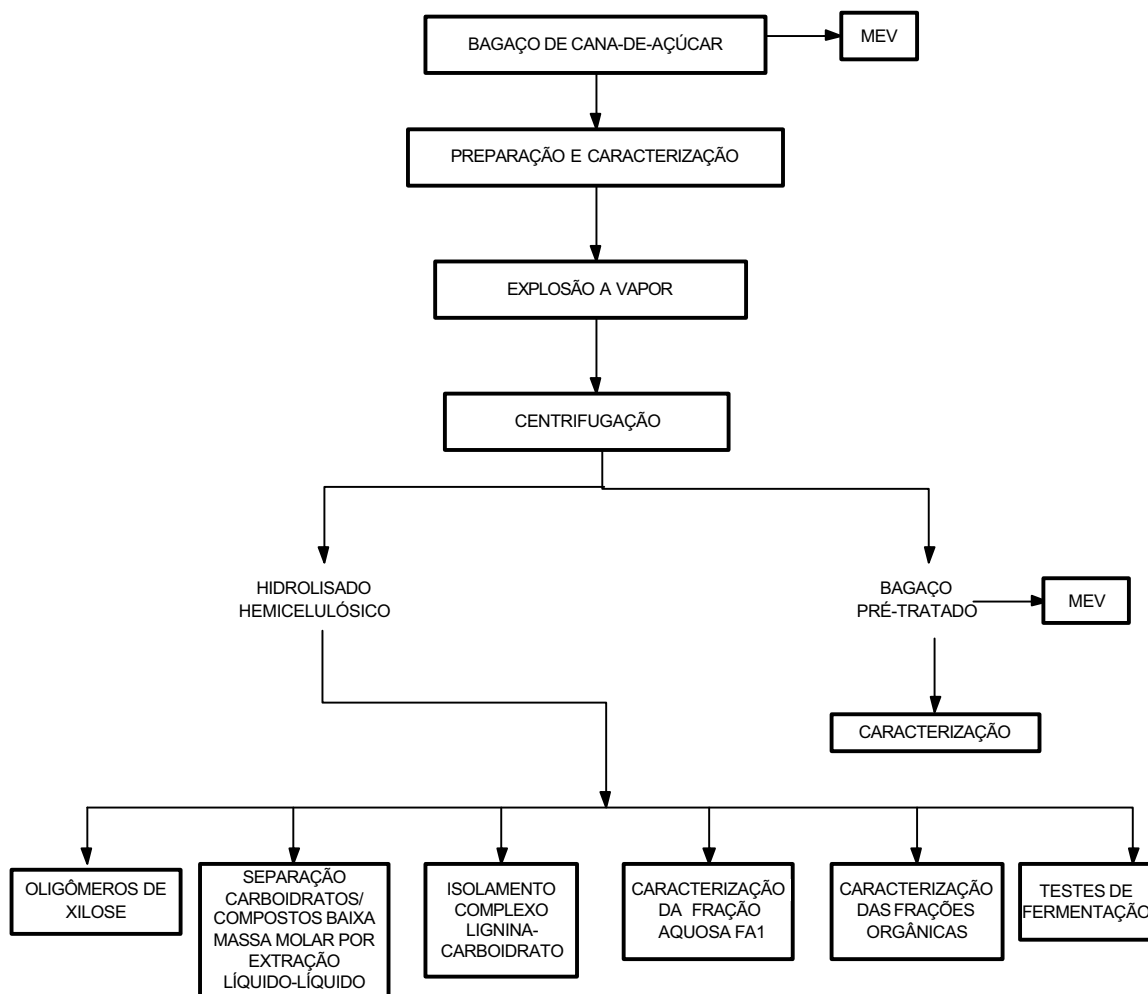


Figura 5. Representação esquemática do processo de separação dos componentes do bagaço de cana por explosão a vapor.

3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA

3.2.1. DETERMINAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS

O bagaço de cana foi extraído com etanol 95% em Soxhlet até o solvente tornar-se incolor (cerca de 10 sifonações). O bagaço extraído foi seco ao ar para evaporação do solvente. Uma alíquota de fibras foi tomada para análises morfológicas (item 3.6) e o restante do bagaço extraído foi seco em estufa a 105°C até massa constante, determinada em balança analítica.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA KLASON INSOLÚVEL EM MEIO ÁCIDO

A quantidade de lignina insolúvel em meio ácido foi determinada de acordo com o método Klason modificado (ASTM, D.1106-56).

Uma amostra de 2 g de bagaço de cana extraído e seco, pesada com incerteza de 0,1 mg, foi transferida para um becher de 100 mL e tratada com 10 mL de H₂SO₄ 72%, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada. A amostra foi transferida quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 mL, usando-se 275 mL de água.

Para a hidrólise completa dos oligômeros restantes, o Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a 1,05 bar. Após a descompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente. A mistura reacional foi primeiramente filtrada para um balão volumétrico de 500 mL, o qual foi posteriormente avolumado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de lignina solúvel, cinzas, carboidratos e furfural e hidroximetilfurfural, de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6, respectivamente.

Os sólidos retidos no papel de filtro foram lavados com aproximadamente 1,2 L de água destilada e secos em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$ até massa constante. O material foi calcinado de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.4. A quantidade de cinzas foi determinada e a massa de lignina determinada por diferença.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA KLASON SOLÚVEL EM MEIO ÁCIDO

A quantidade de lignina solúvel em meio ácido foi determinada conforme metodologia descrita por SILVA (1995).

Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido no item 3.2.2 foi alcalinizada com NaOH 6,5 m.L⁻¹ até pH 12,5 (~ 2 mL) e diluída com água destilada em um balão de 100 mL.

A absorvância da solução em 280 nm foi determinada em um espectrofotômetro UV/Visível de duplo feixe, modelo Cintra 20, usando-se NaOH como referência. A concentração de lignina foi calculada conforme a equação 1.

$$C_{\text{lig}} = (A_{\text{hidr280}} - A_{\text{pd280}}) / \epsilon_{\text{lig}} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

C_{lig} = concentração de lignina, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,

A_{hidr280} = absorvância do hidrolisado contendo a lignina, em 280 nm,

$A_{\text{pd280}} = C_{\text{furf}} \epsilon_{\text{furf}} + C_{\text{hmf}} \epsilon_{\text{hmf}}$ = absorvância em 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), cujas concentrações (C_{furf} e C_{hmf}) e as absorvâncias (ϵ_{furf} e ϵ_{hmf}) foram determinados previamente por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e por UV, respectivamente. Os valores das absorvâncias obtidas para furfural e hidroximetilfurfural foram de $146,85 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $114,00 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente, conforme descrito em SILVA (1995),

ϵ_{lig} = absorvância para lignina de bagaço ($25,20 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (SILVA, 1995).

3.2.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS NO BAGAÇO DE CANA

A determinação do teor de cinzas no bagaço de cana ou lignina foi feita conforme metodologia descrita em SILVA (1995). Cerca de 1,8 a 2,0 g de bagaço de cana, com umidade conhecida, foram pesados, com incerteza de 0,1 mg, em um cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Em seguida, o bagaço de cana foi calcinado inicialmente a 300°C e depois por mais 2 h a 1100°C . Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A massa de cinzas da lignina foi usada para corrigir o teor de lignina insolúvel, determinado no item 3.2.2.

O teor de cinzas foi calculado pela equação 2:

$$\% \text{ czs} = (M_2 - M_1) / M_3 \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde:

$\% \text{ czs}$ = porcentagem em massa de cinzas.

M_1 = massa do cadinho calcinado vazio, em g.

M_2 = massa do cadinho com cinzas, em g.

M_3 = massa de bagaço seco, em g.

3.2.5. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CLAE

Os carboidratos e os ácidos orgânicos presentes no hidrolisado foram identificados em um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo CTO-6A (ROCHA et al., 1997). Uma alíquota de 40 mL do hidrolisado, obtido no item 3.2.2., teve o pH ajustado com NaOH 2 mol.L⁻¹ de 0,6 para a faixa de 1 a 3 e, em seguida, foi diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL .

O hidrolisado ácido foi extraído em cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters), para a remoção de compostos aromáticos e, então, injetado em uma coluna Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd), usando-se H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL·min⁻¹ a 45°C, segundo procedimento descrito por SILVA (1995). Os compostos foram monitorados por um detector de índice de refração (RI) (Shimadzu R10-6A).

As áreas dos picos correspondentes às hexoses e às pentoses foram utilizadas para calcular as massas de glucana e xilana, respectivamente. Essas massas foram divididas pelo peso seco do material inicial e multiplicadas pelo fator de hidrólise. Os fatores de hidrólise para conversão de glucose e celobiose em glucana são 0,90 e 0,95, respectivamente. De maneira similar, xilose e arabinose foram convertidas em xilana e o ácido acético em grupos acetil usando-se os fatores 0,88 e 0,72, respectivamente.

As concentrações de celobiose, glucose, xilose, arabinose e ácido acético foram determinadas a partir de curvas de calibração externa obtidas com padrões analíticos.

3.2.6. DETERMINAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por CLAE em um cromatógrafo líquido Shimadzu em uma coluna Spherisorb (Phase Sep-Pak Ltda) de 150 x 4,6mm, utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL/min a 25°C. O hidrolisado foi previamente diluído com água na razão de 1:100 e filtrado em membrana com diâmetro de poro de 0,47 µm (Millipore) (SILVA, 1995). Os compostos foram detectados a 276 nm, em um detector de ultravioleta (UV/Visível) (Shimadzu SPD-10AV), modelo CTO-10A. As

concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir de curvas de calibração externa obtidas com os compostos puros.

3.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR A 190°C POR 15 MIN

O pré-tratamento do bagaço de cana foi realizado em escala de bancada, usando-se um reator de aço inox 316 com capacidade para 0,65 L, cuja representação esquemática é mostrada na Figura 6 (SILVA, 1995).

No reator [3] pré-aquecido à temperatura de 190°C foram introduzidos, com o auxílio de elevador hidráulico [9], 10 g de bagaço seco, pesados com incerteza de 0,1 mg. O reator foi fechado e o vapor injetado até a temperatura atingir o equilíbrio, o qual permaneceu por 15 min. A válvula de alimentação de vapor [2] foi fechada e a válvula de descompressão [4] aberta imediatamente. Em função da descompressão súbita do reator, o material pré-tratado foi ejetado para o ciclone [5], do qual foi removido quantitativamente com cerca de 500 mL de água destilada. Os experimentos foram realizados em trinta e uma bateladas, gerando uma quantidade de hidrolisado suficiente para a realização de todo o trabalho. Todo material foi armazenado em uma bombona de 50 L e depois transferido para uma centrífuga, marca Mineralmaq (Máquinas para Mineração e Alimentação LTDA). Os solúveis impregnados no bagaço pré-tratado foram separados por centrifugação e o bagaço pré-tratado foi lavado com água a aproximadamente 65°C e centrifugado novamente. Esta operação foi repetida duas vezes. Os filtrados foram armazenados separadamente: a primeira fração (10,5 L), contendo o hidrolisado mais concentrado e as 2 restantes, resultantes de lavagens sucessivas com 3,8 L e 2,1 L de água. Após esse procedimento, o bagaço foi abundantemente lavado com água, durante a operação de centrifugação, até a água de lavagem tornar-se incolor. A água de lavagem foi desprezada e o bagaço foi levado à estufa a 60°C até massa constante, determinada em balança analítica (SILVA, 1995). Em seguida, uma amostra de 100 g de bagaço pré-tratado foi moída e classificada em partículas menores ou iguais a 20 mesh, num moinho do tipo Wiley e, a seguir, caracterizada pelo procedimento descrito no item 3.5.

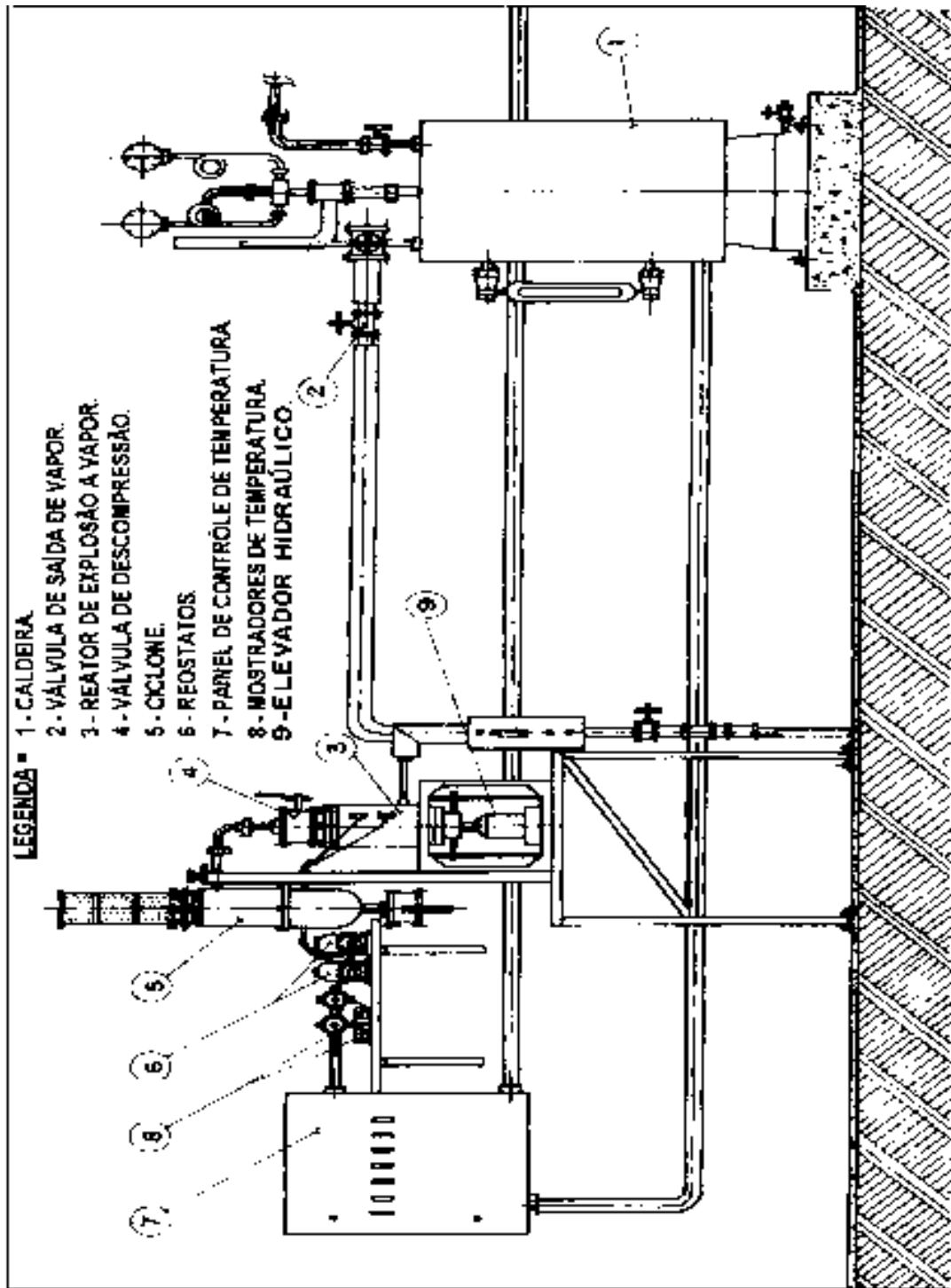


Figura 6. Representação esquemática do sistema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor em escala de bancada.

Uma parte do bagaço pré-tratado (antes da moagem) foi caracterizada por MEV (item 3.6) e o restante do bagaço pré-tratado foi armazenado em sacos de polietileno, que foram fechados e estocados em freezer.

Do filtrado foram retiradas duas alíquotas de 5 mL, sendo uma para análise da lignina solúvel (item 3.2.3) e a outra para análise do hidroximetilfurfural e do furfural (item 3.2.6), além de uma alíquota de 40 mL, para determinação das concentrações dos monômeros de açúcares (item 3.2.5), do ácido acético livre (item 3.2.5) e dos oligômeros de xilose (item 3.4).

Outra alíquota de 250 mL foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL e acidificada com H₂SO₄ a pH 0,6. O frasco foi fechado com papel alumínio e a amostra foi autoclavada por 30 min a 1,05 bar para a hidrólise completa dos oligômeros presentes. O hidrolisado foi avolumado para 500 mL, dos quais foram retiradas duas alíquotas: uma de 5 mL, para determinação de lignina solúvel (item 3.2.3) e uma de 40 mL para determinação de carboidratos e de seus produtos de decomposição por CLAE (item 3.2.5).

Uma alíquota de aproximadamente 1000 mL do hidrolisado concentrado foi sucessivamente extraída com diferentes solventes, conforme descrito no item 3.7. As frações obtidas, contendo os compostos aromáticos, foram caracterizadas de acordo com dos procedimentos descritos no item 3.12. Para a fração aquosa FA1, foram feitas análises de complexos lignina-carboidrato (item 3.8), FTIR e UV/Visível (item 3.9). Uma alíquota de 500 mL de hidrolisado foi utilizada nos testes de inibição de compostos aromáticos (3.13.7), além de uma outra alíquota de 1000 mL que foi concentrada 3 vezes e utilizada para o mesmo fim.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE XILOSE PRESENTES NO HIDROLISADO

Os oligômeros de xilose presentes no hidrolisado, obtido no item 3.3, foram identificados por CLAE em um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo CTO-6A, conforme metodologia descrita anteriormente (CUNHA, 1999; CUNHA e SILVA, 2001).

Uma alíquota de 40 mL do hidrolisado teve o pH ajustado para 7 com NaOH 2 mol.L⁻¹ e em seguida foi diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL. Os compostos aromáticos foram removidos do hidrolisado por extração em cartuchos

Sep-Pak C₁₈ (Waters). O hidrolisado foi injetado diretamente em uma coluna Aminex HPX-42A (300 X 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a duas pré-colunas: catiônica e aniônica. Como fase móvel foi empregada água bidestilada com vazão de 0,6 mL·min⁻¹, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de Índice de Refração (RI) (Shimadzu R10-6A) (CUNHA, 1999).

A identificação do grau de polimerização dos oligômeros de xilose presentes no hidrolisado foi feita a partir de uma amostra padrão contendo xilose, xilobiase e xilotriose, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Domingos Fontana, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os tempos de retenção da xilotetraose, xilopentaose e xiloexaose foram determinados por extrapolação, a partir do cromatograma obtido da hidrólise ácida de xilana de bétula (Sigma). O procedimento de hidrólise da xilana está descrito no item 3.4.1.

3.4.1. HIDRÓLISE DE XILANA

Uma amostra de 1 g de xilana, pesada com incerteza de 0,1 mg, foi transferida para um becher de 100 mL e tratada com 10 mL de H₂SO₄ 72%, sob vigorosa agitação, em um banho termostaticado. A xilana foi hidrolisada à temperatura ambiente (25°C) por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada. A amostra foi transferida quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 mL, usando-se 275 mL de água (CUNHA, 1999). Em seguida, uma alíquota de 25 mL da amostra foi retirada e o pH elevado a 5,5 com auxílio de Ba(OH)₂. A solução foi filtrada em papel de filtro e injetada diretamente em uma coluna Aminex HPX-42A (300 X 7,8 mm, Bio-rad Laboratories Ltd) acoplada a duas pré-colunas trocadoras de íons: uma catiônica e outra aniônica (Bio-Rad Laboratories Ltd). Como fase móvel foi empregada água bidestilada em vazão de 0,6 mL·min⁻¹, a 45°C. Os compostos foram monitorados em um detector de índice de refração (RI) (Shimadzu R10-6A).

3.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO

A caracterização química do bagaço pré-tratado, obtido pelo procedimento de explosão a vapor, foi feita da mesma maneira que para o bagaço natural, descrito no item 3.2 (SILVA, 1995; CUNHA, 1999). Uma amostra de aproximadamente 50 g foi seca em estufa a 60°C até massa constante, moída, classificada em partículas de

tamanho menor ou igual a 20 mesh e caracterizada quimicamente. Foram feitas análises de lignina insolúvel, lignina solúvel, cinzas, carboidratos e furfural e hidroximetilfurfural, de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6, respectivamente.

3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO BAGAÇO NATURAL E PRÉ-TRATADO

Amostras de fibras de bagaço natural, bagaço extraído com etanol 95% e bagaço pré-tratado foram separadas, secas ao ar e posteriormente em P_2O_5 /vácuo e examinadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 1450 VP (40 Pa de pressão e 10 KV de voltagem de aceleração) usando um detector de elétrons secundários. MEV foi usada para observações de seções longitudinais e transversais dos três tipos de amostras de bagaço de cana.

As amostras foram fixadas em fita dupla face de carbono no suporte de amostras e não houve necessidade de metalização das amostras.

3.7. SEPARAÇÃO DE CARBOIDRATOS E COMPOSTOS AROMÁTICOS PRESENTES NO HIDROLISADO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os carboidratos, os compostos aromáticos derivados de lignina de massa molar mais alta e os compostos aromáticos de baixa massa molar foram separados por extração líquido-líquido do hidrolisado em funil de separação com capacidade de 1L, de acordo com a metodologia descrita em CUNHA (1999) e representada no esquema da Figura 7.

Uma alíquota de 680 mL do hidrolisado, obtido pelo procedimento de explosão a vapor (CUNHA 1999; CUNHA 2001b), foi acidificada com 30 mL de HCl 2 mol.L^{-1} até pH 2,0. Em seguida, o hidrolisado foi extraído com 700 mL de acetato de etila. Após a extração, foram separadas a fração aquosa (690 mL) contendo carboidratos (**FA1**) e a fração orgânica (720 mL), contendo acetato de etila. Uma alíquota de 100 mL da fração orgânica (FO 720 mL) foi evaporada, seca em P_2O_5 , derivatizada e analisada por CG/EM (**FO1**) (item 3.12.2). A alíquota restante da fração orgânica de aproximadamente 620 mL, foi extraída sucessivamente com 3 x 100 mL de uma solução de $NaHCO_3$ saturada e 3 x 100 mL de $NaOH$ 2 mol.L^{-1} . As frações solúveis em

NaHCO₃ e NaOH foram acidificadas com HCl 2 mol.L⁻¹ até pH 2,0 e então extraídas sucessivamente com 3 x 100 mL de diclorometano e 3 x 100 mL de acetato de etila.

A fase aquosa obtida da extração com solução saturada de NaHCO₃ foi acidificada até pH 2,0 com HCl 2 mol.L⁻¹ e extraída com 3 x 100 mL de diclorometano, seguida da separação das fases orgânica e aquosa. O solvente presente na fase orgânica foi evaporado, a amostra foi seca em P₂O₅, derivatizada e analisada por CG/EM (**FO3**). A fase aquosa foi extraída sucessivamente com 3 x 100 mL de acetato de etila, ocorrendo a separação de duas fases: uma aquosa (**FA2**) e outra orgânica (**FO2**). O solvente presente na FO2 foi eliminado por rotaevaporação, a amostra seca em P₂O₅, submetida a derivatização e analisada por CG/EM.

O solvente contido na fração orgânica, proveniente da extração com solução saturada de NaHCO₃ e extraída com NaOH 2 mol.L⁻¹ (FO NaHCO₃/NaOH), foi evaporado e a amostra foi seca em P₂O₅, submetida a derivatização e analisada por CG/EM (**FO6**). A fase aquosa foi acidificada com HCl 2 mol.L⁻¹ até pH 2,0 e extraída sucessivamente com 3 x 100 mL de diclorometano. O solvente foi evaporado, a amostra seca em P₂O₅ submetida a derivatização e analisada por CG/EM (**FO5**). A fase aquosa remanescente foi extraída sucessivamente com 3 x 100 mL de acetato de etila, seguida da separação das fases aquosa (**FA3**) e orgânica (**FO4**), da qual o solvente foi evaporado, a amostra seca em P₂O₅, submetida a derivatização e analisada por CG/EM. As frações aquosas (**FA2** e **FA3**), separadas dos solventes, foram analisadas quanto aos açúcares livres (item 3.2.5) e a fração **FA1** foi analisada para a determinação de complexos lignina-carboidrato (item 3.8), de fragmentos de lignina de maior massa molar por UV/VIS e FTIR (item 3.9), de açúcares livres (item 3.2.5) e de oligômeros de xilose (item 3.4).

Para cada uma das frações orgânicas (FO1 - FO6) foram feitas análises de CG/EM e CG/DIC, conforme descrito nos itens 3.12.2 e 3.12.3, respectivamente, além da caracterização por distribuição de massa molar média aparente (item 3.12.4), espectroscopia de UV-VIS (item 3.12.5), espectroscopia no infravermelho (item 3.12.6) e determinação de grupos funcionais (item 3.12.7).

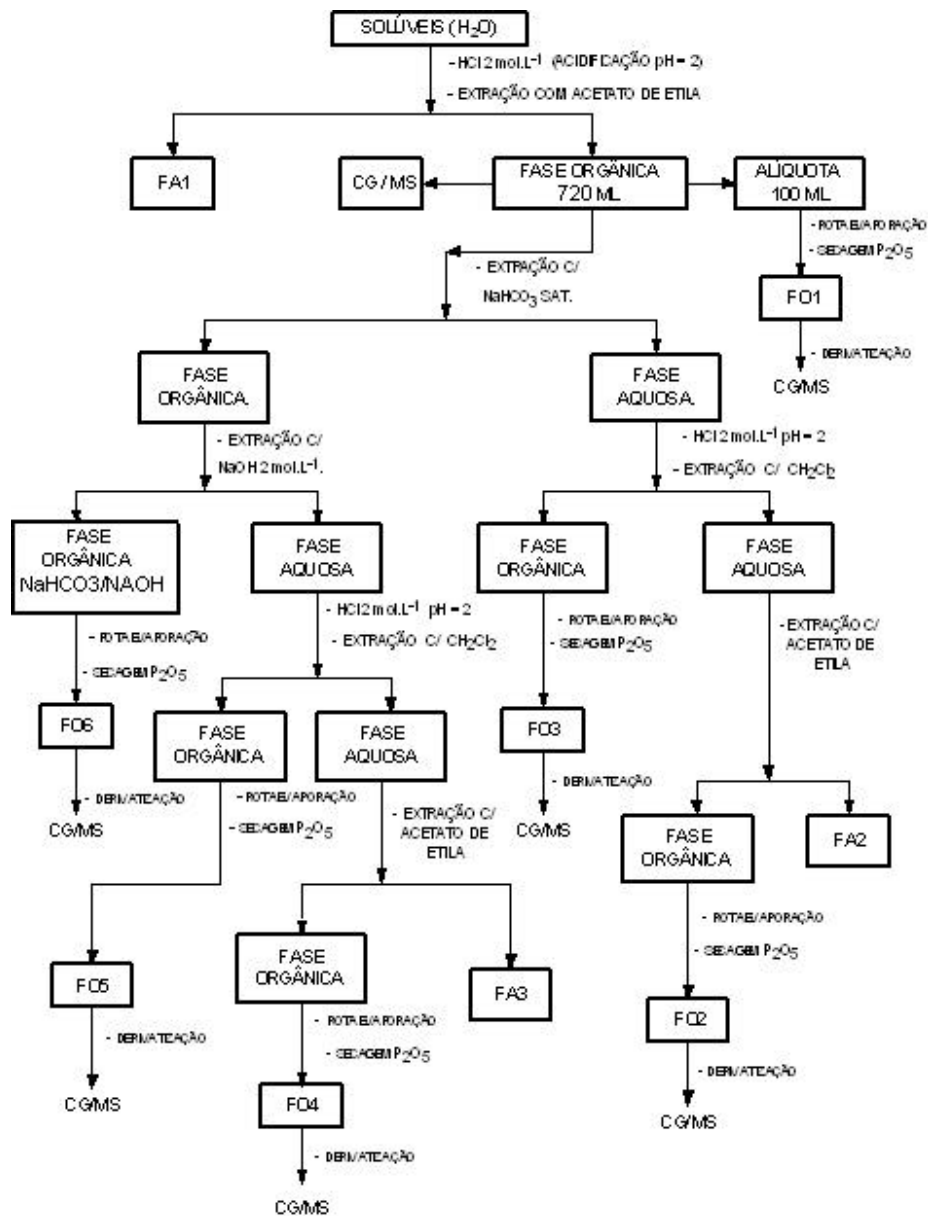


Figura 7. Representação esquemática do processo de extração líquido-líquido dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana com diferentes solventes.

3.8. ISOLAMENTO DOS COMPLEXOS LIGNINA-CARBOIDRATO PRESENTES NA FRAÇÃO AQUOSA FA1

Os complexos lignina-carboidrato, presentes na fração aquosa **FA1** obtida no item 3.7 (Figura 7), foram isolados de acordo com o procedimento experimental descrito a seguir.

Uma alíquota de 50 mL da fração aquosa FA1 (vide item 3.7) foi eluída em um cartucho de extração sólida Sep-Pak C18. A fração adsorvida na C18 foi dessorvida com etanol e seca sob pressão reduzida. As frações eluída e adsorvida no Sep-Pak C18 foram analisadas em um sistema de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) usando Sephadex G50 (Medium) (Pharmacia Labs), de acordo com a metodologia descrita em GUERRA (2001). A fase móvel utilizada foi uma solução de NaOH 0,5 mol·L⁻¹ com fluxo de 0,4 mL·min⁻¹. As amostras foram dissolvidas com NaOH 0,5 mol·L⁻¹ em uma concentração de 2 g·L⁻¹ e 0,4 mL foram injetados diretamente na coluna. Foram coletadas frações de 4,0 mL e as eluições foram monitoradas pelas medidas de absorvância a 280 nm para a lignina e a 480 nm para carboidratos (pentoses), após reação com fenol-ácido sulfúrico.

A reação dos carboidratos com fenol-ácido sulfúrico foi efetuada a partir da adição de alíquotas de 2 mL de cada amostra coletada a 0,05 mL de fenol 80% (8 g de fenol previamente destilado foi dissolvido em 2 mL g de água destilada) e a 5 mL de H₂SO₄ 98%. O tubo foi mantido em repouso por 10 min e depois foi agitado e colocado em banho-maria a 25-30°C por 10-20 min (BROWNING, 1967).

3.9. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO AQUOSA (FA1) POR UV/VIS E FTIR

As frações aquosas (eluída e adsorvida no Sep-Pak C18) derivadas da lignina de massa molar alta presente na fração aquosa **FA1** obtida no item 3.7 (figura 7) foram caracterizadas de acordo com o procedimento experimental descrito a seguir.

Uma alíquota de 20 mL da fração aquosa **FA1** foi eluída em um cartucho de extração sólida Sep-Pak C18 com o objetivo de separar os carboidratos dos compostos aromáticos. A fração adsorvida em C18 foi dessorvida com etanol e seca sob pressão reduzida. A fração eluída foi evaporada sob pressão reduzida e seca em P₂O₅. As frações eluída e adsorvida foram posteriormente analisadas por UV/Visível (item 3.12.5) e FTIR (item 3.12.6).

3.10. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) NAS FRAÇÕES AQUOSAS FA1, FA2 E FA3

Os carboidratos presentes nas frações aquosas FA1, FA2 e FA3, obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7), foram identificados em um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo CTO-10A (ROCHA et al, 1997). Uma alíquota de 20 mL de cada fração aquosa teve o pH ajustado com NaOH 2 mol.L⁻¹ de 0,6 para a faixa de 1 a 3 e, em seguida, foi diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL .

As frações aquosas foram extraídas em cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters) para a remoção de compostos aromáticos e, então, injetadas em uma coluna Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (Bio-Rad Laboratories Ltd), usando-se H₂SO₄ 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL·min⁻¹ a 45°C, segundo procedimento descrito por SILVA (1995). Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração (RI) (Shimadzu R10-6A).

As concentrações de celobiose, glucose, xilose e arabinose foram determinadas a partir de curvas de calibração obtidas com padrões analíticos.

3.11. IDENTIFICAÇÃO DOS OLIGÔMEROS DE XILOSE PRESENTES NA FRAÇÃO AQUOSA FA1

Os oligômeros de xilose presentes na fração aquosa FA1 foram identificados por CLAE em um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo CTO-6A, conforme metodologia descrita em CUNHA (1999) e CUNHA e SILVA (2001c).

Uma alíquota de 20 mL do hidrolisado teve o pH ajustado para 7 com NaOH 2 mol.L⁻¹ e foi em seguida diluída com água destilada em balão volumétrico de 50 mL.

Os compostos aromáticos foram removidos do hidrolisado por extração em cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters). O hidrolisado foi injetado diretamente em uma coluna Aminex HPX-42A (300 X 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) acoplada a duas pré-colunas: catiônica e aniônica. Como fase móvel foi empregada água bidestilada com vazão de 0,6 mL·min⁻¹, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de

RI (Shimadzu R10-6A) e os tempos de retenção foram comparados aos tempos de retenção de uma solução padrão (CUNHA, 1999).

3.12. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS (FO1 - FO6) PROVENIENTES DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO HIDROLISADO POR SOLVENTES ORGÂNICOS

Cada uma das frações orgânicas FO1, FO2, FO3, FO4, FO5 e FO6, obtidas de acordo com o item 3.7, foram caracterizadas quanto à distribuição de massa molar média aparente (item 3.12.4), por espectroscopia de UV-VIS (item 3.12.5), por espectroscopia no Infravermelho (item 3.12.6) e pela determinação de grupos funcionais (item 3.12.7). Além dessas análises, os compostos presentes nessas frações foram identificados por CG/EM (item 3.12.2) e quantificados por CG/DIC (item 3.12.3).

3.12.1. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS DE BAIXA MASSA MOLAR PRESENTES NO HIDROLISADO

Amostras das frações orgânicas FO1 - FO6 foram derivatizadas conforme o item 3.12.1.1 e analisadas por CG/EM (item 3.12.2) e por CG/DIC (item 3.12.3).

3.12.1.1. DERIVATIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE CG/EM E CG/DIC

Cerca de 2 mg de amostra de cada fração acima citada foi rotoevaporada, seca em P₂O₅, pesada e dissolvida em 100 µL de piridina. A seguir foi adicionado 500 µL de N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) às amostras. Os frascos foram fechados e mantidos a 60°C por 1 h (COTRIM, 1990) e resfriados à temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 µL da mistura reacional foi injetada no cromatógrafo mediante fracionamento mecânico (split) na razão de 1:30, usando hélio como diluente.

3.12.2. CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras derivatizadas foram analisadas em um cromatógrafo de gases acoplado a um detector de massas Finnigan, modelo MAT GCQTM, calibrado com perfluorotributilamina (PFTBA) na faixa de varredura de m/z de 20 a 900. Os espectros foram medidos após ionização das moléculas por impacto de elétrons (70 eV). Foi utilizada uma coluna cromatográfica OV-5 0,25 Micron (Ohio Valley) de 30 m x 0,25 mm. O fluxo de hélio usado foi de 33,0 cm/s. A fonte de ionização foi aquecida a 170°C, o injetor a 220°C e a temperatura de transferência de linha a 275°C (CUNHA, 1999).

Para a melhor separação dos compostos presentes nas amostras, foram utilizadas três diferentes rampas de temperatura da coluna, de acordo com as condições mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Programas de temperatura da coluna para análises das frações orgânicas nas análises de CG/EM e CG/DIC (CUNHA, 1999).

AMOSTRAS	INICIAL		INTERMEDIÁRIA			FINAL		
	Temp. (°C)	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Taxa (°C/min)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Taxa (°C/min)
FO2, FO4, FO6	60	1	140	2	15	280	10	2
FO1	80	1	140	4	4	280	25	4
FO3, FO5	60	1	140	3	30	240	13.33	2

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles de bibliotecas de espectros instalados no equipamento de CG/EM, bem como por proposições de fragmentações lógicas.

3.12.3. CROMATOGRAFIA GASOSA/DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA

As amostras derivatizadas foram também analisadas em um cromatógrafo de gases acoplado a um detector de ionização de chama (FID), modelo Varian 3400 CX.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica DB-5 de 30 m x 0,25 mm. O fluxo de hélio usado foi de 33,0 cm/s e split 1:100. Para quantificar compostos fenólicos, o fluoranteno foi utilizado como padrão interno e o programa de temperatura da coluna foi o mesmo empregado nas análises de CG/EM (item 3.12.2).

3.12.4. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR MÉDIA DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

A determinação da massa molar média de cada fração orgânica (FO1-FO6) foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) em uma coluna de 57 x 1,8 cm, preenchida com uma suspensão de Sephadex G-50 em NaOH 0,5 mol·L⁻¹. A fase móvel utilizada foi NaOH 0,5 mol·L⁻¹ com fluxo de 0,4 mL·min⁻¹. O volume de cada amostra injetada foi de 0,4 mL, em concentrações de aproximadamente 2,0 gL⁻¹. Foram coletadas frações de 4,0 mL e a absorbância de cada fração foi lida em 280 nm (FORSS et al., 1988).

A coluna cromatográfica foi previamente calibrada com proteínas de massas molares conhecidas (conforme descrito no item 3.12.4.1), além de uma amostra de lignina de bagaço de cana.

3.12.4.1. CALIBRAÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA DE GPC

A coluna cromatográfica foi calibrada com proteínas de massas molares conhecidas (anidrase carbônica = 29.000 g·mol⁻¹ e citocromo c = 12.400 g·mol⁻¹), além de uma amostra de lignina de bagaço de cana (MM = 4000 g·mol⁻¹), obtida por explosão a vapor e precipitada com HCl (SILVA, 1995). As proteínas e a lignina foram aplicadas na coluna nas mesmas concentrações das amostras (item 3.12.4). Foram usadas, para a determinação dos volumes de exclusão e permeação total, albumina bovina (66.000 g·mol⁻¹) e acetona (58 g·mol⁻¹), respectivamente. O volume médio de eluição das proteínas e da lignina foi transformado em um valor (Kd) que independe do tamanho da coluna, conforme a Equação 3:

$$Kd = (V_{el} - V_0) / (V_t - V_0) \quad \text{(Equação 3)}$$

onde:

V_{el} = volume de eluição;

V_o = volume de exclusão total;

V_t = volume de permeação total.

3.12.4.2. CÁLCULO DOS VALORES DE M_w , M_n E POLIDISPERSIDADE

Os cromatogramas foram integrados em frações de 4 mL, utilizando-se uma planilha de cálculo feita no programa EXCEL 2000. Os valores de M_w (Massa Molar Média em Massa), M_n (Massa Molar Média em Número) e M_w/M_n (Polidispersidade) foram calculados pelas equações 4, 5 e 6, respectivamente:

$$M_w = \frac{\sum (a_i \times M_i)}{\sum a_i} \quad \text{(Equação 4)}$$

$$M_n = \frac{\sum a_i}{\sum (a_i/M_i)} \quad \text{(Equação 5)}$$

$$D = M_w / M_n \quad \text{(Equação 6)}$$

onde: a_i = área do cromatograma sob uma fração "i";

M_i = massa molar da fração "i" obtido por interpolação na curva de calibração (3.12.4.1).

3.12.5. ESPECTROSCOPIA NO UV-VISÍVEL

Os espectros das amostras na região do UV-Visível foram obtidos em um espectrofotômetro U-2001 Spectrophotometer - Hitachi.

Foi preparada uma solução estoque de cada fração orgânica seca (FO1 - FO6) em dioxano/água 96% (10 mg em 1,3 mL de dioxano/água 96%). Uma alíquota de 0,5 mL da solução estoque de cada fração orgânica foi inserida em um balão volumétrico de 10 mL com o auxílio de uma pipeta volumétrica e o volume do balão foi completado com dioxano/água 96%. Este procedimento foi repetido com alíquotas de 0,4 mL, 0,3 mL e 0,1 mL de solução estoque para cada fração orgânica.

Essas soluções de concentrações conhecidas tiveram suas absorbâncias determinadas a 280 nm e 310 nm. A absorvidade de cada fração foi calculada como a inclinação de uma curva que relaciona absorbância versus concentração.

Uma dessas soluções de concentração conhecida foi utilizada para se obter o espectro de UV/Visível contra dioxano/água 96% (GUERRA, 1998).

3.12.6. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

As análises foram feitas através de pastilhas contendo 1,5 mg de amostra em 300 mg de KBr compactadas a 10 – 12 kgf/cm² sob vácuo. Os espectros foram varridos na região de 4.000 a 400 cm⁻¹, número de scans = 8 e resolução = 4 cm⁻¹, em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Spectrometer.

3.12.7. DETERMINAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS

3.12.7.1. DETERMINAÇÃO DE HIDROXILAS FENÓLICAS

O método UV diferencial consiste da varredura de um espectro das soluções das frações orgânicas em meio básico contra a mesma solução em meio ácido, num espectrofotômetro de duplo feixe (espectrofotômetro U-2001 Spectrophotometer - Hitachi). A determinação de hidroxila fenólica foi feita baseando-se na absorvidade média de compostos modelo de lignina, conforme descrito por WEXLER (1964).

Uma solução de cada fração orgânica (diluição das soluções estoque, item 3.6.5, em dioxano/água 1:1), acidificada até pH 1,0 com a adição de HCl 1,0 M, foi utilizada como referência para a obtenção de um espectro UV diferencial, utilizando como amostra uma solução de mesma concentração, porém, basificada a pH 13,0 com NaOH 1M. O espectro foi registrado entre 220-400 nm e teor de hidroxilas fenólicas calculado com base nas absorvidades em 250 nm.

O teor de hidroxilas fenólicas para cada fração orgânica foi calculado pela Equação 7.

$$\%OH \text{ fenólica} = (\Delta_{Abs250nm} \times 0.192) / C_{lig} \quad \text{(Equação 7)}$$

onde:

%OH fenólica = porcentagem de hidroxilas fenólicas,

$\Delta_{Abs250nm}$ = absorvância da solução em 250 nm, subtraída da absorvância relativa à linha de base do espectro, como mostrado no apêndice 1.

0,192 = relação de porcentagem de OH fenólica por absorvidade em 250 nm ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$), determinada para vários compostos modelo (WEXLER, 1964),

C_{lig} = Concentração das soluções das frações orgânicas.

3.12.7.2. DETERMINAÇÃO DE METOXILAS

O teor de metoxilas foi determinado de acordo com a metodologia descrita por FERRAZ et al (1997). Cerca de 8 mg de cada amostra foram pesadas com precisão de 0,1 mg, diretamente em tubos de vidro de 4 mL lacrados com tampa de rosca e septo de Black Viton. A cada amostra foram adicionados 0,25 mL de ácido iodídrico 47% (m/m). A mistura foi aquecida a 125°C em banho de óleo de silicone por 60 min. Após o término da reação, os frascos foram resfriados em gelo por 10 min. Em seguida, foram adicionados através dos septos 0,9 mL de $CHCl_3$ e 1,0 mL de água. Os frascos foram agitados e abertos para a adição de 0,1 mL de 2-iodopropano (4% v/v em $CHCl_3$), utilizado como padrão interno. A fase de clorofórmio foi analisada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Varian 3400 CX, equipado com coluna DB-5 de 30 m x 0,25 mm e Detector de Ionização de Chama (FID).

3.12.8. ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

A análise elementar foi realizada no Instituto de Química da Universidade de Campinas, utilizando-se um equipamento Perkin Elmer (Elemental Analyzer 2400 CHN) e os resultados obtidos foram empregados no cálculo da fórmula mínima das ligninas contidas nas frações orgânicas (FO1-FO6).

3.12.9. ACETILAÇÃO E ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS (FO1-FO6)

Os espectros de RMN- 1H e RMN- ^{13}C foram obtidos de amostras das frações orgânicas acetiladas. A acetilação foi feita de acordo com o procedimento descrito por LENZ (1968). Cerca de 100 mg de cada fração orgânica, pesada com precisão de 0,1 mg, foi dissolvida em 2 mL de piridina e 2 mL de anidrido acético. O frasco foi selado e

o sistema foi deixado a temperatura ambiente no escuro durante 50 h. Ao término da reação, o excesso de anidrido acético foi destruído pela adição de 4 mL de etanol. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, com o auxílio da formação de azeótropo com piridina e etanol. Finalmente, as amostras foram completamente secas em estufa a vácuo com P₂O₅.

Cerca de 30 mg de lignina acetilada foram dissolvidos em 0,5 mL de CDCl₃ e os espectros foram registrados em um espectrômetro VARIAN GEMINI 300 MHz (processo FAPESP 96/12770-8). Espectros de RMN-¹H foram obtidos utilizando-se pulsos de 90° (largura do pulso: 10,5 s), tempo de aquisição de 2,7 s e um total de 16 varreduras (CHEN e ROBERT, 1988). Os espectros de RMN-¹H foram coletados em frequência de 75,462 MHz e foram usados um total de 16.000 scans e pulsos de 16 ms (MONTANÉ et al., 1997). O sinal do CDCl₃ foi usado como referência interna em todas as análises. As mesmas condições foram usadas para obtenção dos espectros de RMN-¹³C.

3.13. TESTES DE INIBIÇÃO DE MICRORGANISMOS EM MEIO FERMENTATIVO POR COMPOSTOS AROMÁTICOS

Os testes iniciais foram feitos em meio sintético com a adição individual de compostos modelo derivados da lignina (Sigma Chemical) nas mesmas concentrações encontradas no hidrolisado, tais como: *p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácidos *trans*-cumárico, ácido ferúlico, siringaldeído, vanilina, ácido vanílico e ácido siríngico (CUNHA, 1999) usando-se *P. stipitis* e *C. shehatae*.

Os compostos modelo foram inseridos nos meios fermentativos sintéticos (para os dois microrganismos) nas concentrações encontradas no hidrolisado (tabela 4), 0,2 gL⁻¹, 1,0 gL⁻¹ e 5,0 gL⁻¹ (item 3.13.6) e comparados com o controle (solução contendo xilose pura).

Esses mesmos testes de inibição foram realizados com o hidrolisado bruto concentrado e não-concentrado, obtido do pré-tratamento por explosão a vapor (item 3.13.7).

3.13.1. Microrganismos e preparo do inóculo

A levedura *Candida shehatae* (Y-12858) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Cletus Kurtzman do "Microbial Genomics and Bioprocessing" - National Center for Agricultural Utilization Research - USDA, IL, USA. A levedura *Pichia stipitis* (CBS 5774) foi obtida do Central Bureau Voor Schimmelcultures (CBS) – The Netherlands – e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Nei Pereira Júnior do Departamento de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

A levedura *Candida shehatae* Y-12858 foi conservada a 4°C em ágar inclinado, contendo 3 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g·L⁻¹ de extrato de malte, 5 g·L⁻¹ de peptona e 10 g·L⁻¹ glucose. *Pichia stipitis* CBS 5774 foi conservada a 4°C em ágar inclinado contendo 1,5 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 1,25 g·L⁻¹ de uréia, 1,10 g·L⁻¹ de fosfato bibásico de potássio (KH₂PO₄) e 20 g·L⁻¹ de xilose.

Duas alçadas de células foram transferidas do meio sólido para um frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio de cultura com a seguinte composição: extrato de levedura (1,5 g·L⁻¹), extrato de malte (1,5 g·L⁻¹), peptona (2,5 g·L⁻¹) e xilose (5 g·L⁻¹). Os frascos foram agitados a 150 rpm por um período entre 30-48 horas a 30°C. Após este tempo as células de ambas as leveduras foram centrifugadas a 2000 rpm e ressuspensas em água destilada estéril. Esta suspensão foi utilizada para inocular os frascos contendo o meio de fermentação, sendo a concentração inicial de inóculo em cada frasco de aproximadamente 0,4 g·L⁻¹ (massa seca) nos experimentos efetuados em meio sintético (item 3.13.6) e de 1,1 g·L⁻¹ nos experimentos efetuados com os hidrolisados brutos ou concentrados (item 3.13.7) (TRAN e CHAMBERS, 1986).

3.13.2. Meio de crescimento

Os ensaios de fermentação foram efetuados em meios de cultura contendo peptona (3,5 g·L⁻¹), extrato de levedura (3,0 g·L⁻¹), K₂HPO₄ (2,0 g·L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (1,0 g·L⁻¹) e (NH₄)₂SO₄ (1,0 g·L⁻¹) (TRAN e CHAMBERS, 1986). As soluções de xilose foram preparadas separadamente dos frascos contendo meio de cultura e adicionadas antes da inoculação dos microrganismos. Os meios e as soluções de xilose foram autoclavados a 0,5 atm por 10 min.

3.13.3. Condições de fermentação

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido (item 3.13.2), agitados a 150 rpm em um agitador orbital a 30°C. Amostras foram retiradas em intervalos de 12 horas para avaliação do crescimento celular, produção de etanol, consumo de xilose e pH.

3.13.4. Efeito da concentração de xilose na produção de etanol

Diferentes concentrações de xilose (20 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹, 50 g·L⁻¹, 60 g·L⁻¹, 80 g·L⁻¹ e 100 g·L⁻¹) foram estudadas para a avaliação da produção de etanol e consumo de xilose pelas leveduras *C. shehatae* e *P. stipitis*.

3.13.5. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada a partir de curva de calibração relacionando densidade ótica (600 nm) com massa celular (g·L⁻¹). O pH foi determinado em potenciômetro B374 (Micronal). A concentração de etanol e a concentração de xilose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Shimadzu CTO-6A com detector de Índice de Refração, utilizando-se uma coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) acoplada a duas pré-colunas: uma catiônica e outra aniônica (Bio-Rad) a 45°C, empregando H₂SO₄ 0,005 mol·L⁻¹ como eluente a um fluxo de 0,6 mL·min⁻¹ (CUNHA, 1999). As amostras foram previamente filtradas em cartuchos de extração sólida Sep-Pak C18 (Waters).

3.13.6. Efeito inibitório dos compostos modelo

Os compostos modelo testados, derivados da degradação das hemiceluloses, foram furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético. O furfural e o ácido acético foram redestilados antes do uso nos ensaios de fermentação. Os compostos de baixa massa molar derivados da lignina foram vanilina, siringaldeído, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *trans*-cumárico, ácido ferúlico e ácido *p*-hidroxibenzóico. Todos os reagentes utilizados foram de especificação p.a. (pureza analítica) e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Química. Exceto furfural e ácido acético, todos os outros compostos foram usados sem purificação prévia. Esses

compostos foram testados em diferentes concentrações. Cada composto foi misturado ao meio sintético contendo xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e nutrientes (item 3.13.2) antes da esterilização e fermentação e foram solubilizados na etapa de esterilização (0,5 atm por 10 min).

3.13.7. Efeito inibitório dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana

O efeito dos compostos inibitórios presentes no hidrolisado foi testado com ambas as leveduras, sendo que o hidrolisado puro foi fermentado nas mesmas condições das fermentações efetuadas em meio sintético (item 3.13.3). Foram feitos também testes com o hidrolisado concentrado 3 vezes a 70°C em um concentrador com capacidade para 4 L. Todos os testes foram comparados com o controle (solução contendo xilose pura) para a verificação de inibição de crescimento celular e produção de etanol.

3.13.8. Determinação da eficiência das fermentações

Os resultados das fermentações de xilose utilizando-se a levedura *P. stipitis* foram avaliados quanto ao rendimento e à produtividade volumétrica de etanol (STAMBURY et al., 1995). Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Rendimento de etanol: } Y_{p/s} = -\Delta p / \Delta s = P_f - P_i / S_f - S_i \quad \text{(Equação 8)}$$

onde: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose;
 P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol.

$$\text{Produtividade volumétrica de etanol: } Q_p = \Delta p / \Delta t = P_f - P_i / t_f - t_i \quad \text{(Equação 9)}$$

onde: P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol;
 t_i e t_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR

O bagaço de cana foi pré-tratado por explosão a vapor a 190°C por 15 min, sem a adição de ácidos. Esta condição foi considerada ótima por SILVA (1999), pois mostrou que a solubilização do bagaço foi bastante significativa, sendo identificados 68% dos compostos hidrolisados e o restante foi perdido como produtos de decomposição.

A quantidade de bagaço de cana solubilizado no pré-tratamento a 190°C por 15 min foi de $32,7 \pm 0,3$ %. Este valor foi calculado pela diferença entre a massa de bagaço (base seca) introduzida no reator e a massa de bagaço pré-tratado (base seca) obtida após a remoção da fração solúvel em água (hidrolisado).

A comparação desse valor com os $23,1 \pm 0,4$ %, atribuídos à quantidade de compostos determinados no hidrolisado (Tabela 5), mostrou que $9,6 \pm 0,5$ % do bagaço de cana foi solubilizado para compostos não determinados pela metodologia descrita no item 3.2.

Tabela 5. Balanço de massa do bagaço de cana antes e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min e determinação da quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco.

COMPONENTE	BAGAÇO BRUTO (%)	BAGAÇO PRÉ-TRATADO (%)	COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO* (%)	MATERIAL RECUPERADO** (%)
GLUCANA	37 ± 2	$34,5 \pm 0,7$	$1,32 \pm 0,02$	$35,8 \pm 0,7$
XILANA	30 ± 2	$6,6 \pm 0,1$	$15,6 \pm 0,4$	$22,2 \pm 0,4$
GRUPOS ACETIL	$2,3 \pm 0,1$	$0,47 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$
LIGNINA TOTAL	$22,9 \pm 0,2$	$18,7 \pm 0,2$	$4,49 \pm 0,01$	$23,2 \pm 0,2$
EXTRAÍVEIS	$2,8 \pm 0,7$	n.a	n.a	n.a
CINZAS	$2,5 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	n.a	$1,8 \pm 0,5$
TOTAL	98 ± 3	62 ± 1	$23,1 \pm 0,4$	85 ± 1

n.a = não analisado.

* Composição do hidrolisado considerando-se os componentes quimicamente determinados pela metodologia descrita no item 3.2.

** Calculado pela soma dos componentes presentes no bagaço pré-tratado e no hidrolisado.

Os resultados mostraram que $1,32 \pm 0,02\%$ do bagaço foi solubilizado na forma de glucana (Tabela 9). Este valor representa $7,00 \pm 0,06\%$ do total de glucanas presentes no bagaço de cana. Deste total, $3,56 \pm 0,06\%$ foram recuperados na forma de oligômeros de glucose e hidroximetilfurfural e o restante ($3,4 \pm 0,1\%$) para compostos não identificados (Tabela 9).

A xilana foi o componente que sofreu maior solubilização ($77,88 \pm 0,07\%$), o que representa $15,6 \pm 0,4\%$ do bagaço solubilizado (Tabela 5). Desse total, $52,00 \pm 0,07\%$ foi recuperada na forma de xilose, oligômeros de xilose, furfural, arabinose e arabinose ligada a oligômeros de xilose. Essa maior solubilização, também foi acompanhada de uma grande quantidade de compostos não identificados ($25,9 \pm 0,1\%$). Esses compostos são derivados de furfural, que nas condições de reação tendem a sofrer reação de polimerização, formando resinas furânicas e produtos de condensação com a lignina (FENGEL e WEGENER, 1989).

Os grupos acetil também foram intensamente solubilizados ($79,57 \pm 0,08\%$), equivalendo a $1,8 \pm 0,1\%$ do bagaço inicial (Tabela 5), acompanhando a hidrólise das xilanas. A quantidade de grupos acetil identificados na forma de ácido acético livre e grupos acetil ligados a oligômeros de xilana foi de $78,26 \pm 0,07\%$. Uma pequena fração dos grupos acetil não foi identificada ($1,3\%$).

A lignina sofreu uma solubilização apreciável ($18,34 \pm 0,01\%$). Por outro lado, a quantidade de lignina solúvel no hidrolisado foi de $19,61 \pm 0,01\%$. Estes resultados mostraram que a quantidade total de lignina recuperada foi de $100,87 \pm 0,02\%$, o que demonstra que houve reações de condensação com os produtos de degradação dos açúcares.

Os resultados do pré-tratamento do bagaço de cana realizados nas mesmas condições usados por CUNHA e SILVA (2001) e por SILVA (1995) são apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Balanço de massa do bagaço de cana sem e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min e determinação da quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco (CUNHA e SILVA, 2001).

COMPONENTE	BAGAÇO BRUTO (%)	BAGAÇO PRÉ-TRATADO (%)	COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO* (%)	MATERIAL RECUPERADO** (%)
GLUCANA	39,2 ± 0,9	35,7 ± 0,1	1,25 ± 0,01	37 ± 0,1
XILANA	25,2 ± 0,6	4,2 ± 0,1	14,04 ± 0,06	18,2 ± 0,1
GRUPOS ACETIL	3,5 ± 0,2	0,5960 ± 0,0001	1,189 ± 0,001	1,785 ± 0,001
LIGNINA TOTAL	23 ± 2	19,1 ± 0,3	4,8 ± 0,1	23,9 ± 0,3
EXTRAÍVEIS	2,0 ± 0,1	n.a	n.a	n.a
CINZAS	3,1 ± 0,4	2,29 ± 0,01	n.a	2,29 ± 0,01
TOTAL	96 ± 2	61,9 ± 0,3	21,3 ± 0,2	83,2 ± 0,3

n.a. = não analisado.

* Composição do hidrolisado considerando-se os componentes quimicamente determinados pela metodologia descrita no item 3.2.

** Calculado pela soma dos componentes presentes no bagaço pré-tratado e no hidrolisado.

Tabela 7. Balanço de massa do bagaço de cana sem e após o pré-tratamento a 190°C, 15 min e determinação da quantidade de material recuperado. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco (SILVA, 1995).

COMPONENTE	BAGAÇO BRUTO (%)	BAGAÇO PRÉ-TRATADO (%)	COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO* (%)	MATERIAL RECUPERADO** (%)
GLUCANA	43 ± 1	37,0 ± 0,7	1,5 ± 0,2	38,5 ± 0,7
XILANA	25 ± 1	6,8 ± 0,2	16,2 ± 0,6	23,0 ± 0,6
GRUPOS ACETIL	2,8 ± 0,8	0,33 ± 0,05	2,1 ± 0,5	2,4 ± 0,5
LIGNINA TOTAL	23 ± 2	18,30 ± 0,04	4,6 ± 0,2	22,9 ± 0,2
EXTRAÍVEIS	3,53 ± 0,01	n.a	n.a	n.a
CINZAS	1,5 ± 0,4	1,54 ± 0,08	n.a	1,54 ± 0,08
TOTAL	99 ± 3	64 ± 1	24,4 ± 0,8	88 ± 1

n.a = não analisado.

* Composição do hidrolisado considerando-se os componentes quimicamente determinados pela metodologia descrita no item 3.2.

** Calculado pela soma dos componentes presentes no bagaço pré-tratado e no hidrolisado.

A comparação dos dados das Tabelas 5, 6 e 7 mostra que os resultados obtidos nos diferentes trabalhos foram bastante reprodutíveis. Do ponto de vista estatístico, as únicas diferenças significativas foram em relação ao conteúdo de glucana, que variou de 37 ± 2% para 43 ± 1% em SILVA (1995). As composições do bagaço pré-tratado foram

muito próximas. As principais diferenças se devem à quantidade de xilana, que variou de $6,6 \pm 0,1\%$ para $4,2 \pm 0,1\%$ em CUNHA e SILVA (2001) e ao teor de grupos acetil, que variou de $0,47 \pm 0,03\%$ para $0,5960 \pm 0,0001\%$ em CUNHA e SILVA (2001) e para $0,33 \pm 0,05\%$ em SILVA (1995). Quanto ao hidrolisado, a maior variação foi observada em relação à quantidade de grupos acetil, que variou de $1,8 \pm 0,1\%$ para $1,189 \pm 0,001\%$ em CUNHA e SILVA (2001). O total de material recuperado foi de $85 \pm 1\%$, inferior ao encontrado por SILVA (1995) ($88 \pm 1\%$), contra $83,2 \pm 0,3\%$ em CUNHA e SILVA (2001), sendo a principal diferença sobre o conteúdo de xilana ($22,2 \pm 0,4\%$) contra $18,2 \pm 0,1\%$ (CUNHA e SILVA, 2001). Nestas condições, aproximadamente $19,600 \pm 0,009\%$ da lignina inicial foi solubilizada, como em SILVA (1995) ($20,0 \pm 0,5\%$), contra $20,87 \pm 0,09\%$ (CUNHA e SILVA, 2001). Mesmo considerando as diferenças observadas, os valores apresentados mostraram boa proximidade em todos os trabalhos.

Também, a composição do bagaço de cana pré-tratado nos diferentes trabalhos citados (Tabela 8) foi bastante reprodutível. Apesar das diferenças estatísticas, os resultados não apresentaram discrepâncias significativas, acusando valores bastante próximos.

Tabela 8. Composição química dos componentes do bagaço de cana pré-tratado a 190°C por 15 min, em comparação com os dados obtidos por CUNHA e SILVA (2001) e SILVA (1995).

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (%)	COMPOSIÇÃO (%) (CUNHA E SILVA, 2001)	COMPOSIÇÃO (%) (SILVA, 1995)
GLUCANA	$57,5 \pm 0,1$	$54,2 \pm 0,2$	$62,0 \pm 0,6$
XILANA	$9,9 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,1$
GRUPOS ACETIL	$0,70 \pm 0,04$	$0,9057 \pm 0,0001$	n.d
LIGNINA SOLÚVEL	$0,6 \pm 0,2$	$0,87 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,06$
LIGNINA INSOLÚVEL	$27,3 \pm 0,1$	$28,2 \pm 0,4$	$28,8 \pm 0,2$
LIGNINA TOTAL	$27,9 \pm 0,3$	$29,1 \pm 0,4$	$30,0 \pm 0,2$
EXTRAÍVEIS	n.a	n.a	n.a
CINZAS	$2,7 \pm 0,8$	$3,48 \pm 0,02$	$1,51 \pm 0,01$
TOTAL	99 ± 3	$94,1 \pm 0,6$	$100,8 \pm 0,7$

n.a = não analisado
n.d = não detectado

A distribuição dos componentes presentes no hidrolisado do bagaço de cana, para os pré-tratamentos citados é mostrada na Tabela 9.

Como pode ser visto, os resultados de oligômeros de glucose, hidroximetilfurfural, furfural, arabinose, grupos acetil e lignina solúvel apresentam a mesma magnitude dos resultados reportados por CUNHA e SILVA (2001) e SILVA (1995). A quantidade de oligômeros de xilose ($12,1 \pm 0,3\%$) foi semelhante à encontrada por SILVA (1995) ($12,8 \pm 0,6\%$). Em CUNHA e SILVA (2001), essa quantidade havia sido menor ($10,67 \pm 0,03\%$).

No hidrolisado, $1,32 \pm 0,02\%$ do bagaço solubilizado provieram da celulose, $16,2 \pm 0,3\%$ das poliooses, $1,77 \pm 0,07\%$ dos grupos acetil ligados às poliooses e $4,49 \pm 0,01\%$ da lignina (Tabela 9). A celulose foi solubilizada como oligômeros de glucose ($1,27 \pm 0,02\%$) e hidroximetilfurfural ($0,052 \pm 0,003\%$). As poliooses foram solubilizadas como arabinose livre ($0,573 \pm 0,004\%$), arabinose ligada à oligômeros ($0,26 \pm 0,02\%$), xilose ($2,64 \pm 0,03\%$), furfural ($0,67 \pm 0,04\%$) e oligômeros de xilose ($12,1 \pm 0,3\%$). Os grupos acetil foram hidrolisados a ácido acético livre ($1,02 \pm 0,03\%$) e parte permaneceu ligada a oligômeros ($0,75 \pm 0,06\%$) (Tabela 9). Esses resultados são compatíveis aos encontrados por CUNHA e SILVA (2001) e SILVA (1995).

A quantidade de bagaço hidrolisado a compostos solúveis não identificados foi de $9,1 \pm 0,4\%$, inferior às quantidades encontradas por CUNHA e SILVA (2001) ($12,1 \pm 0,4\%$) e SILVA (1995) ($12 \pm 2\%$). A comparação entre esse valor ($9,1 \pm 0,4\%$), calculado pela soma dos componentes determinados no hidrolisado e entre o valor calculado pela diferença entre a quantidade de bagaço solubilizado e a quantidade de compostos solubilizados no hidrolisado ($9,6 \pm 0,5\%$) (apresentado na página 61) mostrou que não houve diferença entre eles.

Sabe-se que parte desses compostos não identificados são derivados da degradação de carboidratos e da lignina de maior e menor massa molar que não foram identificados, como mencionado anteriormente, pela análise química usual mostrada na parte experimental do trabalho (item 3.2).

A análise dos resultados mostrou que a fração predominante do hidrolisado é composta por xilose e seus oligômeros ($14,7 \pm 0,3\%$ - Tabela 9). A distribuição dos oligômeros de xilose é discutida a seguir.

Tabela 9. Distribuição dos compostos identificados no hidrolisado do pré-tratamento por explosão a vapor a 190°C por 15 min. Quantidades expressas em relação a 100 g de bagaço seco.

COMPONENTE	COMPOSIÇÃO (%)	COMPOSIÇÃO (%)	COMPOSIÇÃO (%)
		(CUNHA e SILVA, 2001)	(SILVA, 1995)
OLIGÔMEROS DE GLUCOSE	1,27 ± 0,02	1,25 ± 0,01	1,4 ± 0,2
HIDROXIMETILFURFURAL	0,052 ± 0,003	0,077 ± 0,004	0,05 ± 0,01
XILOSE	2,64 ± 0,03	2,70 ± 0,01	1,86 ± 0,06
OLIGÔMEROS DE XILOSE	12,1 ± 0,3	10,67 ± 0,03	12,8 ± 0,6
ARABINOSE	0,573 ± 0,004	0,543 ± 0,001	0,63 ± 0,08
ARABINOSE LIGADA A OLIGÔMEROS	0,26 ± 0,02	0,13 ± 0,01	≤ 0,3
FURFURAL	0,67 ± 0,04	0,55 ± 0,03	0,71 ± 0,01
ÁCIDO ACÉTICO	1,02 ± 0,03	1,063 ± 0,002	1,1 ± 0,2
GRUPOS ACETIL LIGADO A OLIGÔMEROS	0,75 ± 0,06	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,7
LIGNINA SOLÚVEL NO HIDROLISADO ANTES DA PÓS-HIDRÓLISE	4,49 ± 0,01	4,75 ± 0,01	4,6 ± 0,2
TOTAL IDENTIFICADO*	23,8 ± 0,3	22,0 ± 0,3	24 ± 2
TOTAL SOLUBILIZADO **	32,9 ± 0,3	34,1 ± 0,2	36,1 ± 0,1
TOTAL SOLUBILIZADO PARA COMPOSTOS NÃO IDENTIFICADOS	9,1 ± 0,4	12,1 ± 0,4	12 ± 2

n.a = não analisado

*valores calculados pela soma de todos os componentes

**calculado pela diferença, em relação à base seca, entre a massa de bagaço introduzida no reator e a massa de bagaço pré-tratado após a remoção da fração solúvel em água (hidrolisado)

4. 2. DETERMINAÇÃO DE OLIGÔMEROS DE XILOSE POR CLAE

A distribuição da xilose e seus oligômeros presentes no hidrolisado foi determinada usando-se uma coluna Aminex HPX-42A (Bio-rad Laboratories Ltd), apropriada para separação de oligossacarídeos. Os resultados estão mostrados na Figura 8.

A distribuição de xilose, xilobiase e xilotriose em uma solução padrão e a distribuição dos produtos de hidrólise de xilana de bétula comercial (Sigma) são mostradas nos cromatogramas das Figuras 9 e 10, respectivamente.

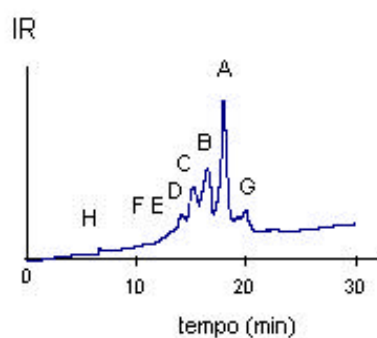


Figura 8. Cromatograma do hidrolisado hemicelulósico obtido por explosão a vapor (190°C/15 min) analisado na coluna Aminex HPX 42A para a determinação de oligômeros.

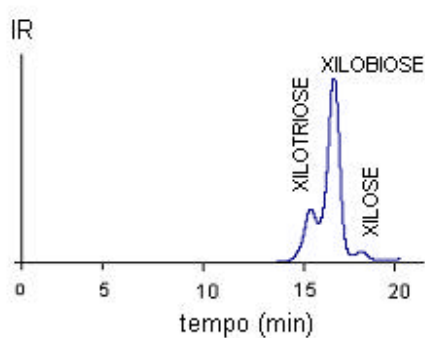


Figura 9. Cromatograma de uma amostra padrão contendo xilose, xilobiose e xilotriose (CUNHA, 1999).

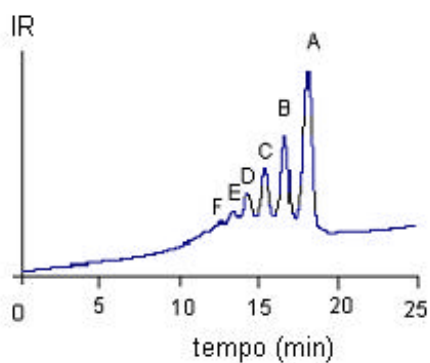


Figura 10. Cromatograma de xilana de bétula comercial hidrolisada com H₂SO₄ 72% a 25° C e analisada na coluna Aminex HPX-42A, em um detector de Índice de Refração (CUNHA, 1999).

A comparação entre os tempos de retenção dos açúcares presentes no hidrolisado do bagaço pré-tratado (Figura 8) com os tempos de retenção dos açúcares presentes na amostra contendo solução padrão (Figura 9) e no hidrolisado de xilana comercial (Figura 10) permitiu atribuir os picos A à xilose ($t_r = 17,982$ min), B à xilobiose ($t_r = 16,5$ min) e C à xilotriose ($t_r = 15,269$ min). Por extrapolação, os picos D, E e F foram atribuídos à xilotetraose ($t_r = 14,133$ min), xilopentaose ($t_r = 13,358$ min) e xilohexaose ($t_r = 12,169$ min), respectivamente.

O pico H ($t_r = 6,5$ min) (Figura 8) pode ser atribuído à fração celulósica de alta massa molar, já que esta fração também foi observada a partir da hidrólise de celulose em determinações feitas anteriormente (CUNHA, 1999).

Desta forma, a análise qualitativa do hidrolisado mostrou a presença de arabinose (pico G), xilose e de oligômeros de xilose com grau de polimerização variando de 2 a 6, com predominância de xilobiose e xilotriose (Figura 8).

Depois da xilose e seus oligômeros, os compostos não identificados pela metodologia descrita no item 3.2 representa a segunda maior fração do hidrolisado ($9,1 \pm 0,4\%$ - Tabela 9), sendo composta de lignina solúvel e seus produtos de degradação, além de complexos lignina-carboidrato.

Os resultados oriundos do fracionamento do hidrolisado por extração líquido-líquido (item 3.7), que teve como objetivo identificar novos compostos, serão discutidos a seguir.

4.3. FRACIONAMENTO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO HIDROLISADO POR EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os carboidratos e os compostos aromáticos presentes no hidrolisado foram separados através de extração líquido-líquido utilizando-se diferentes solventes, de acordo com metodologia descrita no item 3.7, cuja representação esquemática é mostrada de forma simplificada na Figura 7. As quantidades de matéria seca presente nas frações aquosas (FA1 - FA3) e orgânicas (FO1 - FO6), obtidas a partir da extração de 680 mL de hidrolisado, são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Quantidade de matéria seca presente nas frações aquosas (FA1 - FA3) e orgânicas (FO1 - FO6) obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

FRAÇÃO	QUANTIDADE (g)	QUANTIDADE (g)
	em 680 mL de hidrolisado	em 10,5 L de hidrolisado
Fração aquosa (FA1)	2,8725 ± 0,0001	44,355 ± 0,002
Fração orgânica 1 (FO1)	0,6 ± 0,1	10 ± 2
Fração orgânica 2 (FO2)	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Fração orgânica 3 (FO3)	0,098 ± 0,002	1,51 ± 0,03
Fração orgânica 4 (FO4)	0,138 ± 0,001	2,13 ± 0,02
Fração orgânica 5 (FO5)	0,136 ± 0,003	2,10 ± 0,05
Fração orgânica 6 (FO6)	0,2422 ± 0,0002	3,740 ± 0,003
Fração aquosa (FA2)	0,64 ± 0,03	9,9 ± 0,5
Fração aquosa (FA3)	0,9 ± 0,3	14 ± 5

Do bagaço seco submetido à solubilização, cerca de $44,355 \pm 0,002$ g (em relação a 10,5 L de hidrolisado) dos compostos fracionados pelo procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7) ficaram retidos na fração aquosa FA1 e $11,3 \pm 0,2$ g foram distribuídos entre as frações ácidas (FO2 e FO3), fenólicas (FO4 e FO5) e neutra (FO6). Este valor é próximo à massa de compostos presentes na fração orgânica FO1 (10 ± 2 g), chamada de fração total, que deveria englobar todos os compostos identificados nas demais frações orgânicas e não representa diferença estatisticamente significativa.

Além disso, foram obtidos $9,9 \pm 0,5$ g de compostos provenientes da fração aquosa FA2 e $14,0 \pm 5$ g da fração aquosa FA3. A somatória das massas dos compostos presentes nas frações orgânicas (FO2-FO6), FA2 e FA3 perfazem 35 ± 5 g e provavelmente incluem compostos inorgânicos, como o Na_2SO_4 , formados durante o processo de neutralização nas diferentes etapas de extração líquido-líquido. Os compostos presentes na fração FA1 ($44,355 \pm 0,002$ g) englobam os carboidratos e grupos acetil identificados no hidrolisado, além de prováveis complexos lignina-carboidrato, cujos resultados são mostrados e discutidos no item 4.3.1.

4.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO HIDROLISADO

A maior parte dos compostos extraídos do hidrolisado está concentrada na fração aquosa (FA1). Em trabalho anterior (CUNHA, 1999) foi constatado que as frações orgânicas (FO1 - FO6) eram compostas apenas de compostos aromáticos derivados da lignina, enquanto que a fração aquosa FA1 continha predominantemente carboidratos como glucose, xilose, arabinose e oligossacarídeos. Além disso, os resultados apontaram a presença de complexos lignina-carboidrato (LCC) nessa fração, cujas estruturas prováveis foram discutidas por LIN e DENCE (1992), FENGEL e WEGENER (1989), entre outros.

Com relação às frações aquosas FA2 e FA3, BRANDÃO (2000) constatou a ausência de carboidratos e a predominância de etanol e ácido acético, provenientes da hidrólise do acetato de etila utilizado na extração, além de compostos inorgânicos (basicamente NaCl) formados durante as etapas de neutralização do NaHCO_3 e NaOH pelo uso do HCl nas diversas etapas do processo de extração líquido-líquido.

Em trabalho anterior, CUNHA (1999) determinou a distribuição de massa molar de três frações do hidrolisado por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (HPSEC): (1) uma fração filtrada em membrana (Millipore), para a remoção de sólidos; (2) uma fração eluída em um cartucho de extração sólida Sep-Pak C18 e (3) a fração adsorvida em C18 e desorvida com etanol. As amostras foram eluídas em uma coluna Asahipak GS-320 H e os compostos foram monitorados por detector de RI (Shimadzu R10-6A).

A distribuição de massa molar dos compostos presentes no hidrolisado filtrado com membrana mostrou três regiões distintas: uma de alta massa molar (85 a $33 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$), uma região de massa molar intermediária (7195 a $2777 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e outra de massa molar mais baixa (1297 a $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). A distribuição de massa molar da fração eluída em C18, considerada a fração contendo carboidratos, mostrou uma faixa de massa molar mais baixa (1073 a $160 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). A distribuição de massa molar da fração retida em C18 e desorvida com etanol, considerada a fração contendo compostos aromáticos, mostrou uma faixa de massa molar variando de $18 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $2780 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Comparando-se os cromatogramas das três frações, verificou-se que a fração de massa molar compreendida entre 85 kg/mol a 33 kg/mol ficou retida no cartucho de

extração sólida Sep-Pak C18, não sendo detectada nas outras frações, indicando o caráter aromático dos compostos presentes no hidrolisado, o que seria um indício de que essa fração fosse composta de derivados de lignina e/ou de complexos lignina-carboidrato (LCC). Essa hipótese foi reforçada pela presença de carboidratos determinados na fração adsorvida em C18 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Na fração eluída em C18 predominou a presença de carboidratos e a ausência de compostos aromáticos derivados da lignina, o que foi constatado por Espectroscopia no Infravermelho, através de uma banda intensa em 1140 cm^{-1} e da ausência de banda em 1510 cm^{-1} , típica de lignina e seus derivados.

Ainda no trabalho anterior (CUNHA, 1999), o espectro no Infravermelho da fração adsorvida em C18 e dessorvida com etanol mostrou banda em 1510 cm^{-1} , indicando a presença de compostos aromáticos. Adicionalmente, o espectro apresentou uma banda em 1050 cm^{-1} , característica também de carboidratos, o que poderia vir a ser Complexos Lignina-Carboidrato, conforme postulado a partir das análises de HPSEC e CLAE.

De posse dessas informações, uma alíquota de 50 mL da fração aquosa FA1 foi eluída em Sep-Pak C18 e a fração retida foi dessorvida com etanol, de acordo com a metodologia descrita no item 3.8, na tentativa de comprovar a presença de LCC na fração FA1.

A presença de carboidratos na fração FA1, com predominância de oligômeros de xilose, já havia sido observada anteriormente por CLAE (BRANDÃO, 2000). Este fato foi confirmado no atual trabalho, observando-se a presença de monômeros livres como glucose ($1,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), xilose ($20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e arabinose ($4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), através de uma coluna HPX-87H (Bio-Rad Laboratories), além de oligômeros de xilose, detectados em uma coluna HPX-42A (Bio-Rad Laboratories), com graus de polimerização variando de 2 a 5 (picos A - E, respectivamente), conforme mostrado no cromatograma da Figura 11. O cromatograma apresenta também arabinose (G) e uma fração contendo carboidratos de massa molar alta (H), provavelmente oligômeros de glucose (CUNHA, 1999).

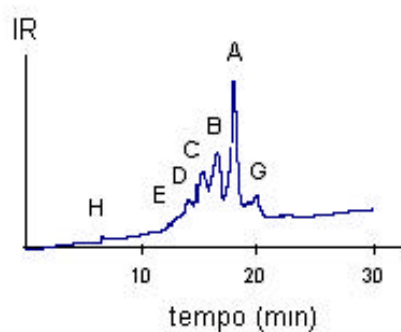


Figura 11. Cromatograma dos oligômeros de xilose presentes na fração FA1 eluída do Sep-Pak C18. Presença de oligômeros com DP variando de 2 a 5, arabinose e uma fração de alta massa molar.

Foram obtidos espectros de UV/VIS da fração FA1 eluída e da adsorvida de C18 por etanol (Figuras 12 e 13, respectivamente). Os espectros UV/VIS de ambas as frações apresentaram absorções máximas em 280 nm e 310 nm, características de ligninas (GOLDSCHMID, 1977), além da absorção na região do visível, sendo que esta foi mais intensa para a fração eluída em C18. O fato de ter ocorrido absorção em 280 nm na fração eluída deve-se ao fato de a quantidade de C18 ter sido insuficiente para reter todos os compostos aromáticos presentes na amostra, em função da quantidade de FA1 eluída.

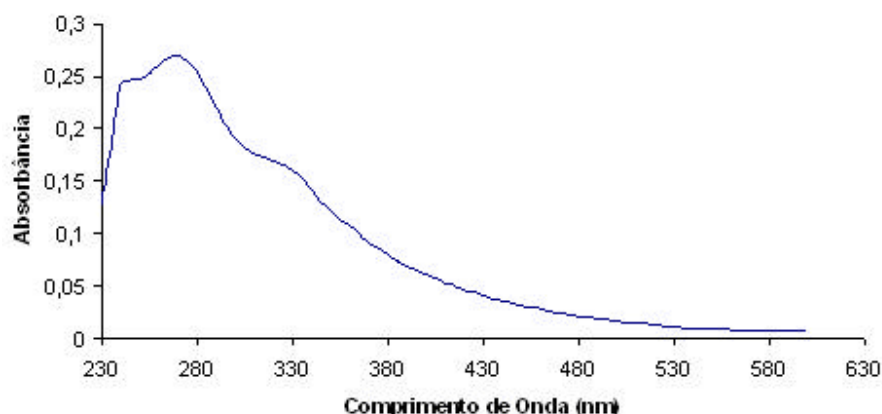


Figura 12. Espectro de UV/Visível da fração FA1 que foi eluída no Sep-Pak C18.

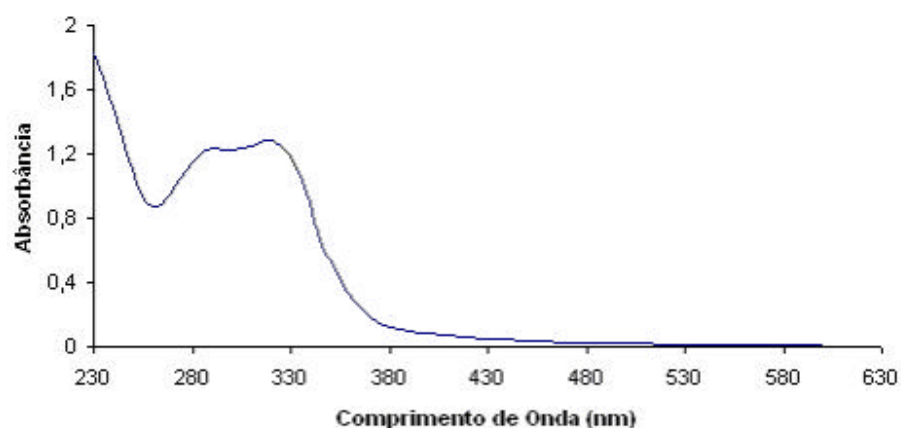


Figura 13. Espectro de UV/Visível da fração FA1 que ficou adsorvida no Sep-Pak C18 e que foi dessorvida com etanol.

As frações FA1 eluída e adsorvida foram secas conforme descrito no item 3.8 e analisadas por Espectroscopia no Infravermelho (item 3.12.6). Ambos os espectros apresentaram bandas características tanto de carboidratos, como de lignina (Figuras 14 e 15, respectivamente).

O espectro de infravermelho da fração FA1 eluída (Figura 14) mostrou bandas em 3418 cm^{-1} , 2964 cm^{-1} e $1094 - 1044\text{ cm}^{-1}$, atribuídas a absorção dos grupos O-H, C-H e C-O, respectivamente, além de uma banda intensa em aproximadamente 1140 cm^{-1} , típicas de carboidratos. Além disso, o espectro da Figura 14, apresenta uma banda 1510 cm^{-1} , de menor intensidade, característica de compostos aromáticos derivados de lignina.

O espectro de infravermelho da FA1 adsorvida em Sep-Pak C18 e dessorvida com etanol apresentou uma banda mais acentuada em 1510 cm^{-1} , indicando a presença de compostos aromáticos derivados da lignina (Figura 15). Todas essas bandas são típicas de lignina do tipo HGS (Tabela 11) (FAIX, 1991).

O espectro mostrou também bandas em 3417 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} e $1094 - 1044\text{ cm}^{-1}$, atribuídas à absorção dos grupos O-H, C=C e C-O, respectivamente. Apresentou ainda uma pequena banda localizada aproximadamente em 1167 cm^{-1} associada à banda em 1125 cm^{-1} .

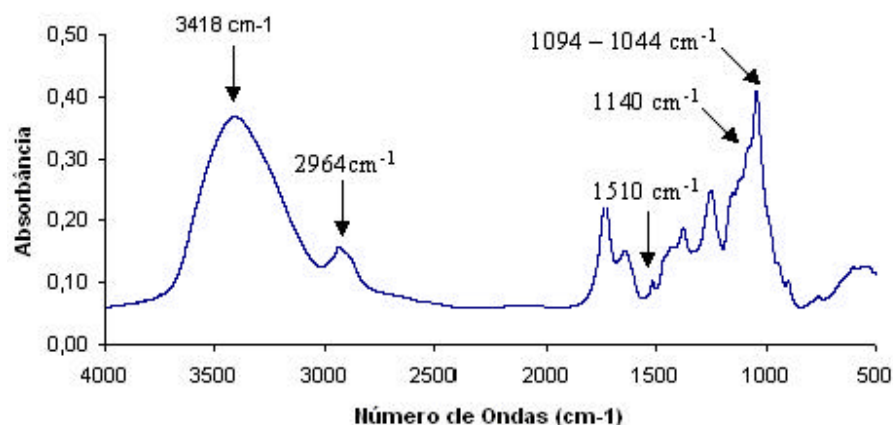


Figura 14. Espectro no Infravermelho dos compostos presentes na fração aquosa FA1 eluída em cartucho de extração sólida Sep-Pak C18.

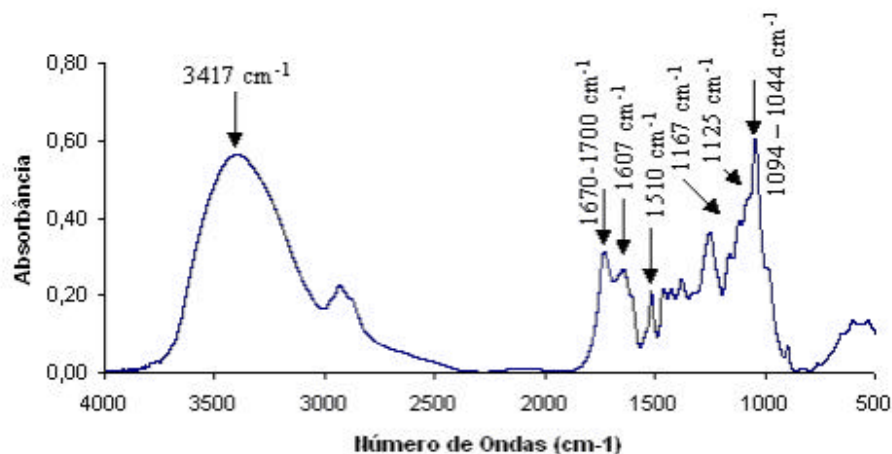


Figura 15. Espectro no Infravermelho dos compostos presentes na fração aquosa FA1 adsorvida em cartucho de extração sólida Sep-Pak C18, desorvida com etanol e concentrada sob pressão reduzida.

As bandas ($1670-1700\text{ cm}^{-1}$) podem ser atribuídas à presença de ésteres dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, que em complexos lignina-carboidrato apresentam-se ligados à arabinose (McDOUGALL et al., 1993). Adicionalmente, o espectro apresenta uma banda em 1050 cm^{-1} , também característica de carboidratos. Essa banda aparece sobreposta à banda atribuída aos derivados de lignina entre $1094 - 1044\text{ cm}^{-1}$, sendo um forte indício da existência de complexos lignina-carboidrato.

Tabela 11. Atribuição das bandas observadas no espectro de infravermelho das ligninas do tipo HGS (FAIX, 1991).

Região de máxima absorção (cm ⁻¹)	Origem da banda
3.420	deformação axial de O-H
2.930	deformação axial C-H Csp ³
1.740 - 1.710	deformação axial C=O de carbonilas não-conjugadas e ácidos carboxílicos
1.655 - 1.670	deformação axial C=O de carbonilas e ácidos carboxílicos conjugados com anéis aromáticos
1.605 - 1.505	deformação angular de anel aromático
1.470 - 1.450	deformação assimétrica de C-H
1.430	deformação angular de anel aromático
1.270 - 1.220	deformação angular de anel tipo guaiacil com estiramento C-O
1.140	deformação fora do plano de C-H aromático do tipo guaiacil
1.090	deformação C-O de álcool secundário e éter alifático
1.035	deformação no plano de C-H aromático do tipo guaiacil e deformação C-O de álcool primário

Os resultados de Espectroscopia de UV/Visível e Infravermelho são uma indicação, mas não uma comprovação da existência de complexos lignina-carboidrato na fração FA1.

A presença de complexos lignina-carboidrato (LCC) foi estudada por OVEREND e JOHNSON (1991), que isolaram quatro frações de polioses de madeira de *Populus deltoides* pela extração do hidrolisado com diferentes solventes (acetato de etila, álcool etílico, etc.). LCC purificados apresentaram a sobreposição dos picos de carboidratos (determinados a partir da reação com fenol-ácido sulfúrico) e absorção no ultravioleta, quando sujeitos à Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). LCC de massa molar aparente alta tiveram alta absorção no ultravioleta, significando menos

carboidratos totais e maior quantidade de compostos aromáticos derivados da lignina, e os LCC de massa molar menor tiveram baixa absorção nessa região, significando mais carboidratos totais e menor quantidade de aromáticos. Todas as amostras de LCC continham proporções de glucose, xilose, manose e ácidos urônicos.

Desta forma, o método fenol-ácido sulfúrico (item 3.8) foi usado com o objetivo de confirmar se na fração aquosa FA1 estão presentes carboidratos provenientes do procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7), além de complexos lignina-carboidrato (LCC). Por esse método, a possível existência de LCC pode ser visualizada pela coeluição de frações contendo carboidratos (480 nm) e frações contendo compostos aromáticos derivados de lignina (280 nm).

A Figura 16 apresenta o cromatograma produzido pela fração FA1, que foi eluída em Sep-Pak C18, e a Figura 17 apresenta o cromatograma produzido pela fração FA1, que ficou adsorvida no Sep-Pak C18 e foi desorvida com etanol. Ambas foram analisadas por GPC e as frações recolhidas foram lidas em 280 nm e 480 nm (item 3.8).

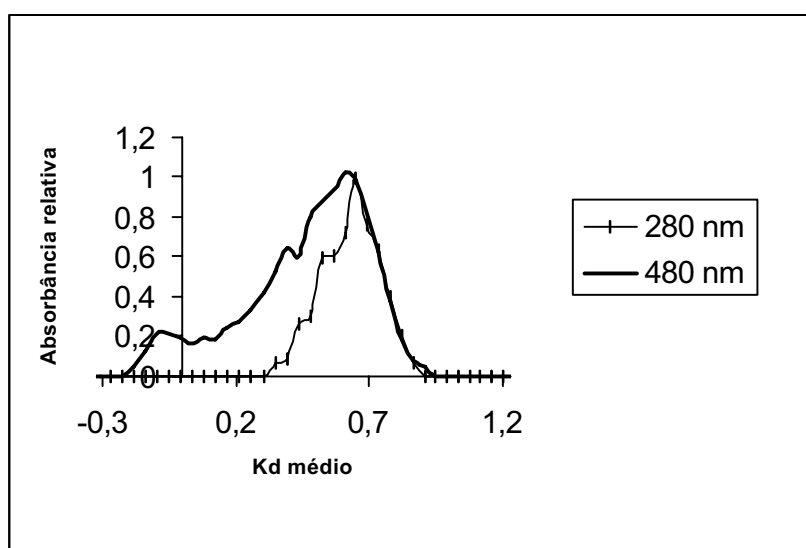


Figura 16. Cromatograma obtido pelo método fenol-ácido sulfúrico da FA1 eluída no Sep-Pak C18, mostrando a coeluição de lignina e carboidratos em Kd variando de 0,3 a 0,9.

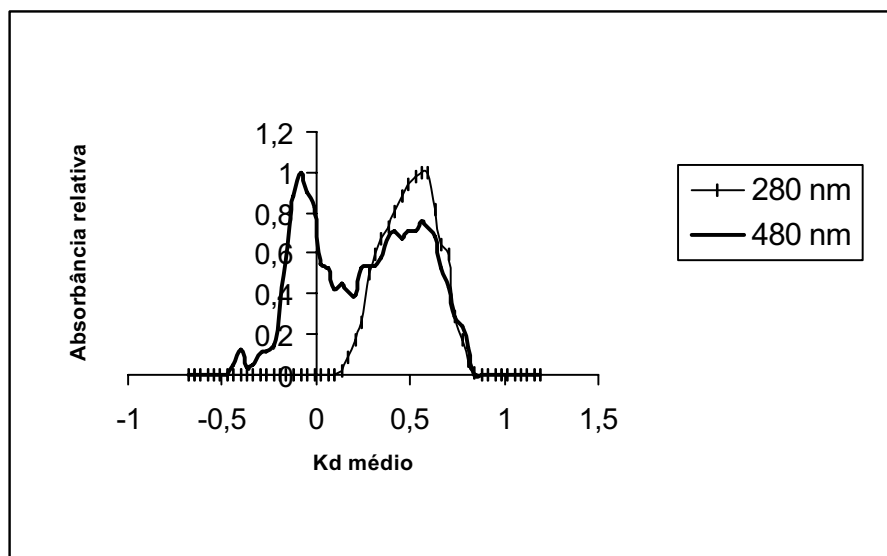


Figura 17. Cromatograma obtido pelo método fenol-ácido sulfúrico da FA1 que foi eluída no Sep-Pak C18 e a fração retida foi desorvida com etanol, mostrando a coeluição de lignina e carboidratos em Kd variando de 0,2 a 0,8.

A fração FA1 eluída, a fração de lignina e carboidratos coeluíram em Kd variando de 0,3 a 0,9, o que corresponde a volumes de eluição entre 114,25 mL a 176,68 mL, respectivamente (Figura 16). O perfil de eluição pode ser um indicativo da presença de interações químicas (co-eluição de lignina e carboidratos) e físicas (eluição separada de lignina e carboidratos), demonstrando que lignina e carboidratos poderiam estar presentes nesta fração, podendo ocorrer complexos lignina-carboidrato (LCC) que permaneceram estáveis após o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Na fração adsorvida em C18 também ocorreu a coeluição de lignina (280 nm) e carboidratos (480 nm), em Kd variando de 0,2 a 0,8, o que corresponde a volumes de eluição variando de 100,63 mL a 165,45 mL, respectivamente (Figura 17). Também significa que pode haver uma interação química entre lignina e carboidratos, o que seria um indício de LCCs, na região da coeluição.

Os volumes eluídos em Kd variando de -0,26 a 0 (Figura 16) na fração eluída e em Kd variando de -0,44 a 0 (Figura 17) na fração adsorvida em C18 são compostos de carboidratos de massa molar mais alta, não sendo detectada a presença de lignina nessas regiões para ambas as frações.

Como os cromatogramas apresentados nas Figuras 16 e 17, com leitura em 480 nm para carboidratos e 280 nm para os compostos aromáticos derivados da lignina,

foram plotados em relação à absorvância relativa, não foi possível evidenciar o predomínio de carboidratos ou lignina nas frações eluída e retida em C18, mas levando-se em conta os espectros no Infravermelho e UV/VIS, a quantidade de fragmentos de lignina na fração retida em C18 é superior à da fração eluída.

Tomando-se por base todas as análises efetuadas com a FA1 por Espectroscopia no UV/VIS, FTIR e GPC, há fortes indícios da presença de complexos lignina-carboidrato nessa fração, além da presença confirmada de carboidratos livres e de oligômeros de xilose determinados por CLAE.

Além da caracterização da fração aquosa FA1, também foram caracterizadas as frações orgânicas (FO1-FO6) obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7) e os resultados obtidos serão mostrados a seguir.

4.3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS OBTIDAS NO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO HIDROLISADO

O isolamento das frações orgânicas FO1-FO6 foi obtido pela acidificação do hidrolisado com HCl $2,0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ até pH 2,0 e extração com acetato de etila, dando origem a uma fração orgânica (FO 720 mL).

Uma alíquota de 100 mL da "FO 720 mL" foi separada para o presente estudo e denominada de FO1, cuja massa seca determinada foi de $10 \pm 2 \text{ g}$ em relação ao volume total de hidrolisado produzido no pré-tratamento (10,5 L) (Tabela 10). O resultado esperado era de que a fração FO1 contivesse todos os compostos aromáticos que deveriam estar presentes nas demais frações orgânicas (FO2 - FO6) obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7). Por esse motivo, a fração FO1 foi denominada de fração total.

As sucessivas extrações da "FO 720 mL" com solução saturada de NaHCO_3 e $\text{NaOH } 2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ foram realizadas com o objetivo de separar os compostos em frações ácidas (FO2 e FO3), fenólicas (FO4 e FO5) e neutra (FO6), de acordo com o procedimento descrito por TANAHASHI et al. (1989) (Figura 7).

Dessa forma, a fração FO2 foi denominada de fração ácida solúvel em acetato de etila e a FO3 de fração solúvel em diclorometano. As quantidades de compostos aromáticos derivados de lignina presentes nessas frações, reportadas em relação à massa

inicial de bagaço, foram de $1,8 \pm 0,21$ g para FO2 e $1,51 \pm 0,03$ g para FO3, valores estes bastante próximos entre si (Tabela 10).

A fração FO4 foi denominada de fração fenólica solúvel em acetato de etila e a fração FO5 de solúvel em diclorometano. As quantidades de compostos aromáticos derivados da lignina presentes nas frações fenólicas, reportadas em relação à massa inicial de bagaço, foram de $2,13 \pm 0,02$ g para FO4 e $2,10 \pm 0,05$ g para FO5, valores também bastante próximos entre si (Tabela 10).

A fase orgânica FO6 (fração neutra) totalizou $3,740 \pm 0,003$ g (Tabela 10) de compostos extraídos pelo procedimento de extração líquido-líquido (item 3.7).

A comparação dos resultados obtidos nessas frações com os resultados obtidos anteriormente (CUNHA, 1999) mostrou que as quantidades dos compostos aromáticos presentes nas frações orgânicas foram bem próximas, exceto para as frações FO3 e FO5, cujas massas encontradas em CUNHA (1999) foram de apenas 0,002g nas duas frações.

As referidas frações orgânicas apresentaram em sua composição derivados de lignina de alta e baixa massa molar. Alguns dos derivados de baixa massa molar foram identificados por CG/EM e os resultados serão discutidos a seguir.

4.3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

Os cromatogramas obtidos pela análise por CG/EM e CG/DIC da fração FO1 seca em P_2O_5 e derivatizada com BSTFA são apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. A atribuição dos picos dos compostos identificados, bem como os respectivos tempos de retenção, massa molares dos compostos não sililados (não sil), massa dos íons moleculares dos derivados sililados (sil), massa e quantidade relativa dos compostos em relação à massa total da amostra presente na alíquota de 100 mL ($0,09 \pm 0,02$ g), são mostrados na Tabela 12.

A análise do espectro de massas dos compostos sililados cujos picos são mostrados no cromatograma da Figura 18 foram identificados como: (1) *p*-hidroxibenzaldeído, (2) vanilina, (3) ácido *p*-hidroxibenzóico, (4) siringaldeído, (5)

ácido *trans*-cumárico e (6) ácido ferúlico. Os espectros de massa desses compostos encontram-se no Apêndice 1.

O ácido *trans*-cumárico (5) foi o composto encontrado em maior quantidade, representando 12,28% da massa total da amostra analisada, e foi seguido por *p*-hidroxibenzaldeído (1) (2,63%), siringaldeído (4) (0,61%), ácido ferúlico (6) (0,44%), ácido *p*-hidroxibenzóico (3) (0,35%) e vanilina (2) (0,31%).

Esses compostos identificados correspondem a apenas 16,62% da massa total da fração FO1 (Tabela 12). Pela metodologia aplicada, não foi possível a identificação de dímeros e de compostos de massa molar mais alta.

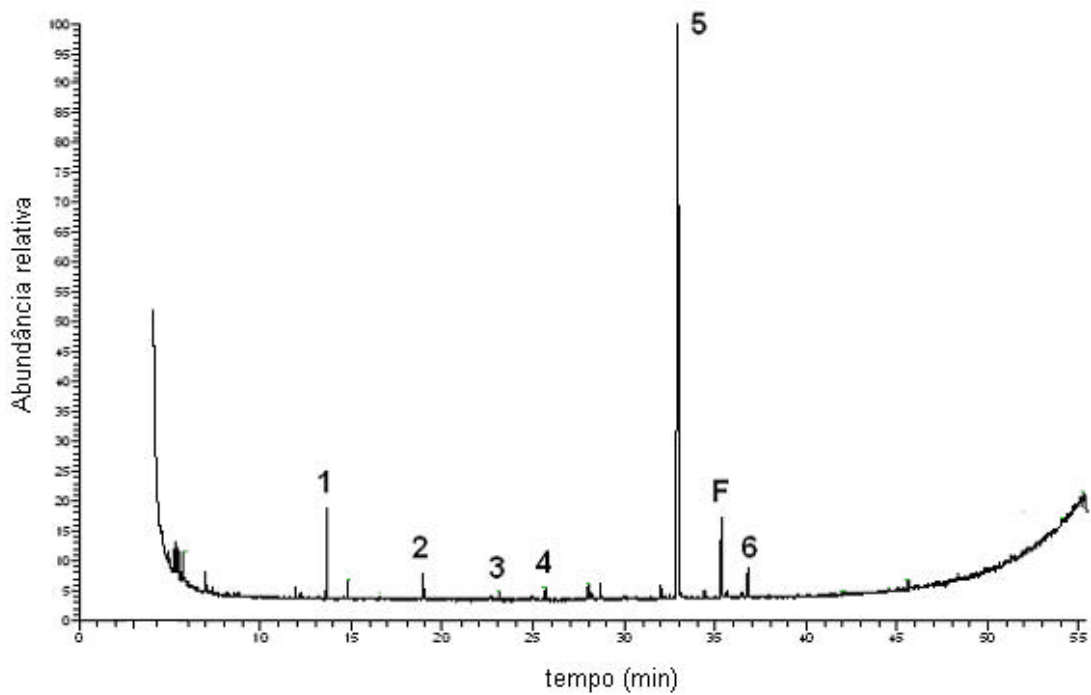


Figura 18. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO1 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.

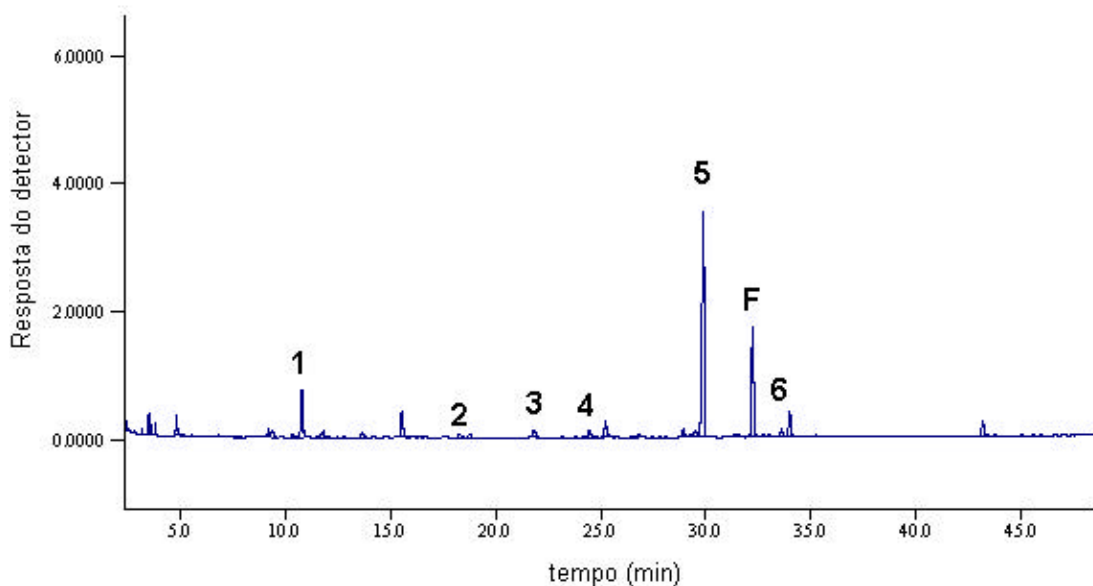
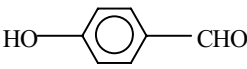
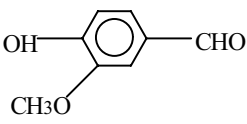
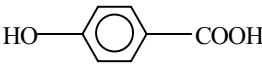
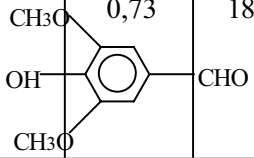
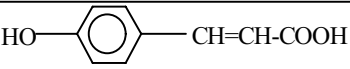
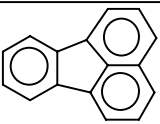
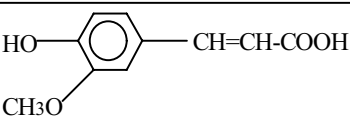


Figura 19. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO1 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).

Tabela 12. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO1.

Pico nº	tr _{rel}	Íon Molecular (Não sil / sil)	Derivado TMS do	m (g)	%
1	0,39	122 / 194		$2,39 \times 10^{-3}$	2,63
2	0,54	152 / 224		$2,82 \times 10^{-4}$	0,31
3	0,66	138 / 282		$3,19 \times 10^{-4}$	0,35
4	0,73	182 / 254		$5,55 \times 10^{-4}$	0,61
5	0,93	164 / 308		$1,12 \times 10^{-2}$	12,28
F fluoranteno	1,0	202		-	-
6	1,04	194 / 338		$4,0 \times 10^{-4}$	0,44

Os cromatogramas obtidos pela análise por CG/EM e CG/DIC da fração FO2 seca em P₂O₅ e derivatizada com BSTFA são apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

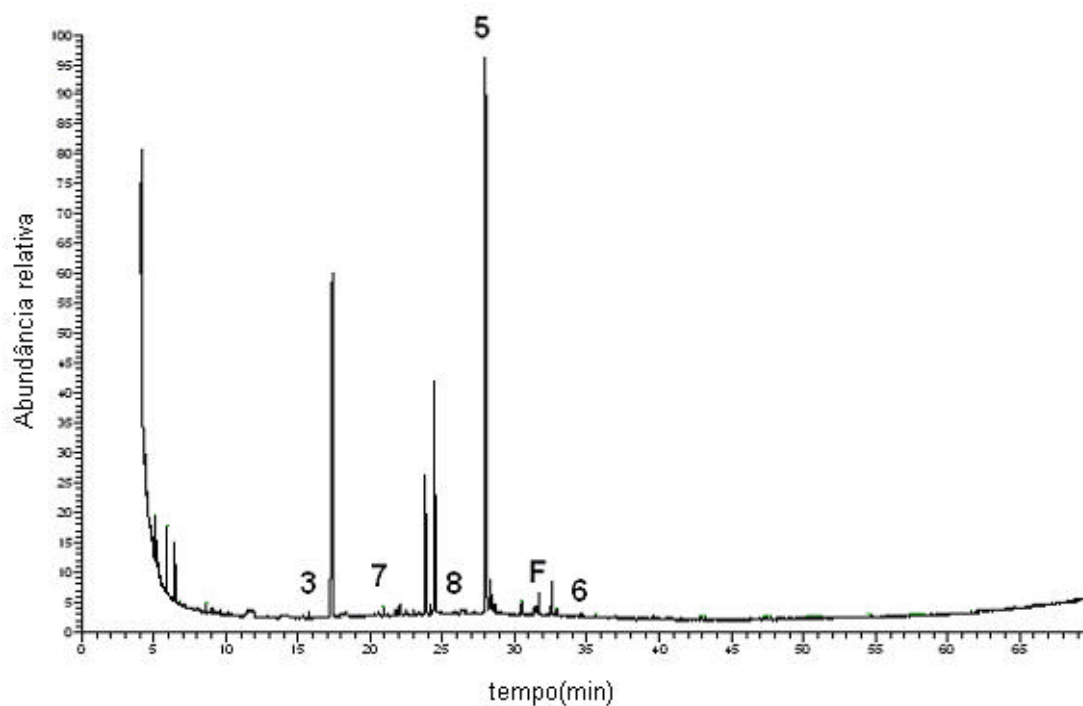


Figura 20. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO2 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.

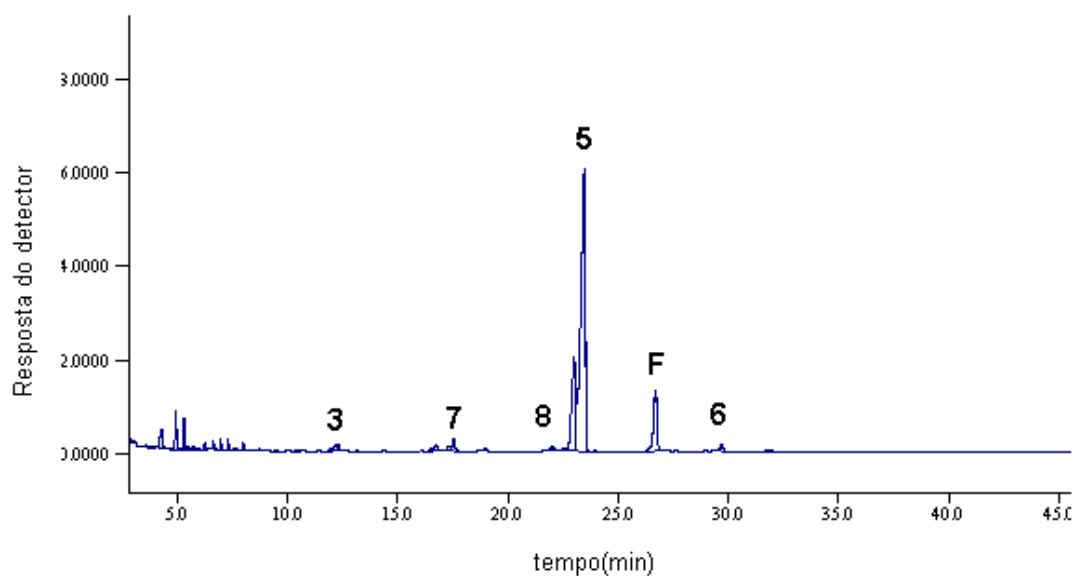
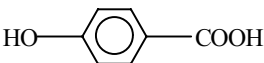
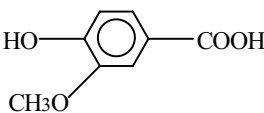
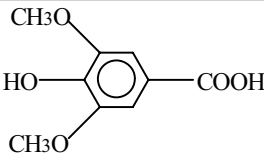
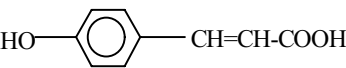
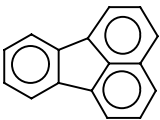
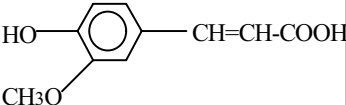


Figura 21. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO2 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).

A atribuição dos picos dos compostos identificados, bem como os respectivos tempos de retenção (t_{rel}), massa molares dos compostos não sililados (não sil), massa dos íons moleculares dos derivados sililados (sil), massa e quantificação relativa dos compostos em relação à massa total da amostra presente na alíquota de 680 mL ($1,1 \pm 0,1$ g), são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO2.

Pico nº	t_{rel}	Íon molecular (não sil / sil)	Derivado TMS do	m (g)	%
3	0,50	138 / 282		$3,93 \times 10^{-4}$	0,40
7	0,66	168 / 312		$7,37 \times 10^{-4}$	0,75
8	0,83	198 / 342		$3,15 \times 10^{-4}$	0,32
5	0,88	164 / 308		$2,62 \times 10^{-2}$	26,62
F fluoranteno	1,0	202		-	-
6	1,09	194 / 338		$5,11 \times 10^{-4}$	0,52

A análise do espectro de massas dos compostos sililados cujos picos são mostrados na Figura 20 foram identificados como: (3) ácido *p*-hidroxibenzóico, (5) ácido *trans*-cumárico, (6) ácido ferúlico, (7) ácido vanílico e (8) ácido siríngico. Os espectros de massa desses compostos encontram-se no Apêndice 1.

Os resultados obtidos na quantificação dos compostos mostraram que o ácido *trans*-cumárico foi o composto presente em maior quantidade (26,62%), e foi seguido

por pequenas quantidades de ácido vanílico (7) (0,75%), ácido ferúlico (6) (0,52%), ácido *p*-hidroxibenzóico (3) (0,40%) e ácido siríngico (8) (0,32%).

Apenas 28,61% da massa total da fração FO2 (Tabela 13) correspondem a compostos identificados.

Os cromatogramas obtidos pela análise de CG/EM e CG/DIC da fração FO3 seca em P₂O₅ e derivatizada com BSTFA são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. A atribuição dos picos dos compostos identificados, bem como os respectivos tempos de retenção, massa molares dos compostos não sililados (não sil), massa dos íons moleculares dos derivados sililados (sil), massa e a quantidade relativa dos compostos em relação à massa total da amostra presente na alíquota de 680 mL (0,098 ± 0,002 g) são mostrados na Tabela 14.

A análise do espectro de massas dos compostos sililados, cujos picos são mostrados no cromatograma da Figura 22, foram identificados como: (2) vanilina, (4) siringaldeído, (5) ácido *trans*-cumárico, (6) ácido ferúlico e (9) ácido *cis*-cumárico. O tempo de retenção dos compostos 5 e 9 são diferentes. No entanto, o caminho de fragmentação dos dois compostos são idênticos, sendo atribuído ao composto 9 o isômero *cis* do ácido cumárico. Os espectros de massas desses compostos encontram-se no Apêndice 1.

Os resultados obtidos na quantificação dos compostos dessa fração orgânica são mostrados na Tabela 14, que mostra o ácido *trans*-cumárico como o composto presente em maior quantidade, representando 10,45% da massa total da amostra analisada, e foi seguido por ácido ferúlico (6) (4,73%), vanilina (2) (1,02%) e siringaldeído (4) (0,85%). A quantidade encontrada do isômero *cis* do ácido cumárico nessa fração foi ínfima (0,009%).

Todos os compostos identificados corresponderam a apenas 17,25% da massa total da fração FO3 (Tabela 14).

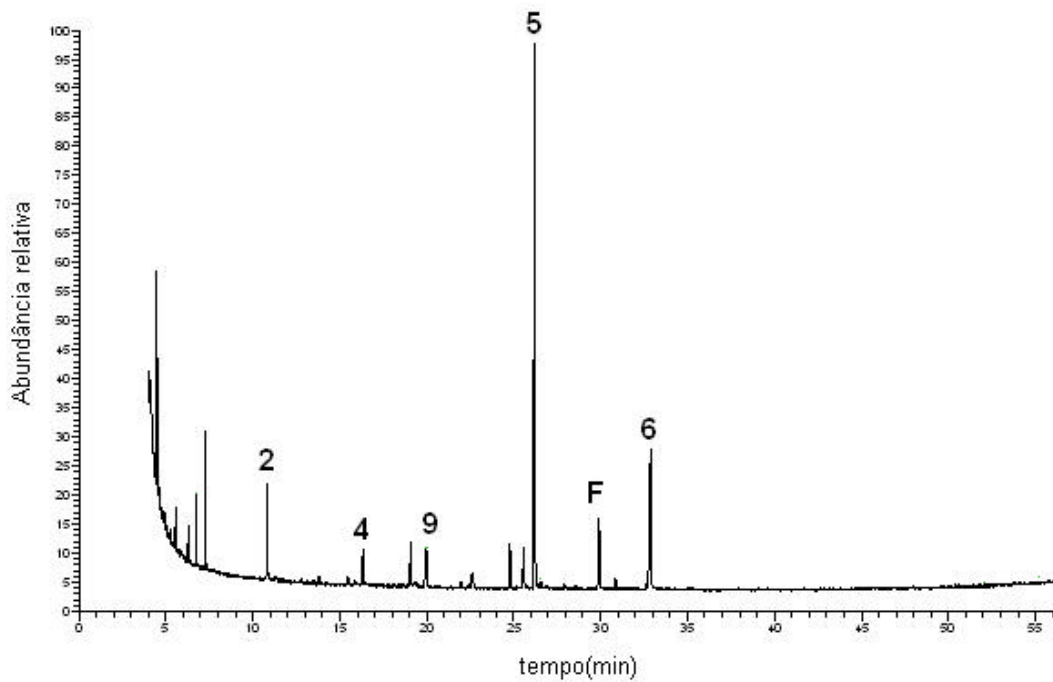


Figura 22. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO3 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.

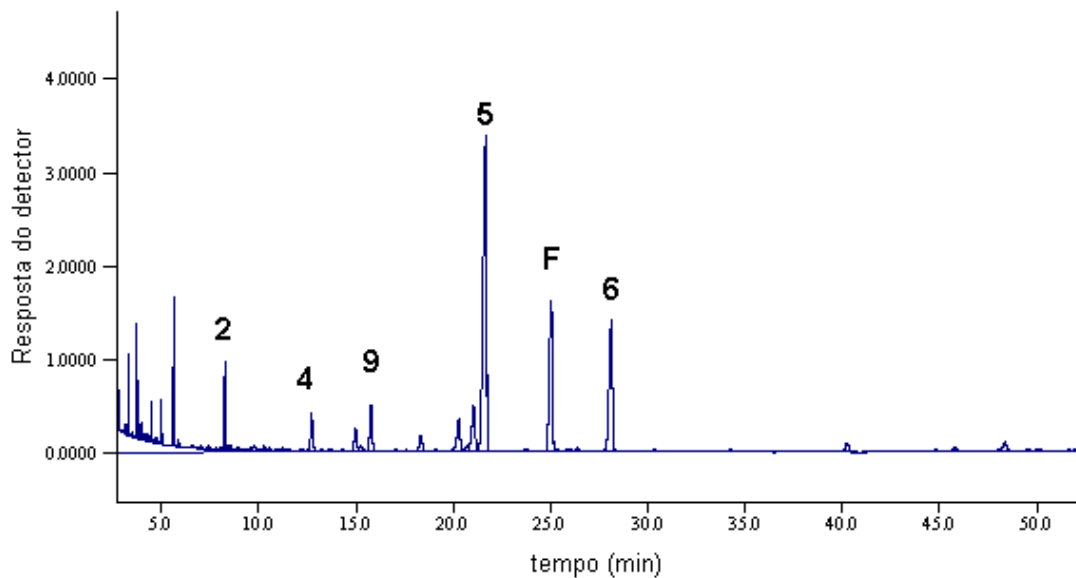
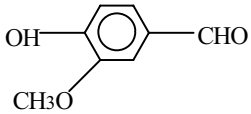
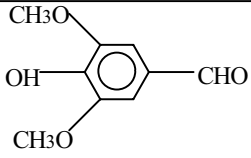
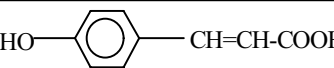
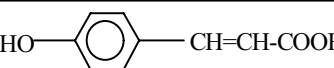
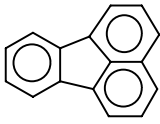
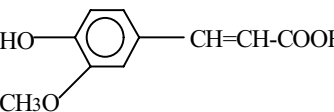


Figura 23. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO3 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).

Tabela 14. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO3.

Pico nº	t_{rel}	Íon molecular (não sil / sil)	Derivado TMS do	m (g)	%
2	0,36	152 / 224		$1,02 \times 10^{-3}$	1,21
4	0,55	182 / 254		$7,14 \times 10^{-4}$	0,85
9	0,85	164 / 308		$7,56 \times 10^{-6}$	0,009
5	0,88	164 / 308		$8,78 \times 10^{-3}$	10,45
F fluoranteno	1,0	202		-	-
6	1,10	194 / 338		$3,97 \times 10^{-3}$	4,73

Os cromatogramas obtidos pela análise de CG/EM e CG/DIC da fração FO4 seca em P_2O_5 e derivatizada com BSTFA são apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente. A atribuição dos picos dos compostos identificados, bem como os respectivos tempos de retenção, massa molares dos compostos não sililados (não sil), massa dos íons moleculares dos derivados sililados (sil), massa e a quantidade relativa dos compostos em relação à massa total da amostra presente na alíquota de 680 mL ($0,138 \pm 0,001$ g) são mostrados na Tabela 15.

A análise do espectro de massas dos compostos sililados, cujos picos são mostrados no cromatograma da Figura 24, foram identificados como: (1) *p*-hidroxibenzaldeído, (3) ácido *p*-hidroxibenzóico, (5) ácido *trans*-cumárico e (6) ácido ferúlico.

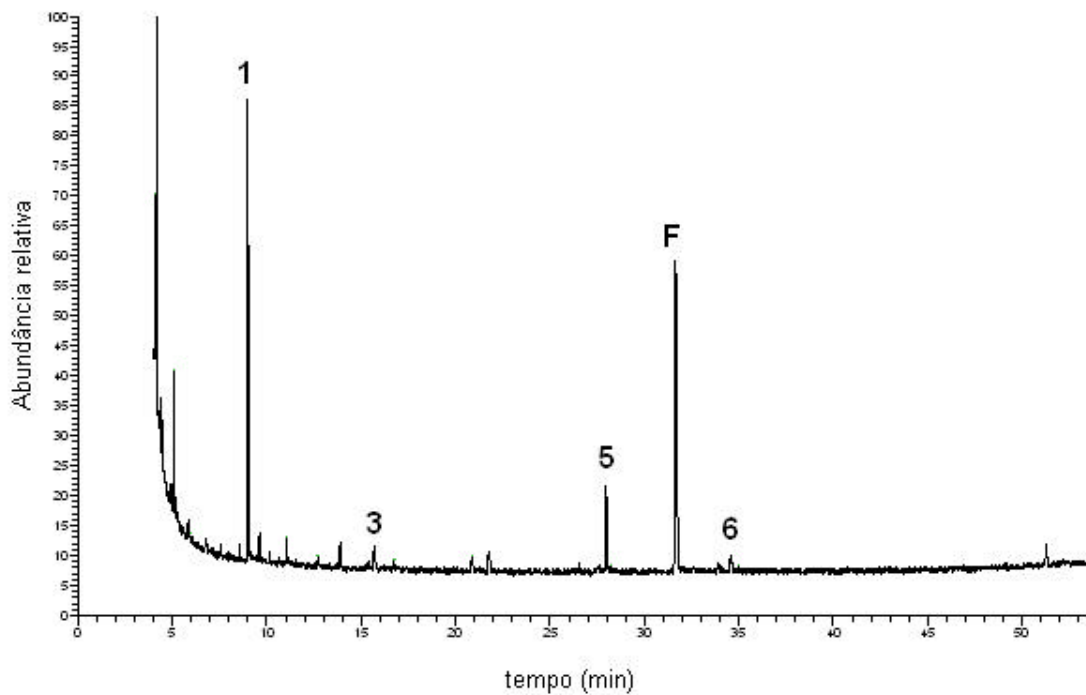


Figura 24. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO4 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.

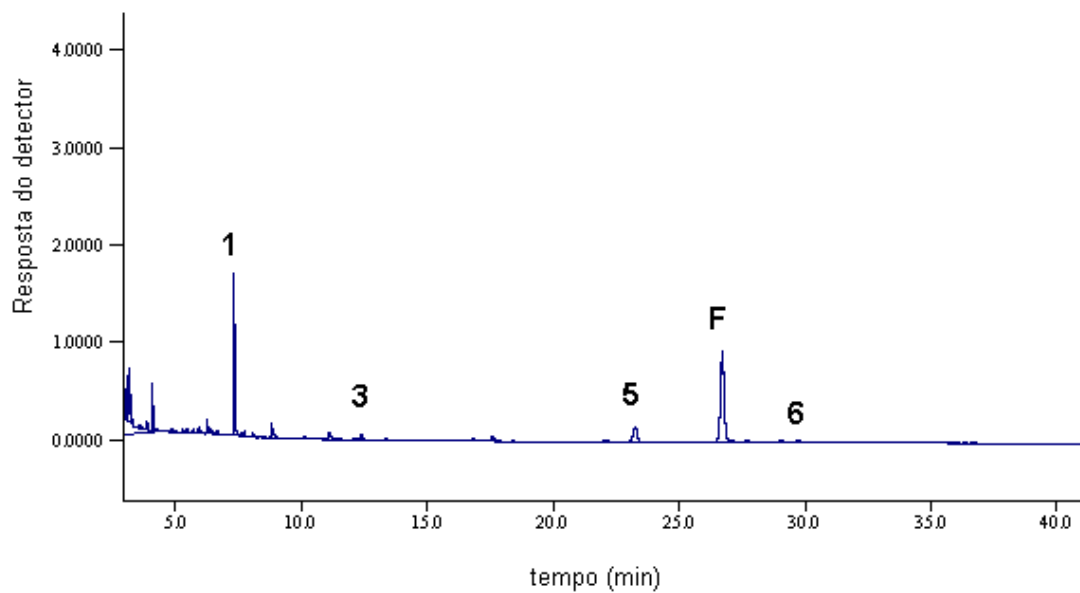
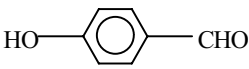
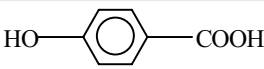
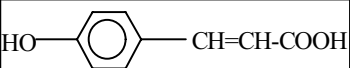
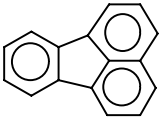
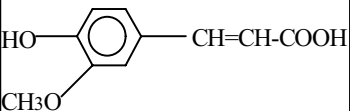


Figura 25. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO4 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).

Tabela 15. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO4.

Pico nº	t_{rel}	Íon molecular (não sil / sil)	Derivado TMS do	m (g)	%
1	0,29	122 / 194		$2,69 \times 10^{-3}$	2,26
3	0,50	138 / 282		$1,91 \times 10^{-4}$	0,16
5	0,88	164 / 308		$1,17 \times 10^{-3}$	0,98
F fluoranteno	1,0	202		-	-
6	1,09	194 / 338		$1,91 \times 10^{-4}$	0,16

O *p*-hidroxibenzaldeído (1) foi o composto encontrado em maior quantidade, representando 2,26% da massa total da amostra analisada e foi seguido por ácido *trans*-cumárico (5) (0,98%), ácido *p*-hidroxibenzóico (3) e ácido ferúlico (6), ambos detectados em pequenas quantidades (0,16%).

Esses compostos identificados correspondem a apenas 3,56% da massa total da fração FO4 (Tabela 15).

Os cromatogramas obtidos pela análise de CG/EM e CG/DIC da fração FO5 seca em P₂O₅ e derivatizada com BSTFA são apresentados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. A atribuição dos picos dos compostos identificados, bem como os respectivos tempos de retenção, massa molares dos compostos não sililados (não sil), massas íons moleculares dos derivados sililados (sil), massa e quantidade relativa dos compostos em relação à massa total da amostra presente na alíquota de 680 mL ($0,136 \pm 0,003$ g) são mostrados na Tabela 16.

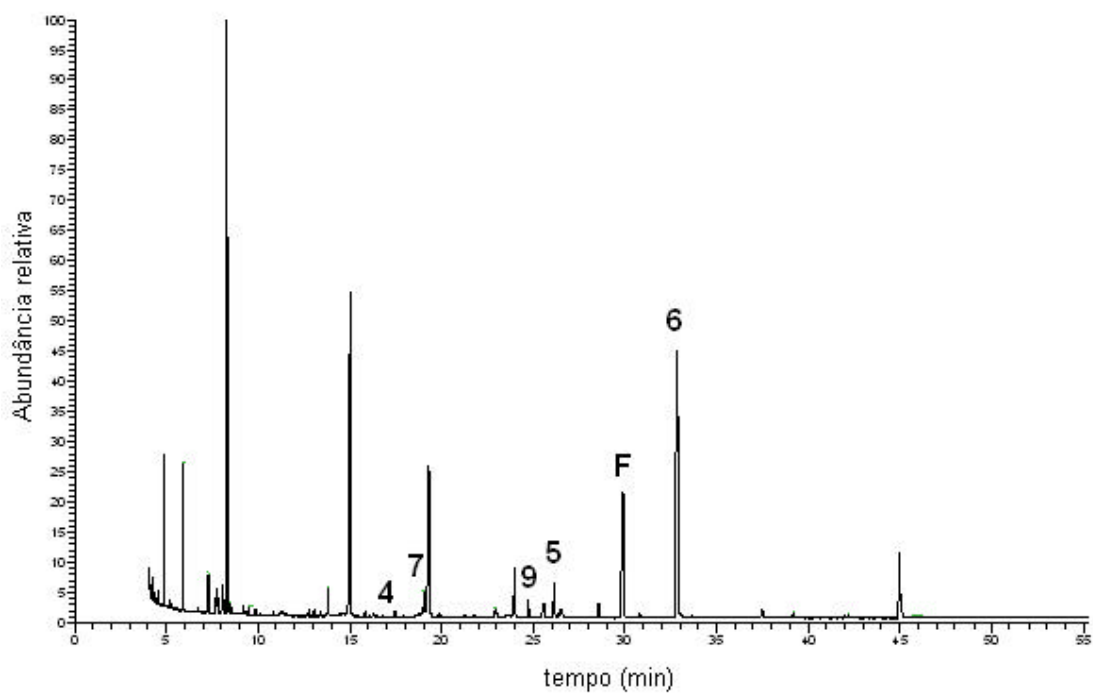


Figura 26. Cromatograma reconstituído (TIC) dos compostos presentes na fração orgânica FO5 após derivatização com BSTFA e detectados por espectrometria de massas.

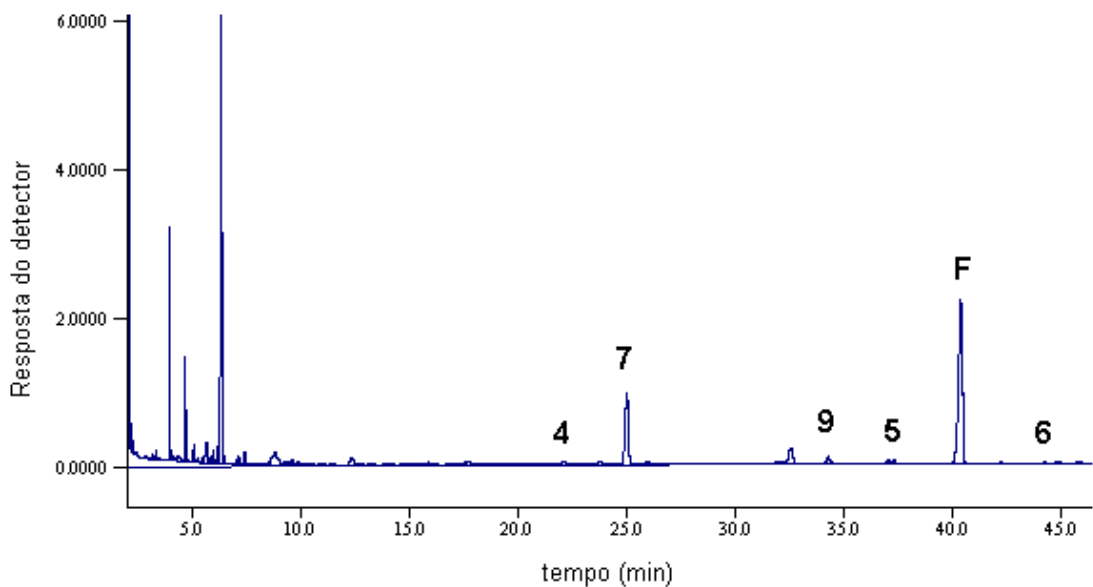
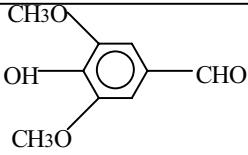
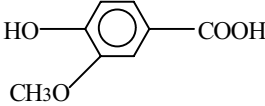
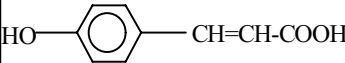
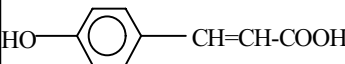
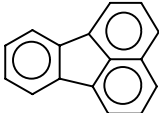
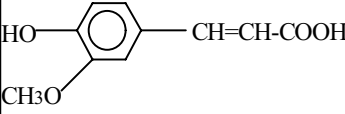


Figura 27. Cromatograma dos compostos presentes na fração orgânica FO5 após derivatização com BSTFA e detectados por ionização de chama (DIC).

Tabela 16. Atribuição dos picos e quantificação dos compostos identificados na fração FO5.

Pico nº	t_{rel}	Íon molecular (não sil / sil)	Derivado TMS do	m (g)	%
4	0,55	182 / 254		$1,17 \times 10^{-4}$	0,10
7	0.64	168 / 312		$2,76 \times 10^{-3}$	2,35
9	0.86	164 / 308		$3,05 \times 10^{-4}$	0,26
5	0.88	164 / 308		$1,53 \times 10^{-4}$	0,13
F fluoranteno	1.0	202		-	-
6	1.10	194 / 338		$9,4 \times 10^{-5}$	0,08

A análise do espectro de massas dos compostos sililados cujos picos são mostrados no cromatograma da Figura 26 foram identificados como: (4) siringaldeído, (5) ácido *trans*-cumárico, (6) ácido ferúlico, (7) ácido vanílico e (9) ácido *cis*-cumárico.

O ácido vanílico (6) foi o composto encontrado em maior quantidade, representando 2,35% da massa total da amostra analisada e foi seguido pelo isômero *cis* do ácido cumárico (9) (0,26%), ácido *trans*-cumárico (5) (0,13%), siringaldeído (4) (0,10%) e ácido ferúlico (6) (0,08%).

Esses compostos identificados correspondem a apenas 2,92% da massa total da fração FO5 (Tabela 16).

Na fração orgânica (FO6) (Figura 28), nenhum composto foi identificado. Alguns picos apareceram no cromatograma. No entanto, quando foi procedida a injeção

de um branco com os solventes utilizados na análise dessa fração, foi constatado que os picos citados são derivados de impurezas contidas no solvente.

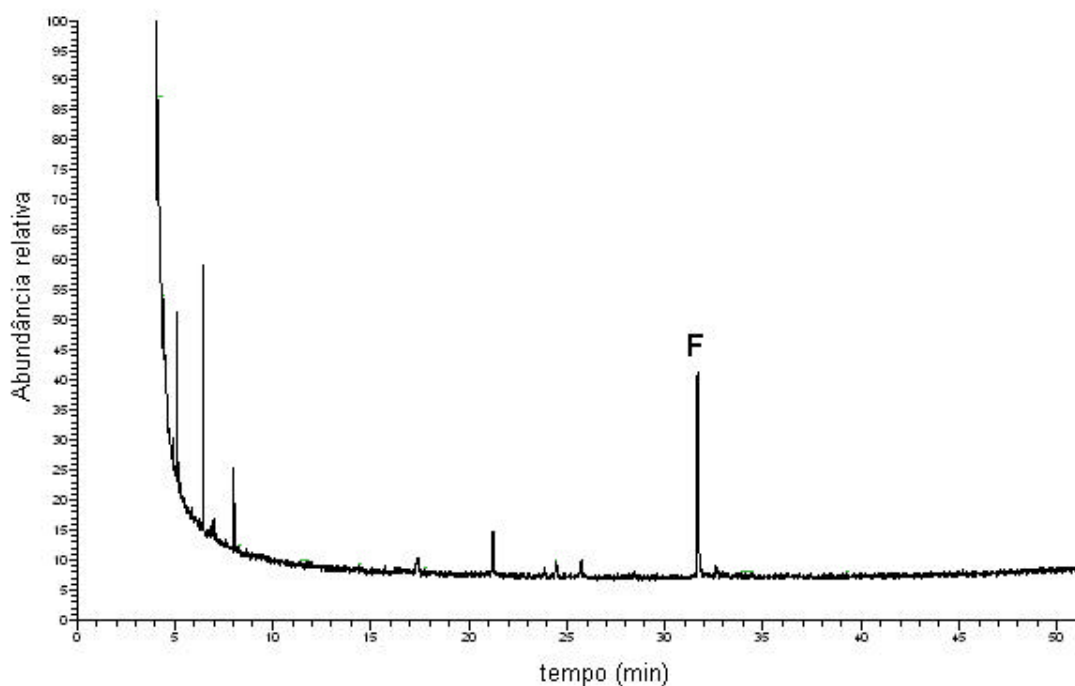


Figura 28. Cromatograma reconstituído (TIC) da fração orgânica 6 evaporada a pressão reduzida e derivatizada com BSTFA.

Em todas as frações orgânicas, exceto a fração FO6, os ácidos cumárico (5 e 9) e ferúlico (6) seriam provenientes da hidrólise dos ésteres correspondentes presentes nas ligninas de gramíneas (FENGEL e WEGENER, 1989). O mesmo ocorre para o ácido *p*-hidroxibenzoico (3). *p*-Hidroxibenzaldeído (1) pode ter sido gerado na clivagem das ligações β -éter das ligninas de gramíneas (LIN e DENCE, 1992).

HISHIYAMA e SUDO (1989) postularam que os aldeídos aromáticos (siringaldeído e vanilina) (4 e 2, respectivamente), são formados pela clivagem de ligações éter existentes entre grupos benzaldeído terminais e a macromolécula de lignina, ou a partir das reações hidrolíticas sobre as ligações β -O-4 de grupos terminais contendo grupos hidroxilas livres. TANAHASHI et al. (1989) postularam que estas unidades se originam da quebra homolítica na posição α de unidades fenilpropano terminais. Os ácidos vanílico (7) e sirínico (8) podem ser formados através da hidrólise ácida das ligações éter ou éster das ligninas de gramíneas (LIN e DENCE, 1992).

Para as frações FO1, FO2, FO3 e FO4, as quantidades dos compostos presentes nas frações orgânicas foram superiores aos valores encontrados anteriormente (FO1 = 7,62%; FO2 = 4,5%; FO3 = 3,95%; FO4 = 1,75%), enquanto que, para a fração FO5, o resultado foi menor (FO5 = 4,8%) (CUNHA, 1999).

Deve-se lembrar, entretanto, que os bagaços utilizados para o procedimento de explosão a vapor e posterior caracterização dos hidrolisados foram diferentes. Enquanto que em CUNHA (1999) o bagaço de cana era proveniente da Usina Nova América, o bagaço utilizado no atual trabalho foi cedido pela Usina Guarani; além da procedência, as safras foram de anos bem diferentes, o que pode ter alterado o rendimento das frações orgânicas.

4.3.2.1.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR CG/EM

A quantidade total de cada composto identificado por CG/EM no hidrolisado obtido do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor é mostrada na Tabela 17.

Tabela 17. Quantidade total de cada composto identificado por CG/EM no hidrolisado obtido do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor.

Composto	Massa (mg)	Composto presente no hidrolisado* (mg·L ⁻¹)
<i>p</i> -Hidroxibenzaldeído	5,1	7,50
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	0,90	1,32
Ácido <i>trans</i> -cumárico	47,50	69,85
Ácido ferúlico	5,17	3,52
Siringaldeído	1,39	2,04
Ácido <i>cis</i> -cumárico	0,31	0,46
Vanilina	1,30	1,91
Ácido vanílico	3,50	5,15
Ácido siríngico	0,32	0,47
Total	65,5	92,22

* Cálculo efetuado em relação a 680 mL de hidrolisado.

O ácido *trans*-cumárico (5) foi o principal produto identificado, seguido pelo ácido ferúlico (6), *p*-hidroxibenzaldeído (1), ácido vanílico (7), siringaldeído (4), vanilina (2), ácido *p*-hidroxibenzóico (3) e em quantidades bem menores, ácido siríngico (8) e ácido *cis*-cumárico (9), perfazendo um total de 65,5 mg.

A concentração dos compostos contendo grupo *p*-hidroxifenil foi de 82,65 mg·L⁻¹, que foi aproximadamente 12 vezes maior do que a concentração dos compostos contendo grupo guaiacil (7,1 mg·L⁻¹) e 33 vezes maior do que a concentração dos compostos contendo grupo siringil (2,51 mg·L⁻¹).

O composto responsável pelo aumento da quantidade dos grupos *p*-hidroxifenil neste hidrolisado foi principalmente o ácido *trans*-cumárico, encontrado em quantidades bem superiores nessas frações orgânicas, quando comparados com o trabalho anterior (grupos *p*-hidroxifenil = 22 mg·L⁻¹) (CUNHA, 1999).

Como já foi dito anteriormente, as frações orgânicas (FO1 - FO5) contêm monômeros derivados da lignina como compostos minoritários, sendo que as maiores quantidades de compostos identificados por CG/EM estão presentes nas frações FO1, FO2 e FO3 (16,62%, 28,61% e 17,25%, respectivamente). Como esperado, nas frações orgânicas subseqüentes (FO4 e FO5), a quantidade de compostos monoméricos identificados foi menor (3,56% e 2,92%, respectivamente). Logo, a maior porção dos compostos extraídos pelo procedimento de extração líquido-líquido (item 3.7) possui massa molar mais alta, que devem conter dímeros, trímeros e oligômeros oriundos das frações condensadas da lignina, que não puderam ser identificados por CG/EM. Essa constatação foi confirmada pelas análises de GPC (item 4.3.2.2), como mostrado a seguir.

4.3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS EM RELAÇÃO À DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR MÉDIA APARENTE

Antes da análise das frações orgânicas (FO1 - FO6) por GPC (Cromatografia de Permeação em Gel), a coluna cromatográfica utilizada foi calibrada com proteínas de massas molares conhecidas, como mostra a Tabela 18. Além dessas proteínas, foram usados para a determinação dos volumes de exclusão ($V_o = 74,72$ mL) e permeação total ($V_t = 182,29$ mL), albumina bovina (66.000 g·mol⁻¹) e acetona (58 g·mol⁻¹), respectivamente.

Tabela 18. Padrões utilizados na calibração da coluna cromatográfica e suas respectivas massas molares e volumes de eluição.

PADRÕES	MASSA MOLAR (g·mol⁻¹)	VOLUME DE ELUIÇÃO (mL)
Anidrase carbônica	29000	79,38
Citocromo c	12400	89,96
Lignina de bagaço de cana	4000	112,97

As proteínas foram escolhidas como uma alternativa para a calibração, pois em solução, elas são globulares como a lignina. Em adição, elas são solúveis em soluções alcalinas diluídas, o que não acontece com os poliestirenos (FORSS et al., 1988; GUERRA, 1998). A curva de calibração obtida é apresentada na equação 10 e na Figura 29.

$$\text{Log MM} = -2,7821 \text{ Kd} + 4,5519$$

equação 10

$$R^2 = 0,9984$$

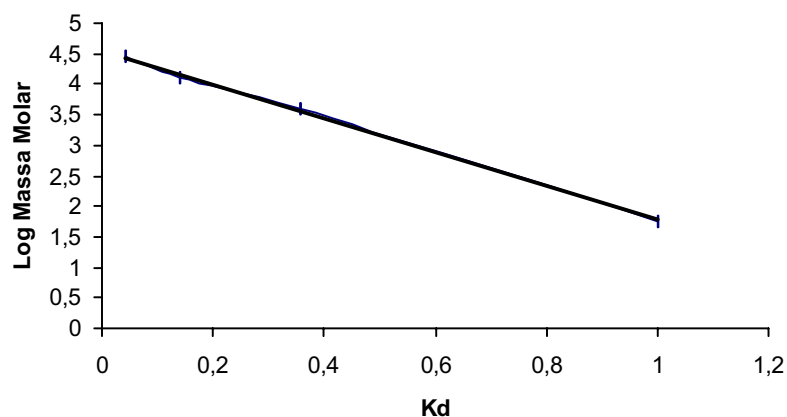


Figura 29. Curva de calibração da coluna cromatográfica Sephadex G-50 de 57 x 1,8 cm eluída com NaOH 0,5 mol·L⁻¹ a 0,4 mL·min⁻¹.

As amostras contendo as frações orgânicas foram então analisadas quanto à sua distribuição de massas molares por GPC, todas com concentração de aproximadamente $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A Figura 30 mostra os cromatogramas de permeação em gel das amostras (FO1- FO6).

Com base na calibração da coluna (item 3.6.4.1), a massa molar média em massa (Mw), a massa molar média em número (Mn) e a polidispersidade (D) das frações orgânicas estão mostradas na Tabela 19. Deve-se lembrar que os valores reportados são aproximados (distribuição de massa molar média) e correspondem à extrapolação da calibração até o volume de exclusão total ($V_t = \text{acetona} = 182,29 \text{ mL}$).

De acordo com a Tabela 19, a fração FO4 apresentou o menor valor de polidispersidade ($D = 1,22$), enquanto as outras frações apresentaram valores de polidispersidade similares (próximos a 1,90). Esses valores são bastante inferiores ao valor de polidispersidade da lignina de bagaço de cana pré-tratada por explosão a vapor reportada por SILVA (1995) ($D = 9,3$).

A fração FO4 apresentou o maior valor de Mw ($4058,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), valor próximo ao valor de Mw da lignina de bagaço de cana ($M_w = 4000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (SILVA, 1995), enquanto que, para as outras frações orgânicas, o valor de Mw variou de $469,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $808,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Os compostos aromáticos monoméricos derivados da lignina, identificados por CG/EM (item 3.6.2) e quantificados por CG/DIC (item 4.3.2.1), tiveram a faixa de massa molar variando de $198 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ácido siríngico) a $122 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (*p*-hidroxibenzaldeído). Assim, esses compostos deveriam ser eluídos por GPC em Kd variando de 0,81 a 0,91, respectivamente .

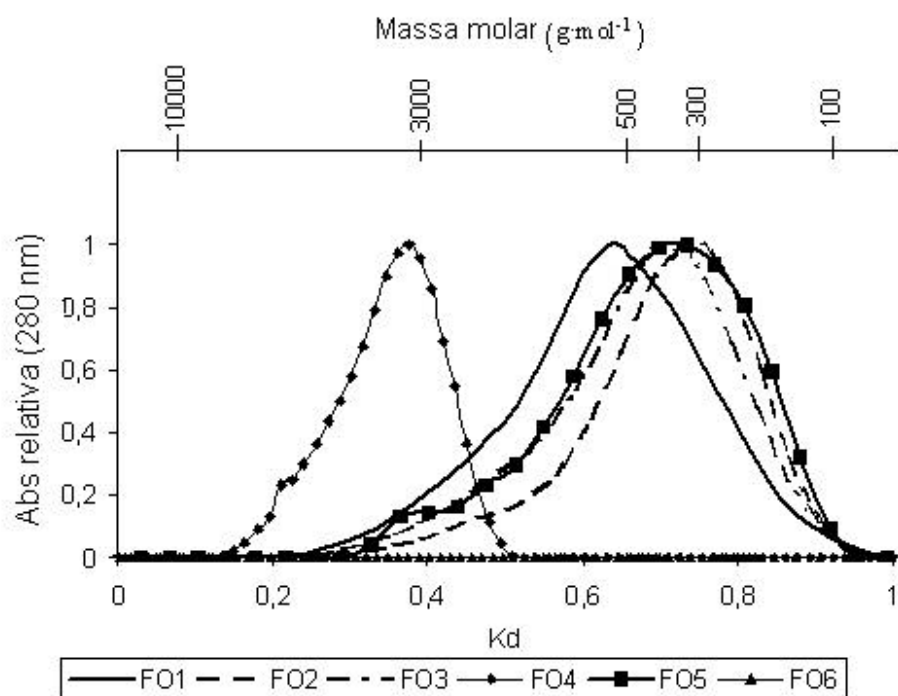


Figura 30. Cromatogramas das frações orgânicas obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana.

Tabela 19. Valores de Mw, Mn e polidispersidade das frações orgânicas provenientes do procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

FRAÇÕES	Mw	Mn	D
ORGÂNICAS	(g·mol ⁻¹)	(g·mol ⁻¹)	
FO1	808,2	405,8	1,99
FO2	469,9	272,2	1,73
FO3	621,7	325,9	1,91
FO4	4058,9	3330,9	1,22
FO5	565,7	296,3	1,91
FO6	0	0	0
Lignina de bagaço	4000	565	9,3

A distribuição de massa molar média dos compostos presentes na fração FO1 mostrou a variação de K_d de 0,25 a 0,97, correspondendo a M_w variando de 7184 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 71,33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Considerando-se a Tabela 12, 16,67% da massa total da FO1 corresponde a compostos identificados (*p*-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido *p*-hidroxibenzóico, siringaldeído, ácido *trans*- cumárico e ácido ferúlico). Esses compostos deveriam ser eluídos em uma faixa de K_d variando de 0,81 a 0,89, pois dos compostos presentes na FO1, o de maior massa molar é o ácido ferúlico ($MM = 194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o de menor massa molar é o *p*-hidroxibenzaldeído ($MM = 122 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Assim, além dos compostos de baixa massa molar (monômeros) derivados da lignina, os compostos predominantes nessa fração seriam pentâmeros e compostos de M_w maior, já que o valor de M_w (808,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) equivale a aproximadamente 5 vezes o valor médio das massas molares dos compostos identificados por CG/EM presentes nessa fração.

Os valores de M_w para as frações ácidas FO2 e FO3 foram de 469,9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e 621,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. A distribuição de massa molar média dos compostos presentes na fração FO2 mostrou um K_d variando de 0,32 a 0,94, correspondendo a M_w variando de 4588 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 86 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Considerando-se a Tabela 13, 28,61% da massa total da FO2 corresponde a compostos identificados (ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *trans*- cumárico e ácido ferúlico). Esses compostos deveriam ser eluídos em uma faixa de K_d variando de 0,81 a 0,87, pois dos compostos presentes na FO2, o de maior massa molar é o ácido siríngico ($MM = 198 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o de menor massa molar é o ácido *p*-hidroxibenzóico ($MM = 138 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Assim, além dos compostos de baixa massa molar (monômeros) derivados da lignina, os compostos predominantes nessa fração seriam trímeros e compostos de M_w maior, já que o valor de M_w (469,9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) equivale a aproximadamente 3 vezes o valor médio das massas molares dos compostos identificados por CG/EM presentes nessa fração.

A distribuição de massa molar média dos compostos presentes na fração FO3 mostrou um K_d variando de 0,29 a 0,96, correspondendo a M_w variando de 5560 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a 76 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Considerando-se a Tabela 14, 17,25% da massa total da FO3 corresponde a compostos identificados (vanilina, siringaldeído, ácidos *cis* e *trans*- cumárico e ácido ferúlico). Esses compostos deveriam ser eluídos em

uma faixa de K_d variando de 0,81 a 0,85, pois dos compostos presentes na FO3, o de maior massa molar é o ácido ferúlico ($MM = 194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o de menor massa molar é a vanilina ($MM = 152 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Assim, além dos compostos de baixa massa molar (monômeros) derivados da lignina, os compostos predominantes nessa fração seriam tetrâmeros e compostos de M_w maior, já que o valor de M_w ($621,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) equivale a aproximadamente 4 vezes o valor médio das massas molares dos compostos identificados por CG/EM presentes nessa fração.

Os valores de M_w para as frações fenólicas FO4 e FO5 foram de $4058,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $565,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. A distribuição de massa molar média dos compostos presentes na fração FO4 mostrou um K_d variando de 0,15 a 0,50, correspondendo a M_w variando de $13633 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $1448 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Considerando-se a Tabela 15, apenas 3,56% da massa total da FO4 corresponde a compostos identificados (*p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *trans*-cumárico e ácido ferúlico). Esses compostos deveriam ser eluídos em uma faixa de K_d variando de 0,81 a 0,89 pois dos compostos presentes na FO4, de maior massa molar é o ácido ferúlico ($MM = 194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o de menor massa molar é o *p*-hidroxibenzaldeído ($MM = 122 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Assim, além dos compostos de baixa massa molar (monômeros) derivados da lignina, os compostos predominantes nessa fração possuem um valor de M_w bastante elevado ($M_w = 4058,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), cerca de aproximadamente 26 vezes o valor médio das massas molares dos compostos de baixa massa molar identificados nessa fração. Este valor é bem próximo ao valor de M_w para a lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor ($M_w = 4000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (SILVA, 1995).

A distribuição de massa molar média dos compostos presentes na fração FO5 mostrou um K_d variando de 0,33 a 0,92, correspondendo a M_w variando de $4303 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Considerando-se a Tabela 16, 2,92% da massa total da FO5 corresponde a compostos identificados (siringaldeído, ácido vanílico, ácidos *cis* e *trans*-cumárico e ácido ferúlico). Esses compostos deveriam ser eluídos em uma faixa de K_d variando de 0,81 a 0,84, pois dos compostos presentes na FO5, o de maior massa molar é o ácido ferúlico ($MM = 194 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e os de menor massa molar são os ácidos *cis* e *trans*-cumárico ($MM = 164 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Assim, além dos compostos de baixa massa molar (monômeros) derivados da lignina, os compostos predominantes nessa fração são trîmeros e compostos de M_w maior, já que o valor de

Mw (565,7 g·mol⁻¹) equivale a aproximadamente 3 vezes o valor médio das massas molares dos compostos identificados por CG/EM presentes nessa fração.

A fração FO6 não apresentou absorção em 280 nm, provavelmente por não ocorrer a existência de compostos aromáticos derivados da lignina nessa fração, confirmando os resultados de CG/EM e CG/DIC.

4.3.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS POR ESPECTROSCOPIA NO UV/VISÍVEL

Os espectros UV/Visível das frações orgânicas (FO1 - FO6), obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, estão mostrados na Figura 31.

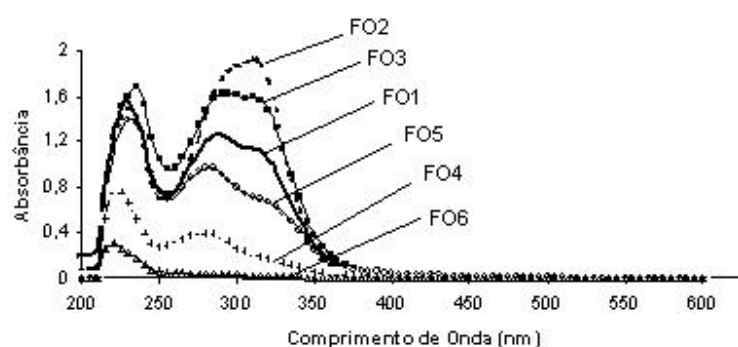


Figura 31. Espectro de UV/Visível das frações orgânicas (FO) obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de 0,50 g·L⁻¹ de FO em dioxano/água 96%.

O espectro da fração orgânica FO1 mostrou um máximo de absorção em 230 nm, além de outro máximo de absorção em aproximadamente 280 nm, apresentando ainda um ombro na região de 310 nm (GOLDSCHMID, 1977; LIN e DENCE, 1992). Esse espectro é composto pelas bandas de absorção das diferentes unidades fenil propano (GOLDSCHMID, 1977) e é semelhante ao espectro característico de lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (Figura 32), que apresenta um máximo em 280 nm, além de um ombro em 310 nm (SILVA, 1995).

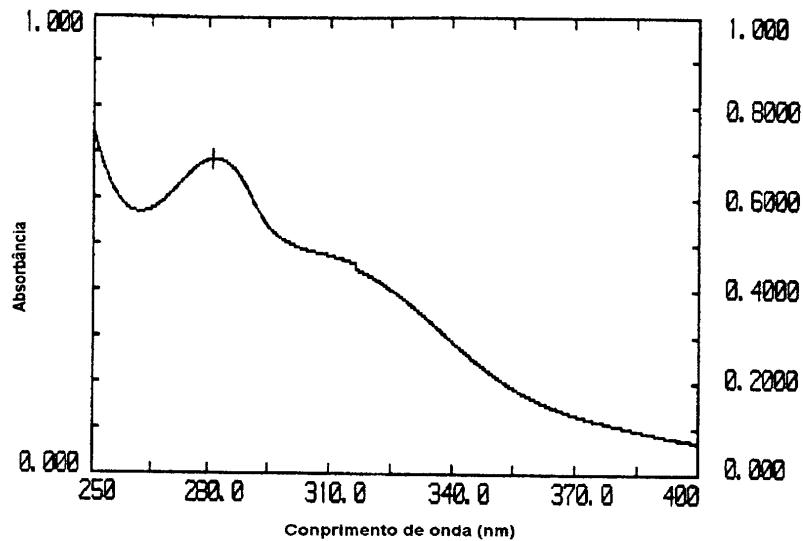


Figura 32. Espectro UV da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de $0,40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lignina em dioxano/água 54,8% (SILVA, 1995).

A banda em 280 nm foi atribuída à absorção de anéis aromáticos substituídos e a banda em 310 nm sugere a presença de grupos α -carbonila ou α - β insaturações conjugadas com o anel aromático (GOLDSCHMID, 1977).

As frações orgânicas FO2 e FO3 apresentaram máximos de absorções em 230 nm, 280 nm e 310 nm, sendo que a fração FO2 apresentou maior intensidade de absorção de 310 nm e a fração FO3 apresentou intensidades de absorção na região de 280 nm e 310 nm bem próximas. As altas absorções na região de 310 nm são provavelmente atribuídas à maior quantidade de compostos monoméricos identificados por CG/EM (item 4.3.2.1.1.) nessas frações, em relação às outras (FO1, FO4, FO5). Esses compostos possuem, na sua grande maioria, α -carbonilas conjugadas com o anel aromático (ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído), α - β insaturações (ácidos *cis* e *trans*- cumárico e ácido ferúlico) e carbonilas no C- γ , também conjugadas com o anel aromático (ácidos *cis* e *trans*-cumárico e ácido ferúlico).

No caso da fração orgânica FO2, o composto identificado em maior quantidade foi o ácido *trans*- cumárico (26,62%), de um total de 28,61%. Como esse composto possui α - β insaturações e γ -carbonilas, justifica-se a alta absorção em 310 nm. Na fração orgânica FO3, 10,45% do ácido *trans*- cumárico foi identificado, além de 4,73% de ácido ferúlico e 1,21% de vanilina (que possuem α -carbonilas) de um total de

17,25% de compostos identificados por CG/EM, justificando-se a alta absorção em 310 nm.

Comparando-se as frações ácidas (FO2 e FO3) com a fração total FO1, verificou-se que as intensidades das bandas em 280 nm e 310 nm nas frações ácidas foram bem maiores que para as mesmas bandas na FO1. Provavelmente, devido à maior concentração de α - β insaturações conjugadas com o anel aromático e α -carbonilas oriundos dos monômeros identificados. Na FO1, a quantidade de monômeros identificados foi de 16,62%, enquanto que na FO2 e na FO3 foi de 28,61% e 17,25%, respectivamente, cujos espectros de UV/Visível foram os mais intensos de todas as frações orgânicas. Reforçando esses resultados, nas frações ácidas FO2 e FO3, as relações de absorvidade (280/310) (Tabela 20) foram inferiores ao valor reportado para a lignina de bagaço de cana. Na fração FO2, a relação foi de 0,93, significando que houve uma maior absorção em 310 nm ($29,7 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) que em 280 nm ($27,5 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Na fração FO3, a relação foi de 1,0, menor que o valor de absorvidade reportado pela lignina de bagaço de cana (1,2) (SILVA, 1995), e apresentou valores altos de absorvidade em 310 nm ($38,1 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e 280 nm ($38,8 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Tabela 20. Absortividades na região do UV/Visível das frações orgânicas obtidas por extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

Comprimento de Onda (nm)	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	LIGNINA BAGAÇO
ABSORTIVIDADES ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)							
280 nm	36,6	27,5	38,8	11,5	32,1	1,2	24
310 nm	31,4	29,7	38,1	5,1	20,8	0,2	19,5
RELAÇÕES DE ABSORTIVIDADE							
280/310	1,2	0,93	1,0	2,3	1,5	6,0	1,2

As frações orgânicas FO4 e FO5, que deveriam ser formadas principalmente por compostos fenólicos, também apresentaram absorções em 230 nm, 280 nm e 310 nm; porém as absorções em 310 nm foram bem menos intensas que para as frações orgânicas FO1, FO2 e FO3, refletindo as menores quantidades de compostos contendo α -carbonilas e α - β insaturações conjugadas com o anel aromático, como verificado por CG/EM. Nessas frações, as quantidades de compostos monoméricos identificados foram bem menores (FO4 = 3,56% e FO5 = 2,92%) que nas frações FO1, FO2 e FO3. Os espectros das frações FO4 e FO5 foram os que mais se assemelharam ao espectro da lignina (Figura 32), sendo que na fração FO4, o ombro na região de 310 nm foi menos pronunciado do que na fração FO5.

Na fração orgânica FO4, a maior banda de absorção encontra-se em aproximadamente 280 nm, região em que há maior absorção de *p*-hidrobenzaldeído (283 - 284 nm) (GOLDSCHMIDT, 1977), composto encontrado em maior quantidade nessa fração (2,26% de um total de 3,56%). Os compostos que absorvem em 310 nm (principalmente os ácidos cumárico e ferúlico), foram identificados em quantidades muito pequenas (0,98% e 0,16%, respectivamente). Deve-se lembrar que essa fração possui a maior massa molar de todas as frações orgânicas ($MM = 4048,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Figura 30). Assim, essa fração apresenta maior grau de condensação (ligações do tipo C-C) e menor quantidade de α -carbonilas livres. Essa suposição foi reforçada pela distribuição de massa molar média dessa fração, que mostrou o maior valor de M_w ($4058,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de todas as frações orgânicas (Figura 30).

Na fração FO5, ocorreu absorção na região de 310 nm, provavelmente pela maior quantidade de ácido vanílico, composto que possui α -carbonila, identificado por CG/EM, cujo valor foi de 2,35%, o que corresponde a 80% da massa total de compostos identificados (2,92%) (Tabela 16).

Comparando-se as frações fenólicas (FO4 e FO5) com a fração total FO1, verificou-se que as intensidades das bandas em 280 nm e 310 nm nas frações fenólicas diminuíram em relação à FO1. Isto ocorreu provavelmente pelo fato de que a quantidade de compostos aromáticos monoméricos identificados nas frações FO4 e FO5 (3,56% e 2,92%) foram bem menores que para a FO1 (16,62%) (Tabela 12), talvez porque a maioria dos compostos já tivesse sido extraída nas frações ácidas (FO2-FO3) e total (FO1). Logo, se a quantidade de α - β insaturações e α -carbonilas decresce, a absorção na região do ultravioleta também decresce, indicando que estas frações

provavelmente contêm maior número de unidades fenilpropano condensadas. Reforçando esses resultados, nas frações fenólicas FO4 e FO5, as relações de absortividade (280/310) (Tabela 20) aumentaram em relação ao valor reportado para a lignina de bagaço de cana (SILVA, 1995). Isto ocorreu provavelmente porque a absorção em 310 nm diminuiu. Nota-se que o valor de absortividade em 310 nm para a fração orgânica FO4 foi muito baixa ($5,1 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), confirmando a baixa absorção nessa região mostrada pelo espectro da Figura 31, além da baixa absorção em 280 nm ($11,5 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

A fração orgânica FO6 absorveu muito fracamente no UV, não possuindo bandas de absorção em 280 nm e 310 nm. Deve-se lembrar que nenhum composto foi identificado por CG/EM nessa fração.

Apesar de os valores de absortividades em 280 nm e 310 nm obtidas para a fração orgânica FO1 ($36,6 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $31,4 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente) serem bem maiores que os valores de absortividade da lignina de bagaço de cana citada na literatura (SILVA, 1995), a relação de absortividade foi a mesma (1,2).

4.3.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

Os espectros no infravermelho da lignina de bagaço pré-tratado por explosão a vapor e isolada com NaOH, e das frações orgânicas (FO1 - FO6) obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado (item 3.7), estão mostrados nas Figuras 33 a 39.

O espectro da fração orgânica FO1, denominada de fração orgânica total (Figura 34), apresentou bandas em 3417 , 1607 e $1094-1044 \text{ cm}^{-1}$, atribuídas a absorção dos grupos O-H, C=C e C-O, respectivamente. A banda em 1510 cm^{-1} indica a presença de compostos aromáticos derivados de lignina. Esse espectro é típico de ligninas do tipo HGS (grupos *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil), que apresenta uma banda em 1167 cm^{-1} , que é associada a uma banda em 1125 cm^{-1} e da banda em 834 cm^{-1} , atribuída às vibrações aromáticas C-H fora do plano, característica de gramíneas como a cana-de-açúcar. As bandas entre 1670 e 1700 cm^{-1} podem ser atribuídas à presença de ácidos carboxílicos aromáticos, tais como, ácidos *p*-cumárico e ferúlico ou seus ésteres. Esses resultados corroboram aqueles publicados por FERNANDEZ et al. (1990), que

indicaram a presença de estruturas do tipo *p*-hidroxifenil, além de ésteres do ácido *p*-cumárico em ligninas de bagaço de cana, além da presença dos derivados monoméricos da lignina identificados nessa frações.

Não foi observada a presença de uma banda forte na região de 1050 cm^{-1} , característica de derivados de celulose e polioses, o que indica a ausência de carboidratos em todas as frações orgânicas.

O espectro da fração FO1 é bem parecido ao espectro no infravermelho da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor reportado na literatura (SILVA, 1995), que está mostrado na Figura 33.

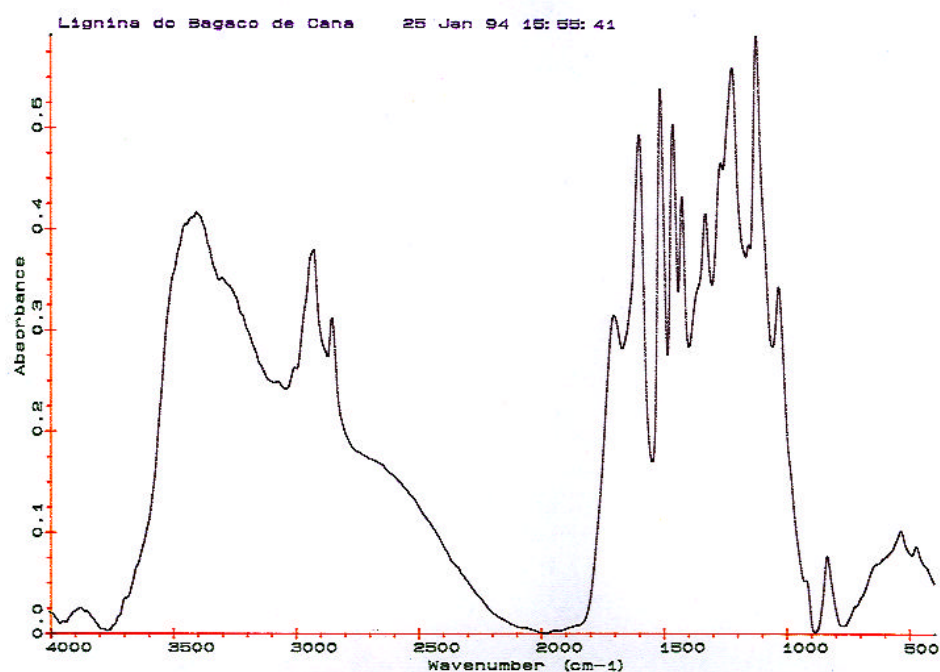


Figura 33. Espectro no infravermelho da lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e extraída com NaOH 1% a 100°C . [Espectros obtidos de pastilhas de KBr com 0,5% de lignina] (SILVA, 1995).

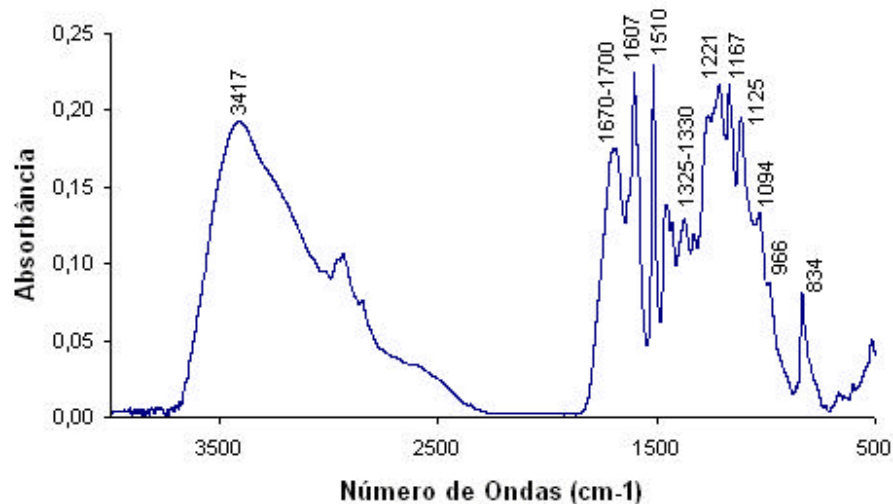


Figura 34. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO1 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO1].

O espectro FTIR típico de lignina do tipo HGS (FAIX, 1991) da fração FO1 corrobora os resultados obtidos por CG/EM, em que foi possível identificar os compostos do tipo H (*p*-hidroxibenzaldeído, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido *trans*-cumárico), G (vanilina e ácido ferúlico) e S (siringaldeído).

Deve-se lembrar que 16,62% dessa fração é composta por monômeros. O restante dos compostos provavelmente encontram-se como oligômeros, com grupos fenil propano condensados. Esta hipótese é reforçada pelas bandas em 1325 - 1330 cm^{-1} , atribuída à existência de compostos contendo grupos do tipo siringil, grupos H condensados ou compostos do tipo guaiacil condensados na posição 5 do anel aromático, e em 1221-1230 cm^{-1} , atribuída às ligações C-C, C-O e deformação axial da ligação C=O em compostos contendo grupos do tipo guaiacil condensados e eterificados. Essas condensações levam à formação de dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc., sendo que a fração FO1 é composta predominantemente por compostos de massa molar mais alta (item 4.2.2).

O espectro FTIR das frações ácidas FO2 e FO3 apresentaram praticamente as mesmas bandas (Figuras 35 e 36, respectivamente) que a fração FO1, sendo também compostas por lignina do tipo HGS. A relação de intensidade (1670 - 1700 cm^{-1} / 1510 cm^{-1}) entre a banda 1670 - 1700 cm^{-1} , típica de carbonilas, e a banda 1510 cm^{-1} , característica de compostos aromáticos derivados da lignina, é de aproximadamente

1,19 na FO2 e de 0,98 na FO3. Essas relações são superiores à relação da fração FO1 (0,76), mostrando que a quantidade de compostos contendo grupos carbonila e carboxila nessas frações aumentou, em relação à FO1. A maior relação de intensidade para a FO2 confirma os resultados de CG/EM, os quais mostraram que 28,61% dos compostos identificados continham grupos carbonila, enquanto que a quantidade de compostos identificados na FO3 foi de 17,25% e na FO1 foi de 16,62%.

As frações FO1, FO2 e FO3 também mostraram uma banda em 966 - 990 cm^{-1} , atribuída à vibração de ligação $-\text{HC}=\text{CH}-$ fora do plano. A intensidade dessa banda na FO2 foi maior provavelmente porque a quantidade dos ácidos *trans*-cumárico e ferúlico, compostos que contêm esse tipo de ligação (α - β insaturações), foi maior nessa fração (total = 27,14%), enquanto que na FO3, o total desses ácidos foi de 15,18% e na FO1 foi de 12,72%.

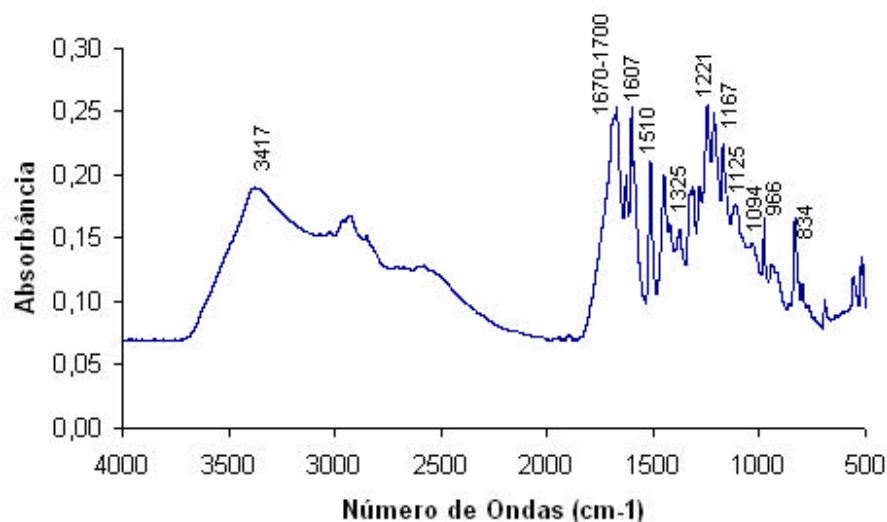


Figura 35. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO2 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO2].

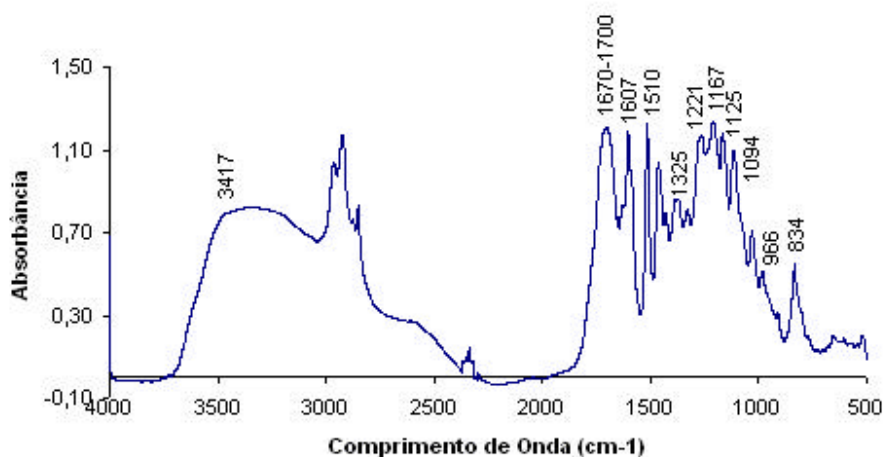


Figura 36. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO3 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO3].

Da mesma maneira que na FO1, poucos compostos monoméricos foram identificados nas frações ácidas (FO2 e FO3); a maioria dos compostos foi identificada como oligômeros de lignina por GPC (item 4.3.2.2). Essa hipótese foi reforçada pela existência nessas frações das bandas em 1325 - 1330 cm⁻¹, atribuída à existência de compostos contendo grupos do tipo siringil, grupos H condensados ou compostos do tipo guaiacil condensados na posição 5 do anel aromático, e em 1221-1230 cm⁻¹, atribuída às ligações C-C, C-O e estiramento da ligação C=O em compostos contendo grupos do tipo guaiacil condensados e eterificados. Essas condensações são típicas de dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc., sendo as frações ácidas compostas predominantemente por compostos de massa molar mais alta (item 4.3.2.2).

O espectro FTIR das frações fenólicas (FO4 e FO5) também apresentou as bandas características de lignina do tipo HGS observadas no espectro da FO1 (Figura 34). Estes espectros estão mostrados nas Figuras 37 e 38.

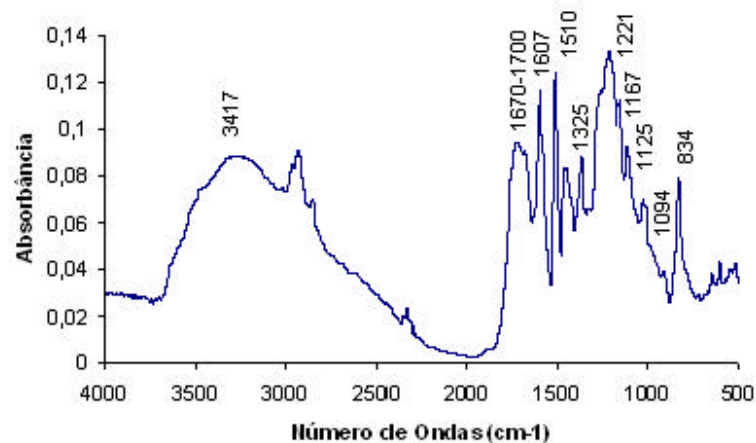


Figura 37. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO4 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO4].

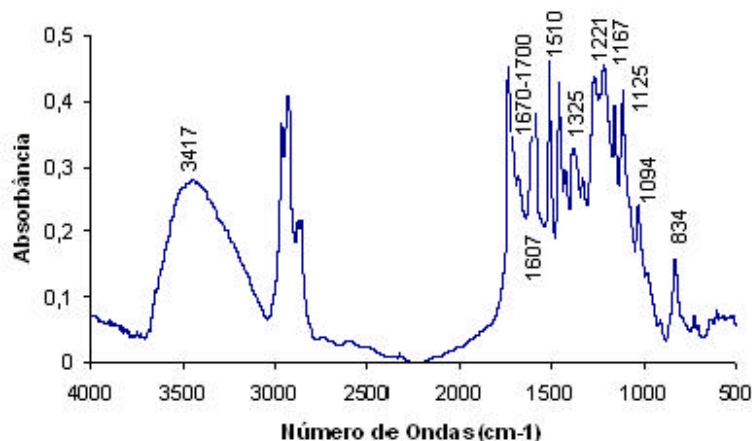


Figura 38. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO5 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO5].

A relação de intensidade entre as bandas $1670 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ e 1510 cm^{-1} é de aproximadamente 0,68 na FO4 e de 0,56 na FO5, valores inferiores ao valor da relação da FO1 (0,76). Isso demonstra que a quantidade de grupos carbonila nessas frações diminuiu, em relação à FO1. Esses resultados confirmam os resultados obtidos por CG/EM, que mostrou para a fração FO4 apenas 3,56% de monômeros identificados, todos contendo carbonila e 2,92% de compostos identificados na FO5, contra 16,62% na FO1. A intensidade das bandas $966 - 990 \text{ cm}^{-1}$ foram muito baixas, confirmando as

baixas quantidades de ácidos *trans*-cumárico e ferúlico nessas frações, com um total de 1,14% na FO4 e 0,21% na FO5, contra um total de 12,72% na FO1.

Da mesma maneira que na FO1, poucos monômeros foram identificados nas frações fenólicas; a maioria dos compostos foi identificada como oligômeros de lignina por GPC (item 4.3.2.2). A fração FO4 apresentou o valor de massa molar muito alto ($M_w = 4058,9 \text{ g.mol}^{-1}$), próximo ao valor de M_w da lignina de bagaço de cana ($M_w = 4000 \text{ g.mol}^{-1}$) e na fração FO5 os compostos com $M_w = 567,7 \text{ g.mol}^{-1}$ corresponderiam a trimeros (item 4.3.2.2). Essa hipótese foi reforçada pela existência nessas frações das bandas mais intensas em $1325 - 1330 \text{ cm}^{-1}$, atribuída à existência de compostos contendo grupos do tipo siringil (S) ou grupos H condensados ou compostos do tipo guaiacil (G) condensados na posição 5 do anel aromático, e em $1221-1230 \text{ cm}^{-1}$, atribuída às ligações C-C, C-O e estiramento da ligação C=O em compostos contendo grupos do tipo guaiacil condensados e eterificados. Essas condensações levam à formação de dímeros, trimeros, tetrâmeros, etc., sendo as frações ácidas compostas predominantemente por compostos de massa molar mais alta (item 4.3.2.2).

A fração FO6 (Figura 39) não apresentou banda em 1510 cm^{-1} e, portanto, os compostos presentes nessa fração diferem-se dos derivados de lignina, corroborando os resultados de espectroscopia no UV/Visível, que não mostraram absorção em 280 nm para essa fração. Pelo espectro de FTIR, constatou-se que os compostos presentes nessa fração apresentam carbonilas, típicas de ácidos orgânicos, que apresentam forte absorção em 1700 cm^{-1} .

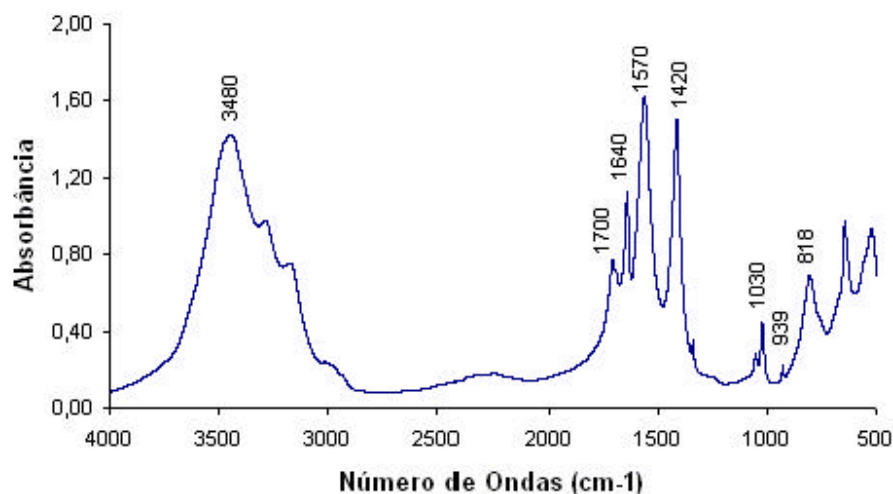


Figura 39. Espectro no infravermelho da fração orgânica FO6 obtida por extração com solventes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. [Espectro obtido a partir de pastilhas de KBr com 0,5% da FO6].

4.3.2.5. ANÁLISE DOS GRUPOS FUNCIONAIS HIDROXILAS FENÓLICAS E METOXILAS NAS FRAÇÕES ORGÂNICAS

Os resultados obtidos para a análise de grupos funcionais hidroxilas fenólicas e metoxilas das frações orgânicas (FO1 - FO6) estão mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Grupos funcionais derivados de lignina encontrados nas frações orgânicas obtidas no procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

GRUPOS	FO1	FO2	FO3	FO4	FO5	FO6	LIGNINA
FUNCIONAIS	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	BAGAÇO (%)
Hidroxilas	0,19	0,08	0,15	0,08	0,21	0,03	2,0
fenólicas							
Metoxilas	0,16	0,07	0,20	0,04	0,16	0,02	14,1

Os valores dos grupos funcionais mostrados na Tabela 21 são baixos quando comparados com os valores reportados na literatura, para a lignina de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (SILVA, 1995), na qual a quantidade de hidroxilas

fenólicas é de 2,0% e de metoxilas, de 14,1%. Os baixos valores indicam que os fragmentos de lignina presentes nas frações orgânicas possuem baixo número de subestruturas fenólicas (GUERRA, 1998).

Os teores de metoxilas encontrados nas frações orgânicas foram também significativamente inferiores aos encontrados em ligninas do tipo guaiacil e siringil (FENGEL e WEGENER, 1989). Esse resultado indica que grande parte das subestruturas fenólicas presentes nas frações orgânicas isoladas são do tipo hidroxycumaril condensado.

Em função desses resultados, acredita-se que a quantidade de grupos metoxila e hidroxilas fenólicas encontradas nessas frações foram oriundas dos compostos de baixa massa molar presentes no hidrolisado. Se isto for correto, espera-se que a quantidade de metoxilas da lignina retida no bagaço pré-tratado seja maior, devido à maior quantidade de grupos do tipo guaiacil e siringil, hipótese esta que já vem sendo investigada.

4.3.2.6. ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS (FO1-FO6)

Os resultados da análise elementar das frações orgânicas (FO1-FO6) estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Porcentagens de C, H, O e N contidas nas frações orgânicas (FO1-FO6).

AMOSTRA	C	H	N	O
FO1	56,85*	5,74*	0,38*	37,03*
FO2	58,8 ± 0,4	5,35 ± 0,09	0,40 ± 0,03	35,5 ± 0,5
FO3	59,8 ± 0,8	5,96 ± 0,04	0,36 ± 0,01	33,8 ± 0,8
FO5	66,5 ± 0,5	6,1 ± 0,3	1,1 ± 0,5	26,2 ± 0,3

* Resultado obtido da análise de uma única amostra, devido à pequena quantidade de material disponível.

FO4 e FO6 – valores não apresentados

As frações orgânicas FO1, FO2 e FO3 apresentaram teores de % de carbono, % de hidrogênio e % de oxigênio próximos ao encontrado na literatura (FENGEL e WEGENER, 1989) para a lignina de bagaço moído, que apresentou 59,5% de carbono,

5,4% de hidrogênio e 35% de oxigênio. Já a fração orgânica FO5 apresentou 66,51% de carbono, 6,13% de hidrogênio e 26,22% de oxigênio, valores próximos aos reportados por SILVA (1995) para a lignina de bagaço explodido a vapor, que apresentou 64,2% de carbono, 6% de hidrogênio e 29,6% de oxigênio.

A fração orgânica FO4 apresentou 18,59% de carbono, 1,52 % de hidrogênio e 79,45% de oxigênio. Esses valores destoam dos valores de C, H e O encontrados para as frações FO1, FO2, FO3 e FO5, pois as quantidades de carbono e hidrogênio foram baixas e a quantidade de oxigênio foi duas vezes maior do que para as frações FO1, FO2 e FO3 e três vezes maior que para FO5. A fração orgânica FO6 também apresentou alta quantidade de átomos de oxigênio (79,39%) e baixa quantidade de átomos de carbono (14,55%).

Para melhor esclarecimento, as análises elementares das frações orgânicas foram realizadas no Instituto de Química da UNICAMP. Assim, os altos teores de oxigênio nas frações FO4 e FO6 provavelmente devem-se à contaminação dessas amostras com água, pois realmente estes resultados são duvidosos.

Com base na análise elementar, determinou-se a fórmula C_9 das frações orgânicas, útil para a análise quantitativa da espectroscopia de RMN. As fórmulas C_9 são as seguintes: FO1 = $C_9H_{10,90}O_{4,40}N_{0,05}$; FO2 = $C_9H_{9,83}O_{4,07}N_{0,05}$; FO3 = $C_9H_{10,75}O_{3,82}N_{0,05}$ e FO5 = $C_9H_{9,95}O_{2,66}N_{0,13}$.

4.3.2.7. ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS ACETILADAS

Os espectros de RMN- 1H , RMN- ^{13}C e RMN-APT das frações orgânicas estão apresentados nas Figuras 40 a 56. As atribuições e análises quantitativas dos sinais encontram-se nas Tabelas 23 e 24. A atribuição de cada região para RMN- 1H foi determinada com base nos espectros de compostos modelos reportados por RALPH et al (1998), enquanto que a atribuição dos sinais para RMN- ^{13}C foi efetuada conforme ROBERT e CHEN (1989) e TAI et al (1990). A atribuição dos sinais para a fração orgânica FO6 não foi feita, pois provavelmente não é derivada de lignina e as atribuições efetuadas pelos autores são específicas para tal. A análise quantitativa de cada fração foi realizada a partir da integração dos espectros de RMN- 1H e RMN- ^{13}C e da fórmula mínima. Os espectros de RMN-APT das frações orgânicas foram úteis para

localizar as bandas de carbonos CH e CH₃, que estão abaixo do eixo e as bandas acima do eixo, referentes aos carbonos CH₂.. O espectro RMN-APT para FO6 não pôde ser obtido, pois a linha de base do espectro não foi definida mesmo após 30 horas de aquisição dos sinais.

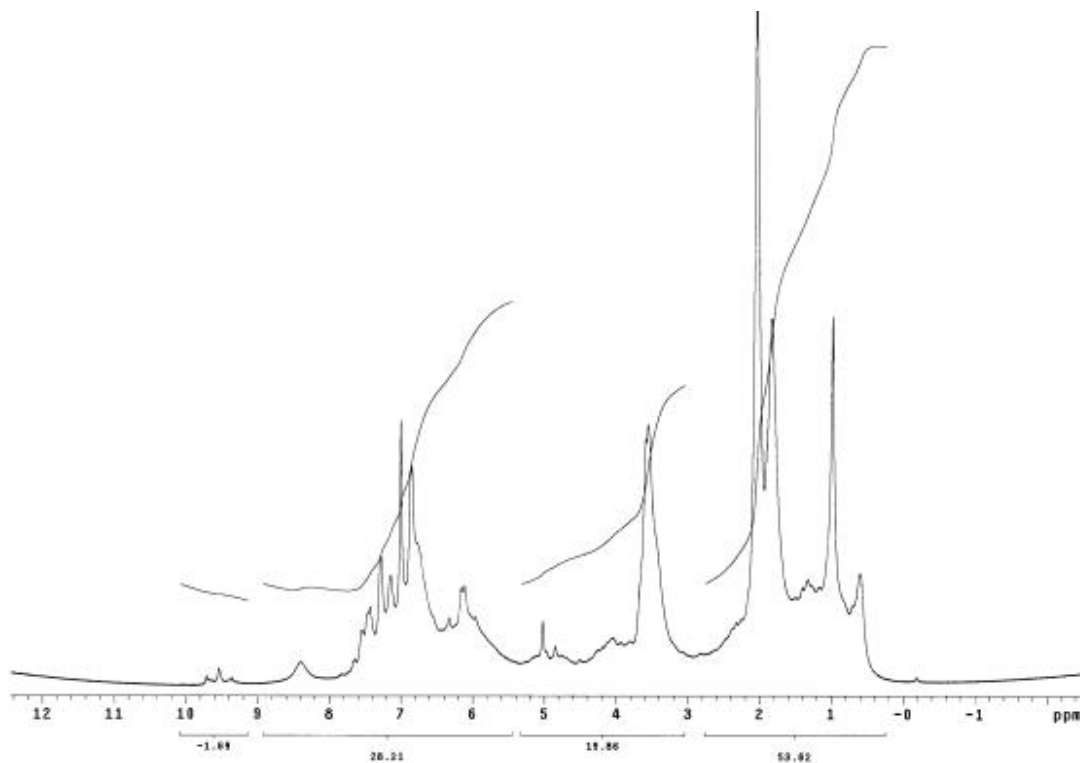


Figura 40. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO1 acetilada.

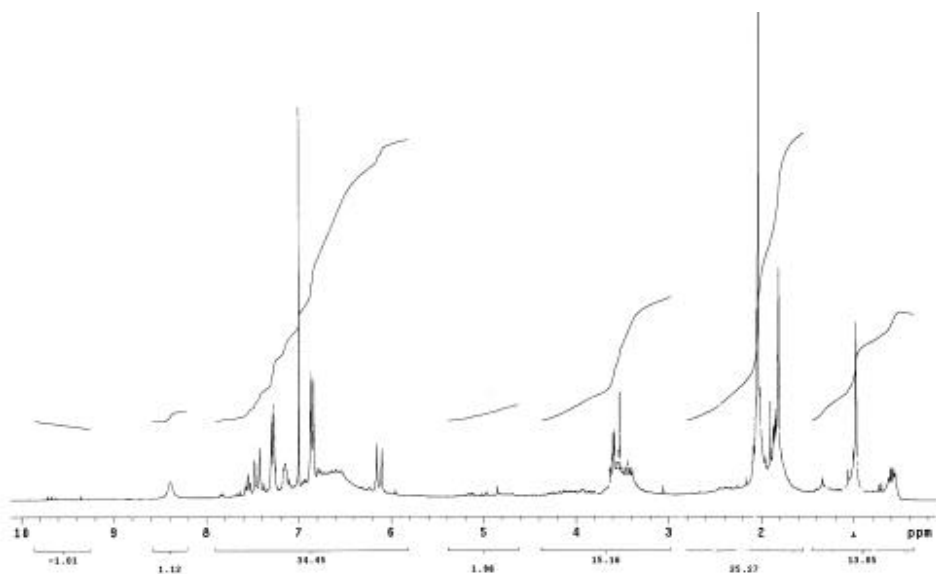


Figura 41. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO2 acetilada.

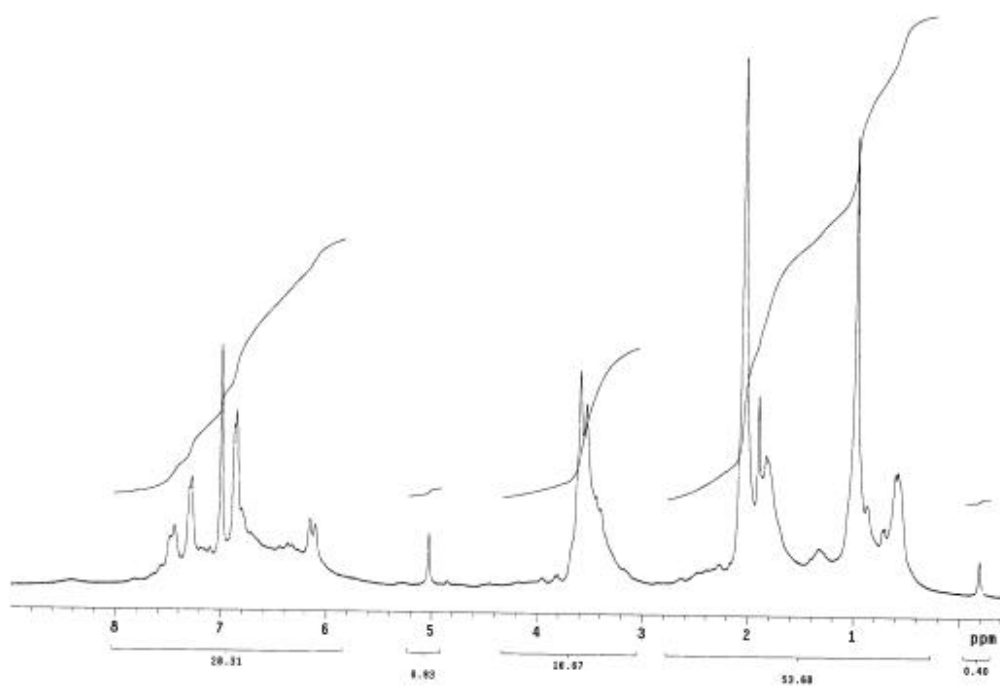


Figura 42. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO3 acetilada.

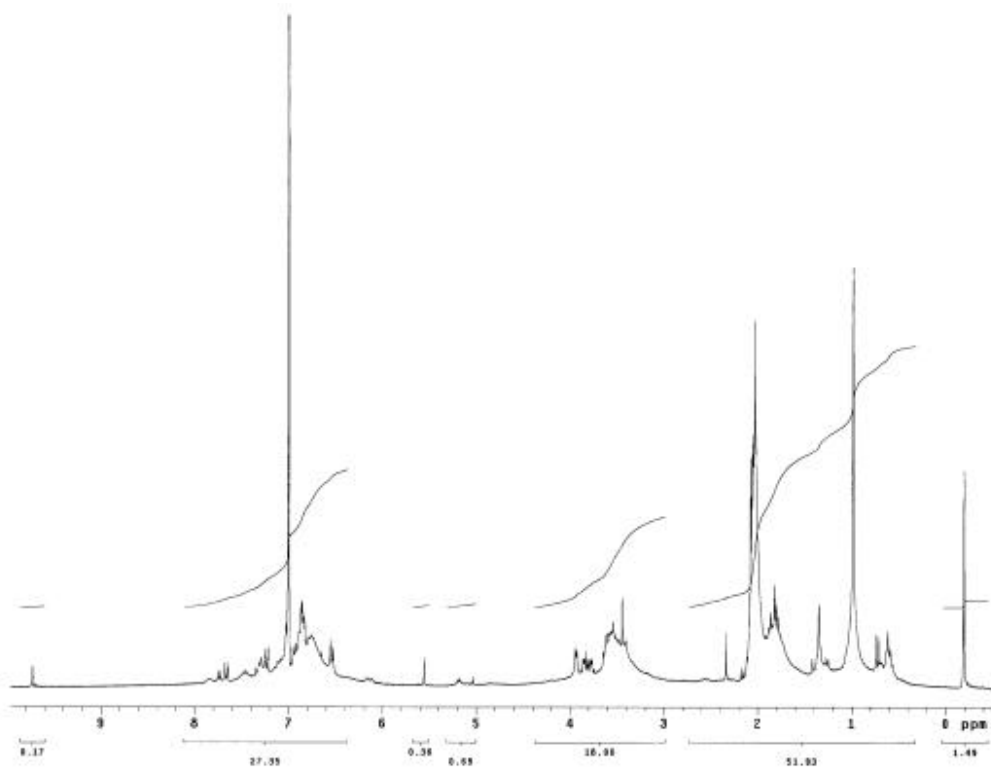


Figura 43. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO4 acetilada.

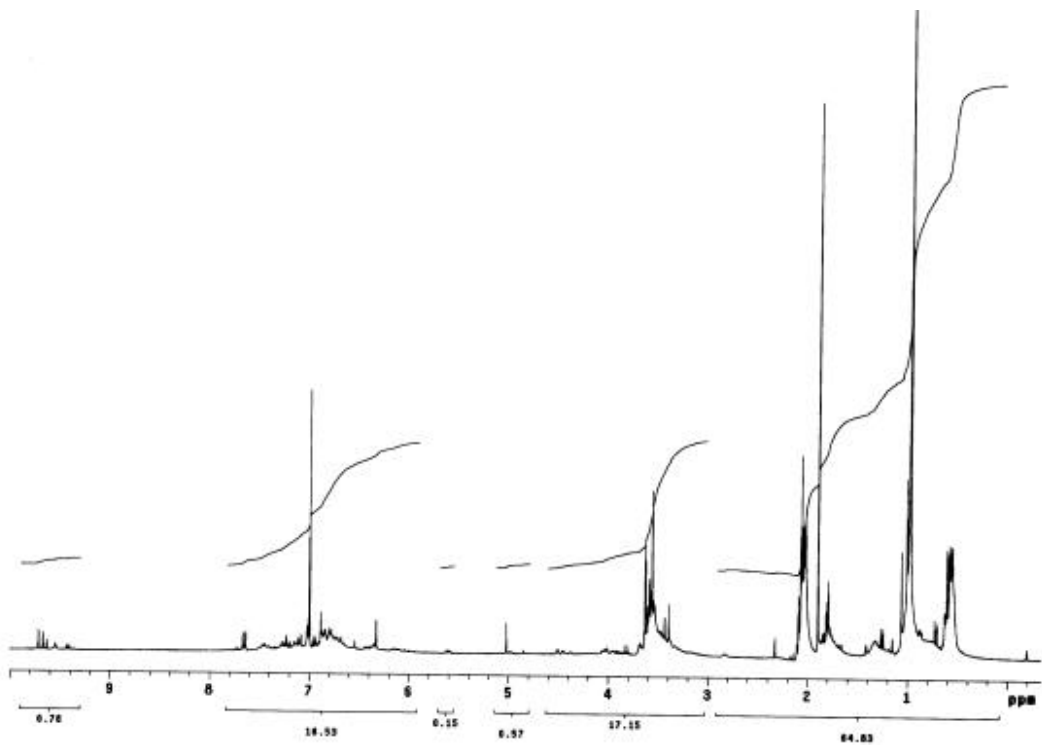


Figura 44. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO5 acetilada.

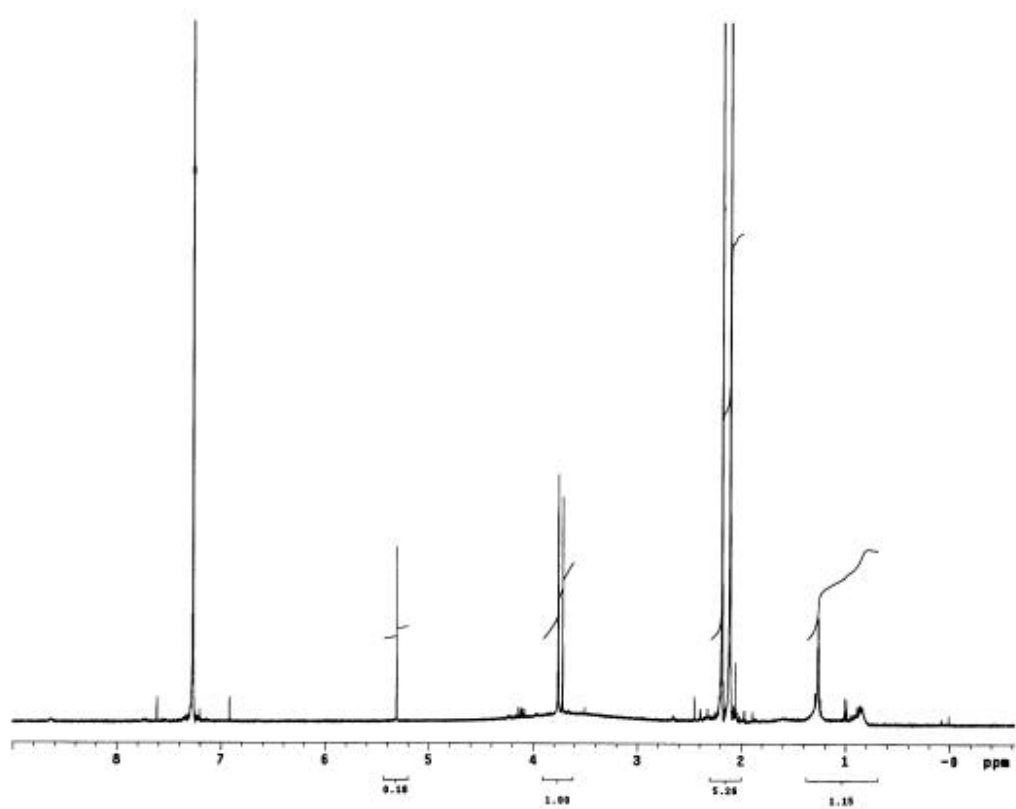


Figura 45. Espectro de RMN-¹H da fração orgânica FO6 acetilada.

Tabela 23. Atribuição e integração relativa dos sinais de RMN-¹H das frações orgânicas FO1-FO5 (* A integração dos hidrogênios em grupos OAc foi dividida por 3 para manter a proporção existente na lignina não acetilada).

Deslocamento químico (ppm)	*H/C ₉ FO1	*H/C ₉ FO2	*H/C ₉ FO3	*H/C ₉ FO4	*H/C ₉ FO5	ATRIBUIÇÃO
7,20 – 7,90	1,2768	2,6021	1,4788	0,8545	0,4403	Ar-H em Ar-COR
6,25 – 7,20	3,5351	6,9388	3,7540	3,8453	1,9372	Ar-H em Ar-R; H α em Ar-CH=CH-CHO; H β em Ar-CH=CH-CHO e H α em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc
5,75 – 6,25	1,0802	1,1565	0,9669	-	0,1756	H α com α OAc em estruturas β -O-4 e β -1 e H β em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc
5,20 – 5,75	0,3928	0,1446	0,2275	0,1424	0,0881	H α com α OAc em estruturas β -5, β -O-4 e β -1
4,50 – 5,20	0,5892	0,8674	0,2275	0,2136	0,1756	H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc e H α em estruturas β - β
3,95 – 4,50	0,5410	0,7228	0,2844	0,4273	0,2201	H β em β -O-4, β -5, β -1 e estruturas β - β
3,55 – 3,95	1,0802	2,1684	2,0476	1,4242	1,4969	Ar-OCH ₃ (principal); H β em β -5 e H γ em estruturas β - β
2,50 – 3,55	1,9640	2,1684	1,6495	1,6378	0,9686	H β em estruturas β -1, β - β e outros
2,20 – 2,50	0,2131	0,3368	0,1706	0,0954	0,0147	H em Ar-OAc exceto em unidades 5-5
1,50 – 2,20	2,2262	3,0834	1,7826	1,6093	1,0566	H em alifático-OAc e Ar-OAc em unidades 5-5
1,10 – 1,50	1,1784	1,4456	1,3651	0,9969	0,9686	H em carbonos saturados não-oxigenados
0,00 – 1,10	2,7495	2,7466	4,2659	2,8484	5,7235	H em carbonos saturados não-oxigenados

A comparação dos teores de hidrogênios por C9 nas frações orgânicas obtidas mostraram diferenças entre elas.

Uma diferença significativa foi em relação ao número de hidrogênios em carbonos saturados não oxigenados, que aparecem na região de 0,0-1,10 nas frações FO3 e FO5 (4,2659 e 5,7235, respectivamente), valores maiores que para as outras frações orgânicas. O aumento no teor de hidrogênios em carbonos saturados não oxigenados sugere a presença de estruturas do tipo $G-CH_2CH_2CH_2OH$ e/ou $G-CH_2CH_2COOH$ e seriam o resultado das reações de natureza redutiva em produtos de quebra de ligações do tipo β -O-aril-éter (GUERRA, 2002).

Os teores de $H\beta$ e $H\gamma$ em estruturas do tipo β -1 e β - β (2,5-3,55 ppm) e 3,95-4,5 ppm, respectivamente, e de $H\beta$ em estruturas β -O-4 (4,5-5,2 ppm), foram menores para a fração FO5 (0,9686, 0,2201 e 0,1756, respectivamente) e maiores para a fração FO2 (2,1684, 0,7228 e 0,8674, respectivamente).

Os espectros de RMN- ^{13}C quantitativos obtidos em clorofórmio deuterado das frações orgânicas (FO1-FO6) são apresentados nas Figuras 46 a 51. As atribuições dos sinais são mostrados na Tabela 24.

A comparação entre os resultados obtidos mostrou que o sinal em 138 ppm, atribuído ao carbono C1 em unidades siringil, apenas aparece nas frações orgânicas FO1 e FO2. Logo, essas duas frações são as que mais apresentam unidades do tipo siringil na estrutura da lignina, como o siringaldeído e o ácido siríngico identificados por CG/MS (CUNHA, 2002).

Todas as frações (FO1 - FO5) apresentaram sinais característicos de lignina do tipo guaiacil. Nessas frações observa-se a presença dos sinais 153 ppm, 129,3 ppm e 122,5 ppm, atribuídos aos carbonos C3, C5, C α e C β em unidades do tipo guaiacil. Esses resultados corroboram os dados reportados anteriormente (item 4.3.2.1.) em que compostos como vanilina, ácido vanílico e ácido ferúlico foram encontrados em grande quantidade nas frações orgânicas. Pôde-se ver ainda a presença de sinais atribuídos às principais unidades presentes em estruturas de ligninas, como unidades β -O-4 e 5-5, além de sinais provenientes de anéis aromáticos, carbonilas e hidroxilas aromáticas e alifáticas.

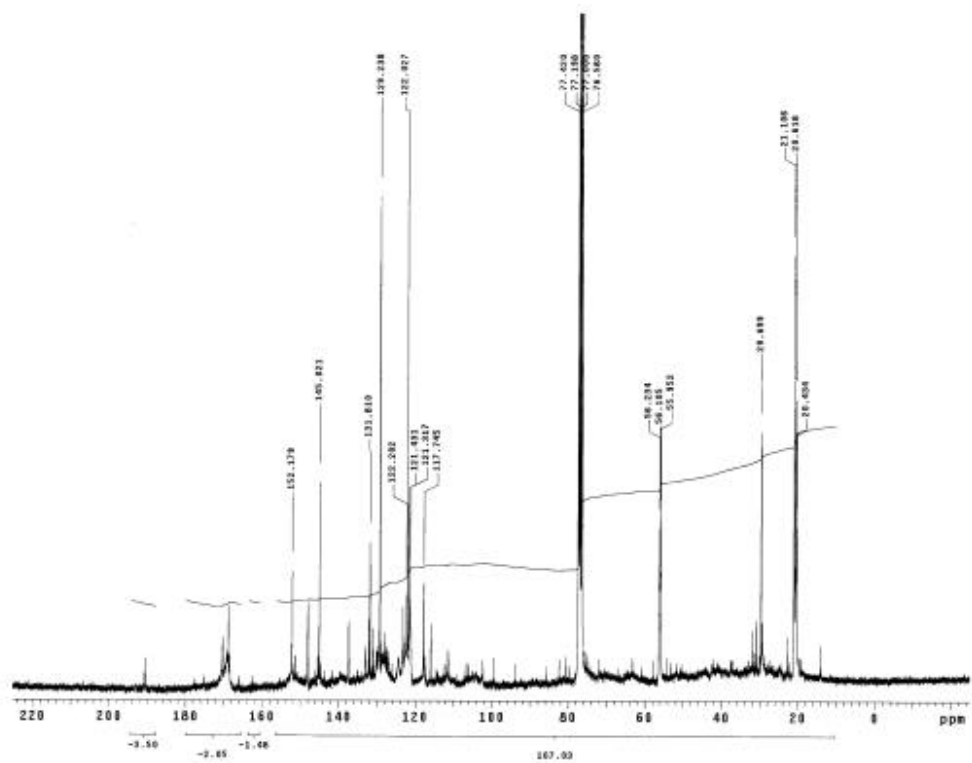


Figura 46. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO1 acetilada.

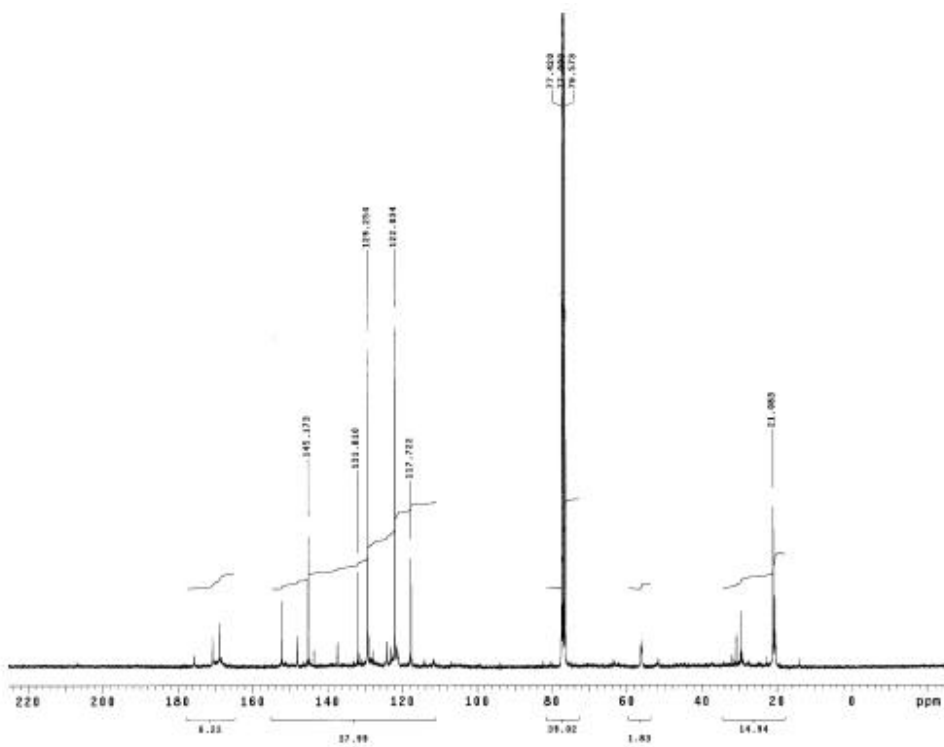


Figura 47. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO2 acetilada.

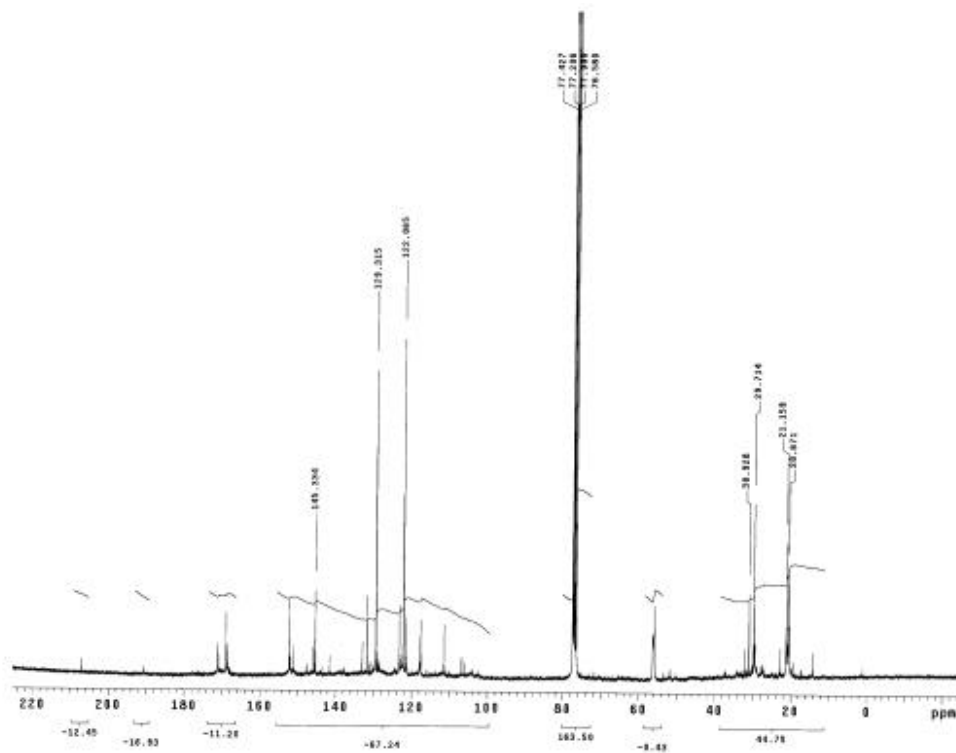


Figura 48. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO3 acetilada.

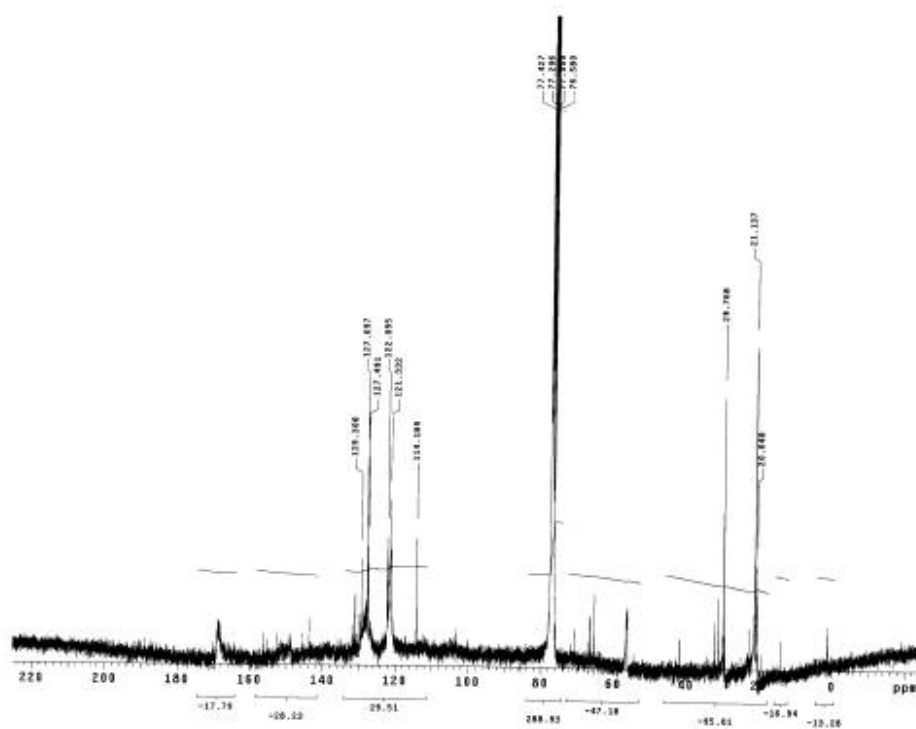


Figura 49. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO4 acetilada.

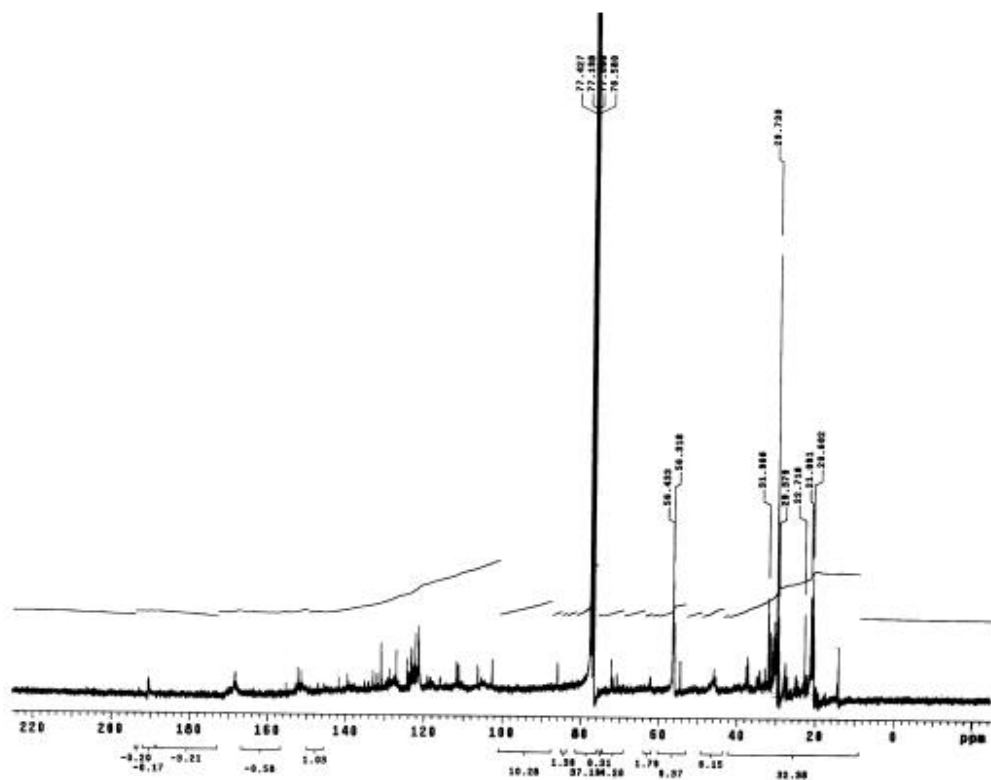


Figura 50. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO5 acetilada.

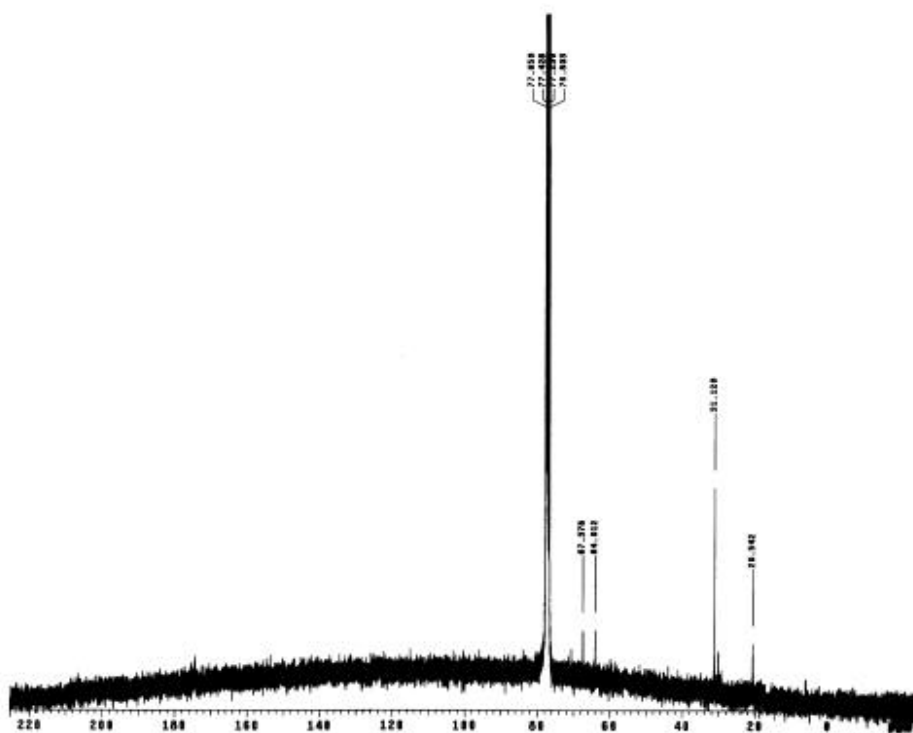


Figura 51. Espectro de RMN-¹³C da fração orgânica FO6 acetilada.

Tabela 24. Atribuição e integração relativa dos sinais de RMN-¹³C das frações orgânicas (FO1-FO5).

Deslocamento químico (ppm)	*C/C ₉ FO1	*C/C ₉ FO2	*C/C ₉ FO3	*C/C ₉ FO4	*C/C ₉ FO5	ATRIBUIÇÃO
170,8	0,6136	0,6923	0,4615	0,5000	1,000	C=O acetil alifático 1°
169,7						C=O acetil alifático 2°
167,1						C=O/COOH aromático
153	0,4091	0,3462	0,9231	1,000	1,000	C-3/G-CHO
151						C-3/G acetilado
148	0,4091	0,3462	-	-	-	C-3 em G-eterificado C-4 em G-eterificado
145,3 143,4	0,4091	0,6923	0,4615	-	-	C4 em G β-O-4 não acetilada C-4/C4' em 5-5 eterificada
138	0,4091	0,3462	-	-	-	C-1 em S β-O-4 eterificado
131,5	0,4091	0,3462	1,8462	-	2,500	C-1/G eterificado
129,3	0,8182	1,0385	0,9231	0,500	4,000	C-5/G e/ou C-α e C-β em G-CH=CH-CHO
122,5	1,2273	1,0385	0,4615	1,000	2,000	C-5/G-acetilado e C-β/G-CH=CH-CH ₂ OAc
120,3	-	-	1,1538	1,000	-	C-2 em G
117,7	0,4091	0,6923	1,3846	-	3,000	C6 em G eterificado e não eterificado C5 em G eterificado e não eterificado
64,5	-	-	-	1,000	-	Cγ/-CH ₂ OAc
56,1	0,8182	0,5192	0,4615	1,000	2,500	OCH ₃ -aromático
29,7	2,0455	0,3462	0,2308	2,000	2,000	CH ₂ -/G-C ₅ -CH ₂ -C ₅ -G CH ₂ -/alquil saturado
21,1	1,0227	2,5962	0,6923	1,000	1,000	CH ₃ /acetil

Os espectros de RMN-APT obtidos em clorofórmio deuterado das frações orgânicas (FO1-FO5) são apresentados nas Figuras 52 a 56 e foram úteis para localizar as bandas de carbonos CH e CH₃, que estão abaixo do eixo, e as bandas acima do eixo, referentes aos carbonos CH₂.

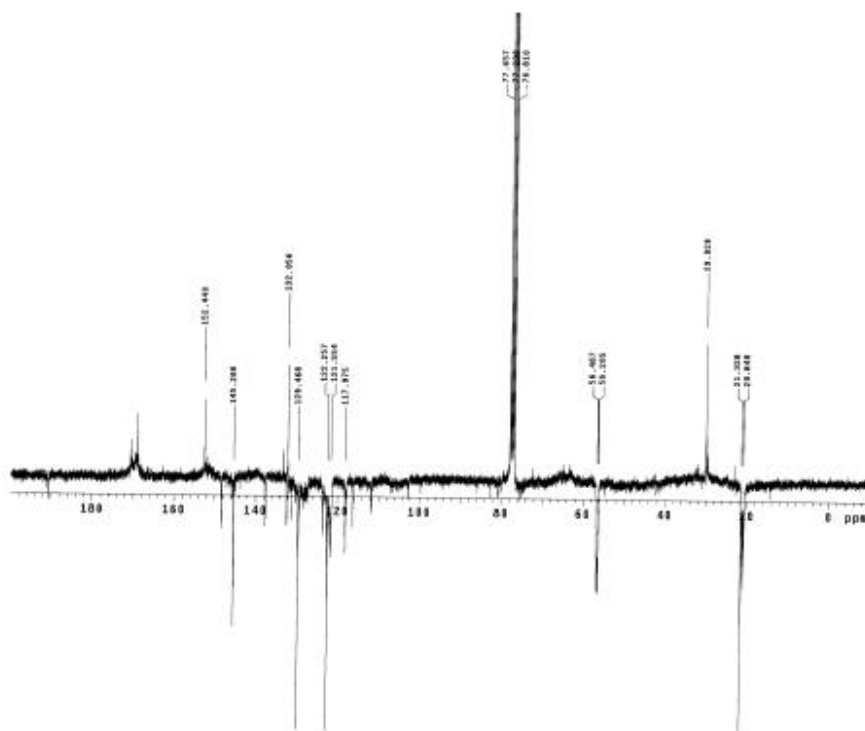


Figura 52. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO1 acetilada.

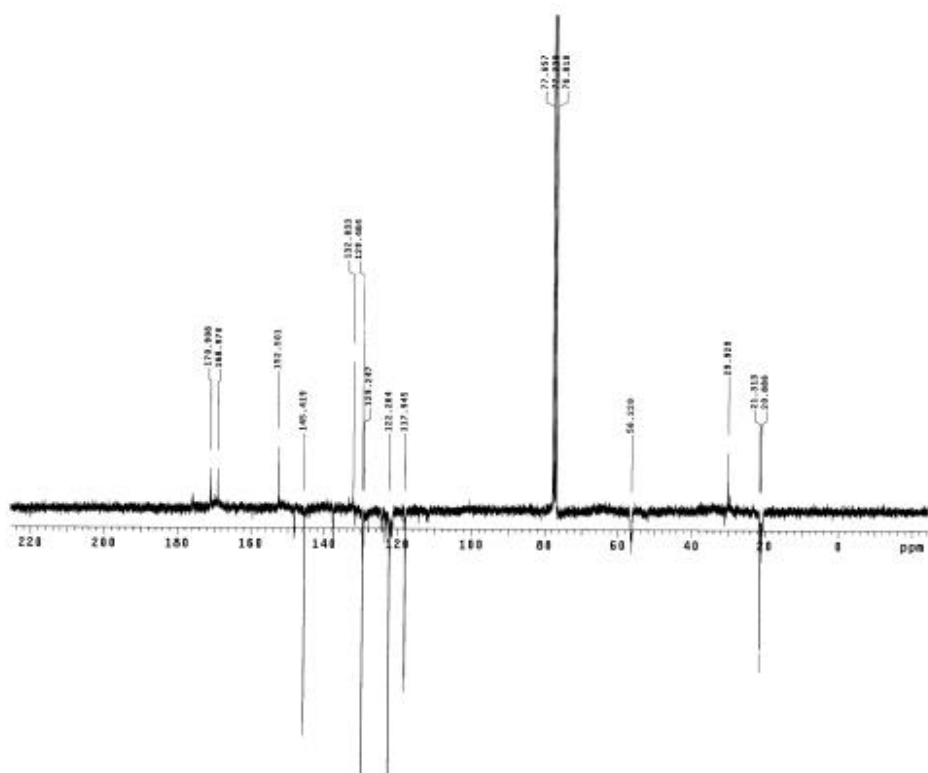


Figura 53. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO2 acetilada.

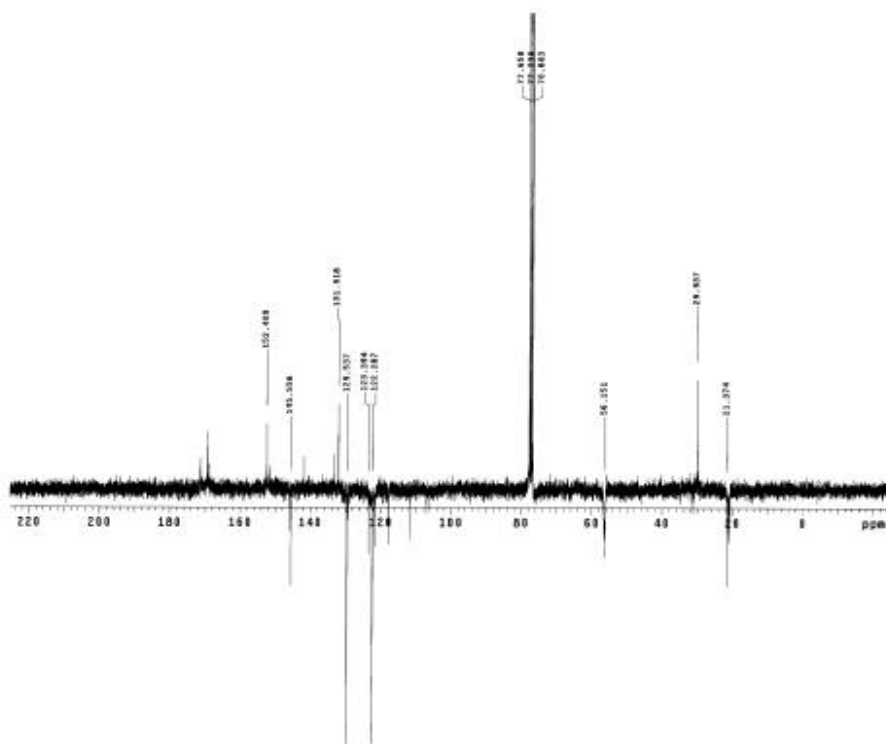


Figura 54. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO3 acetilada.

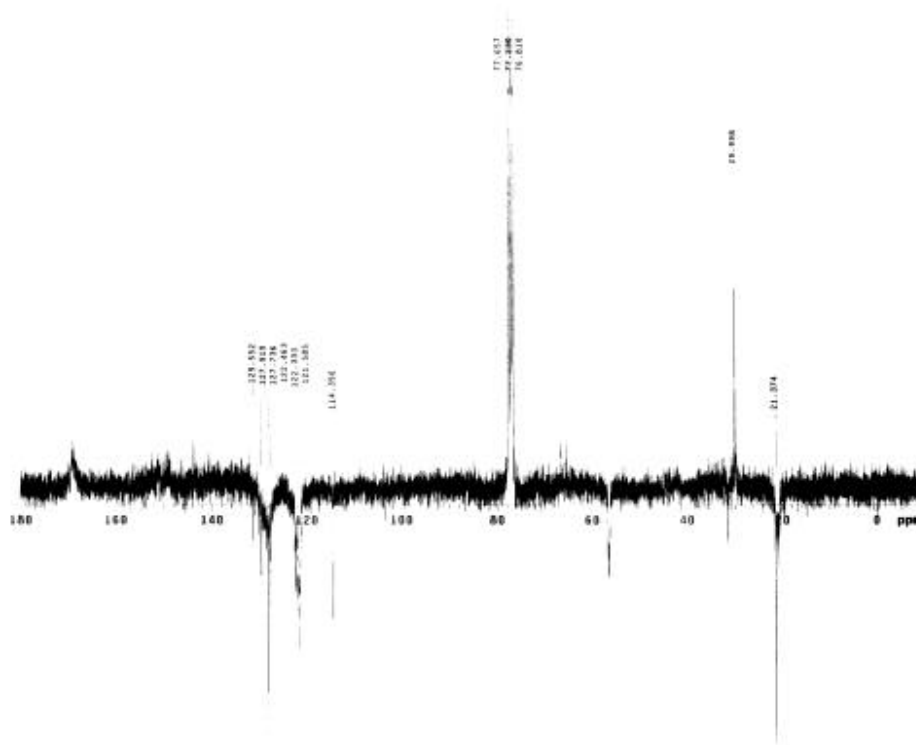


Figura 55. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO4 acetilada.

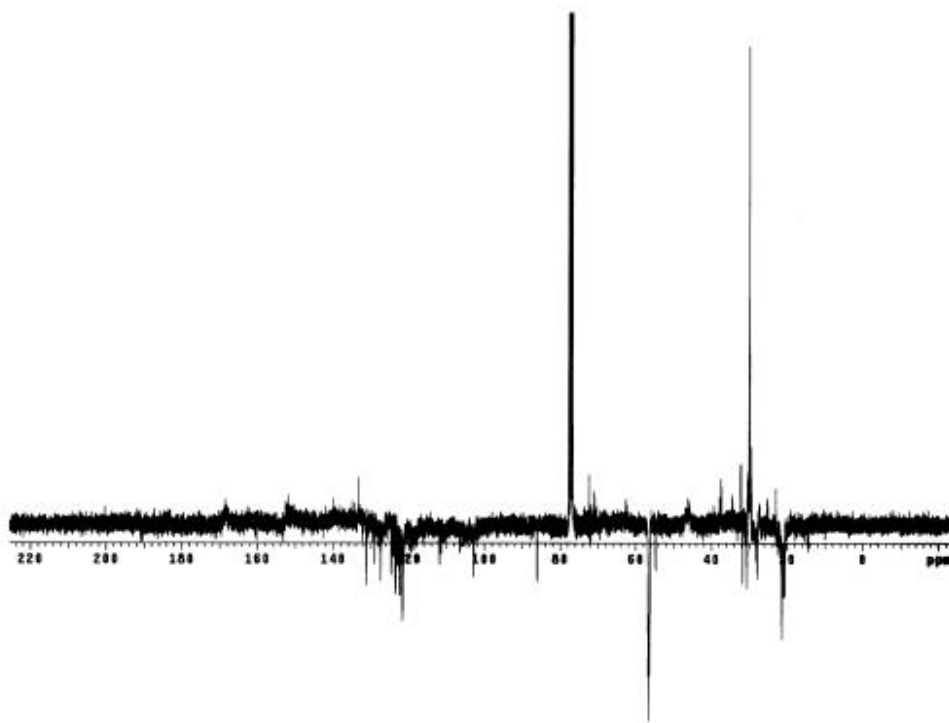


Figura 56. Espectro de RMN-APT da fração orgânica FO5 acetilada.

A fração FO6 não é típica de compostos derivados de lignina, como já foi discutido anteriormente. No entanto, o espectro de RMN-¹H mostra que provavelmente esta fração pode ser um composto puro, obtido da reação dos solventes utilizados na etapa de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

4.4. CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DO BAGAÇO NATURAL E PRÉ-TRATADO

As análises dos carboidratos (Tabelas 9 e 10) mostraram que, em consequência do tratamento por explosão a vapor, as hemiceluloses foram suficientemente despolimerizadas por serem solúveis em água quente (SCHULTZ et al., 1983). Em adição, a explosão a vapor causou degradação parcial da celulose, despolimerização da lignina e um aumento no conteúdo de lignina total aparente na fibra explodida.

Todas as modificações morfológicas que ocorreram no bagaço de cana em decorrência do pré-tratamento puderam ser avaliadas com o auxílio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma valiosa ferramenta nos estudos de trocas morfológicas de materiais lignocelulósicos tratados por processos que envolvem pressão e temperatura (BIERMANN et al., 1987; MURMANIS et al., 1986; SHORT e LYON, 1978; KORAN, 1970). Informações consideráveis podem ser obtidas por MEV considerando-se a separação das fibras, a condição das fibras e a separação das camadas da parede celular (BIERMANN et al., 1987).

Os estudos de MEV mostraram diferenças entre as fibras do bagaço natural (Figura 57) e do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (Figura 58).

A principal característica do bagaço de cana é a abundância de células de parênquima e segmentos de vaso (SUN et al., 2004; GEPLACEA, 1990), que aparecem formando feixes de fibras longitudinais, todos na mesma direção (Figura 57A). Neste caso, celulose, hemicelulose e lignina das paredes primárias e secundárias são distribuídas entre as células na lamela média. As células de parênquima (Figura 57B) são caracterizadas por paredes finas e muito porosas. Os segmentos de vasos podem ser de diferentes tipos, como, por exemplo, os vasos na forma de espiral com uma hélice simples como mostrados na Figura 57(C), que diferem em seus comprimentos. A Figura 57(D) mostra a seção transversal de um feixe de fibras de bagaço natural. Os aspectos clássicos da estrutura do bagaço podem ser observados: a lamela média composta

(LMC: lamela média verdadeira associada com as paredes primárias) e os três componentes da parede celular secundária: S₁, S₂ e S₃ (MICHALOWICZ et al., 1991).

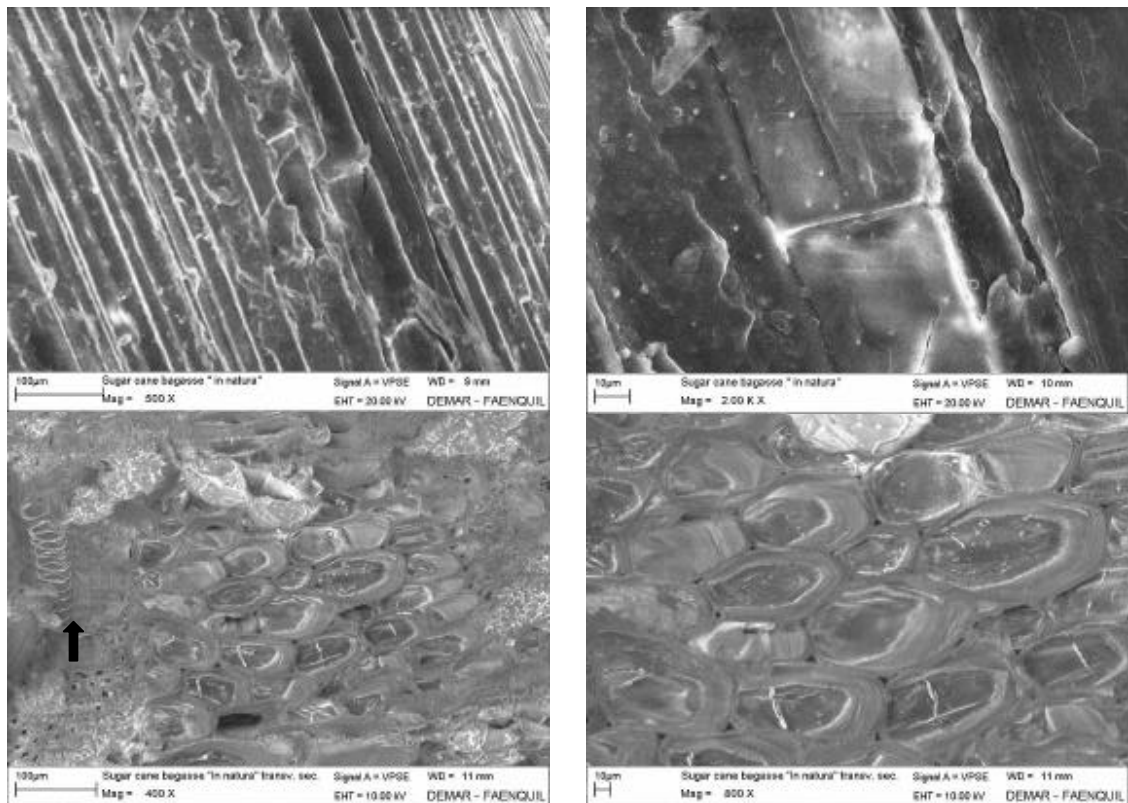


Figura 57. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de bagaço natural. (A) Seção longitudinal de um feixe de fibras; (B) Divisão de células de parênquima; (C) Seção transversal mostrando vaso na forma de espiral (hélice simples) e (D) Seção transversal: parede celular mostrando a lamela média composta e os três componentes da parede secundária.

O efeito do pré-tratamento por explosão a vapor pode ser visualizado através das microscopias mostradas na Figura 58. A desfibrilação ocorreu primeiramente na lamela média, devido ao amolecimento da lignina em temperaturas acima de 135°C, especialmente na presença de água (BIERMANN et al., 1987). A separação das microfibrilas (marcada com uma flecha) foi também um efeito do pré-tratamento, que age como força de cisalhamento do material (Figura 58A). Em adição à desfibrilação, vasos e fibras colapsaram (Figura 58B). Outro efeito do pré-tratamento foi a melhor

visualização dos pits, que são perfurações cujo papel é o de permitir o transporte de água entre segmentos de vasos vizinhos, em consequência da provável destruição dos torus deste elemento celular (Figura 58C).

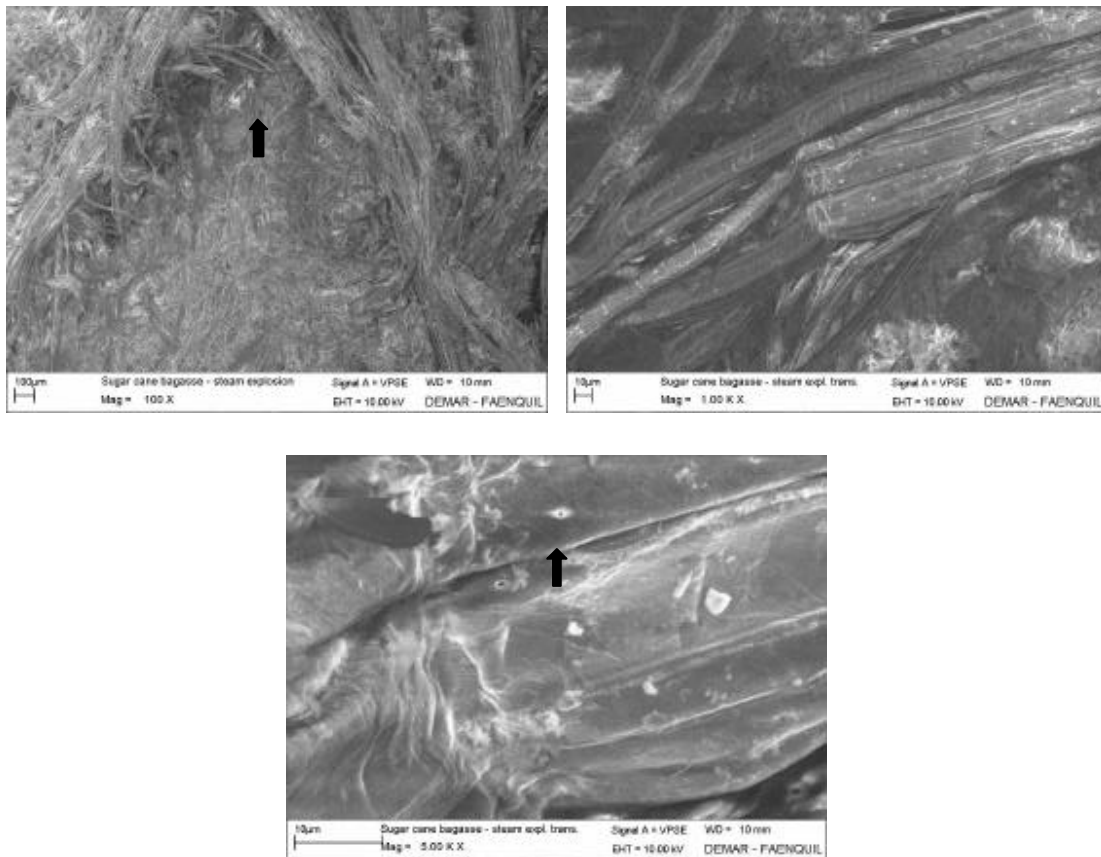


Figura 58. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de amostras de bagaço após o pré-tratamento por explosão a vapor a 190°C por 15 min. (A) Seção longitudinal: fibras totalmente separadas e microfibrilas; (B) Seção longitudinal: feixe de fibras colapsados e (C) Seção longitudinal: aparecimento de pits.

Assim, através do auxílio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), pôde-se visualizar de um modo bem claro as diferenças estruturais entre as fibras de bagaço de cana natural e de bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Verificou-se a destruição do tecido estrutural do bagaço, levando à separação das células com nítida degradação da lamela média em função do desfibramento, decorrente das forças de cisalhamento, em conjunto com as reações químicas características do pré-tratamento por explosão a vapor.

4.5. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR *Candida shehatae* Y-12858 e *Pichia stipitis* CBS 5774

A habilidade de *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* para fermentar eficientemente xilose a etanol tem sido amplamente reportada na literatura, incluindo a utilização do hidrolisado hemicelulósico como substrato. São excelentes fermentadoras de xilose a etanol sob condições microaeróbicas; porém, susceptíveis à inibição por compostos tóxicos, como vanilina, siringaldeído, ácido acético e furfural (NIGAM, 2001; EKEN-SARAÇOGLU e ARSLAN, 2000; SREENATH e JEFFRIES, 2000; FENSKE et al., 1998; DELGENES et al., 1996; SREENATH e JEFFRIES, 1996; McMILLAN, 1994b; ROBERTO et al., 1991; PRIOR et al., 1989).

4.5.1. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR *Candida shehatae* Y-12858 EM MEIO SINTÉTICO

As fermentações de xilose a etanol em meio sintético foram feitas sem ajuste prévio de pH para o monitoramento da mudança deste parâmetro no decorrer do processo fermentativo. O pH inicial para todas as concentrações de xilose testadas foi de 6,5 em média.

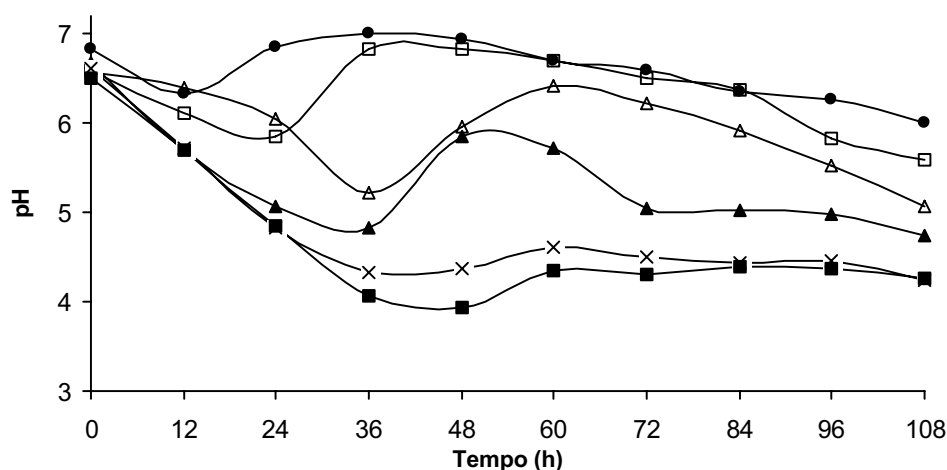


Figura 59. Variação do pH durante a fermentação de xilose a etanol por *C. shehatae* Y-12858 (● 20 g·L⁻¹; □ 40 g·L⁻¹; △ 50 g·L⁻¹; ▲ 60 g·L⁻¹; × 80 g·L⁻¹; ■ 100 g·L⁻¹).

As curvas da Figura 59 mostram que o valor do pH diminuiu de 6,8 para 6,3 em 12 horas e elevou-se a 7,0 em 36 horas, para as fermentações iniciadas com concentração inicial de xilose de 20 g·L⁻¹. Após esse período, o pH declinou continuamente até atingir pH 6,0 em 108 horas de fermentação. Comportamento semelhante foi observado para as fermentações iniciadas com concentração de xilose de 40 g·L⁻¹. O pH declinou para 5,8 em 24 horas, voltando a elevar-se para 6,9 nas 12 horas subsequentes. Após 36 horas de fermentação, o pH voltou a declinar, chegando ao valor final de 5,6. A diminuição do pH no decorrer do processo deve-se ao metabolismo das fontes de nitrogênio utilizadas no preparo do meio de cultura.

Para as outras concentrações de xilose testadas (50, 60, 80 e 100 g·L⁻¹), o perfil das curvas foi semelhante, sendo que o mínimo das curvas foi atingido após tempos mais longos de fermentação.

ROBERTO et al. (1994) relataram que o pH exerce pouco efeito sobre o rendimento de etanol e o crescimento celular das leveduras em fermentações de xilose por *P. stipitis* e *C. shehatae*. Esses autores obtiveram valores de rendimento de etanol variando de 0,34 a 0,37 g·g⁻¹ em pH 6,0 e 4,5, respectivamente, e produtividades volumétricas em torno de 0,9 g·L⁻¹·h⁻¹ numa faixa de pH de 4,0 a 6,0. Segundo du PREEZ et al. (1986), os rendimentos de etanol produzidos por *P. stipitis* variaram entre 0,45 e 0,42 g·g⁻¹ numa faixa de pH entre 4,0 e 5,5, decrescendo para 0,37 g·g⁻¹ quando o pH do meio foi aumentado para 6,5.

O crescimento celular máximo para as fermentações realizadas sob diferentes concentrações de xilose foi obtido no intervalo de 90 e 96 horas (Figura 60). Em geral, o crescimento nas primeiras 36 horas foi muito rápido para todas as concentrações de xilose testadas (fase exponencial) e, após este período, as células continuaram a se reproduzir mais vagarosamente (fase estacionária), pois o número de células que surge é compensado pelo número das que morrem (NEDER, 1992).

Verificou-se também que o crescimento celular da *C. shehatae* aumentou com o aumento da concentração de xilose. Este resultado indica que o etanol produzido não inibiu a fermentação de xilose nas várias concentrações testadas.

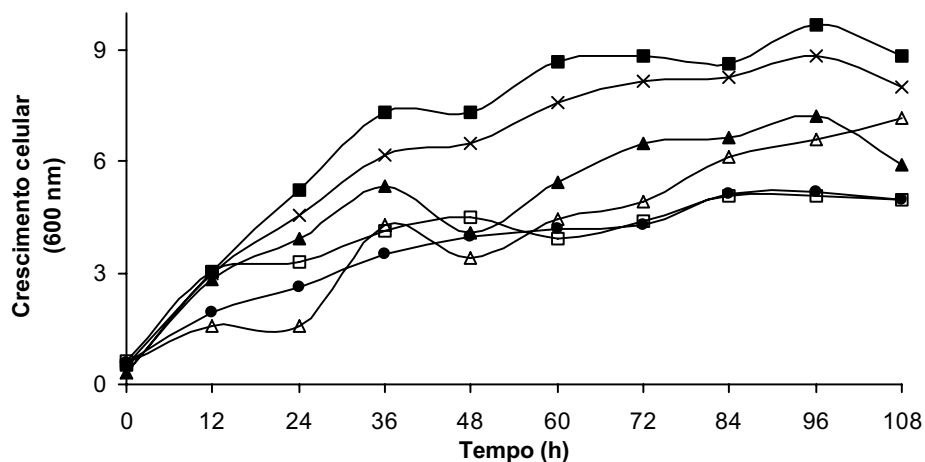


Figura 60. Crescimento celular da levedura *C. shehatae* Y-12858 nas fermentações de xilose em meio sintético, empregando concentrações iniciais de xilose de 20 g·L⁻¹; 40 g·L⁻¹; 50 g·L⁻¹; 60 g·L⁻¹; 80 g·L⁻¹; 100 g·L⁻¹.

As fermentações descritas acima foram efetuadas também com o objetivo de otimizar a produção de etanol a partir da concentração inicial de xilose presente no meio, visando utilizar as melhores condições fermentativas na avaliação posterior do efeito dos compostos inibidores (item 4.5.2.).

Os resultados, mostrados na Figura 61, apresentaram um aumento da concentração de etanol proporcionalmente ao aumento da concentração inicial do substrato.

As concentrações máximas de etanol foram obtidas em 48 horas de fermentação, exceto para as concentrações de 20 e 40 g·L⁻¹ de xilose, onde o máximo foi obtido em 24 horas. O etanol foi produzido em maior concentração (19,07 g·L⁻¹), em meio contendo 100 g·L⁻¹ de xilose, após 48 horas.

As cinéticas relativas ao consumo de xilose e da produção de etanol para as fermentações cujas concentrações máximas de etanol foram obtidas encontram-se apresentadas na Figura 62.

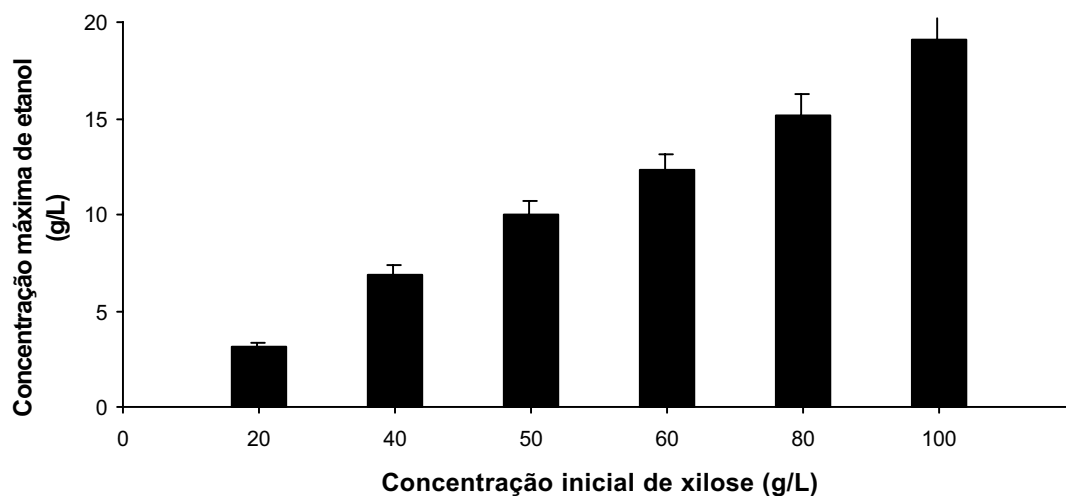


Figura 61. Comparação das concentrações máximas de etanol produzidas por *Candida shehatae* Y-12858 durante 24 horas (20 g·L⁻¹ e 40 g·L⁻¹) e 48 horas (50 g·L⁻¹, 60 g·L⁻¹, 80 g·L⁻¹ e 100 g·L⁻¹) em meios contendo várias concentrações de xilose.

Para as fermentações com 20 e 40 g·L⁻¹ de xilose, a produção máxima de etanol se deu nas primeiras 24 horas de processo fermentativo, sendo consumido após esse período. Esse tempo foi necessário para que toda a xilose fosse consumida. Para as demais fermentações (50, 60, 80 e 100 g·L⁻¹), a produção máxima de etanol ocorreu nas primeiras 48 horas e foi consumido no decorrer do processo. Para essas concentrações, a xilose foi totalmente consumida nas primeiras 36 horas de fermentação.

A concentração máxima de etanol em função do tempo de fermentação, a quantidade de xilose residual, o rendimento de etanol, o rendimento de células e a produtividade volumétrica são mostrados na Tabela 25. Os melhores rendimentos de etanol foram obtidos em meio contendo 50 g·L⁻¹ e 60 g·L⁻¹ de xilose ($Y_{p/s} = 0,30$ e $Y_{p/s} = 0,33$, respectivamente). Esses valores correspondem a 60 e 67% do rendimento teórico ($Y_{p/s} = 0,51$), respectivamente. Para essas concentrações de xilose (50 e 60 g·L⁻¹), a maior produtividade volumétrica foi obtida em meio de xilose com 50 g·L⁻¹ ($Q_p = 0,41$). Uma produtividade volumétrica alta de etanol também foi obtida com 100 g·L⁻¹ de xilose ($0,46 \text{ g·L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); entretanto, o rendimento de etanol foi de $Y_{p/s} = 0,23$, o que corresponde a apenas 45% do rendimento teórico.

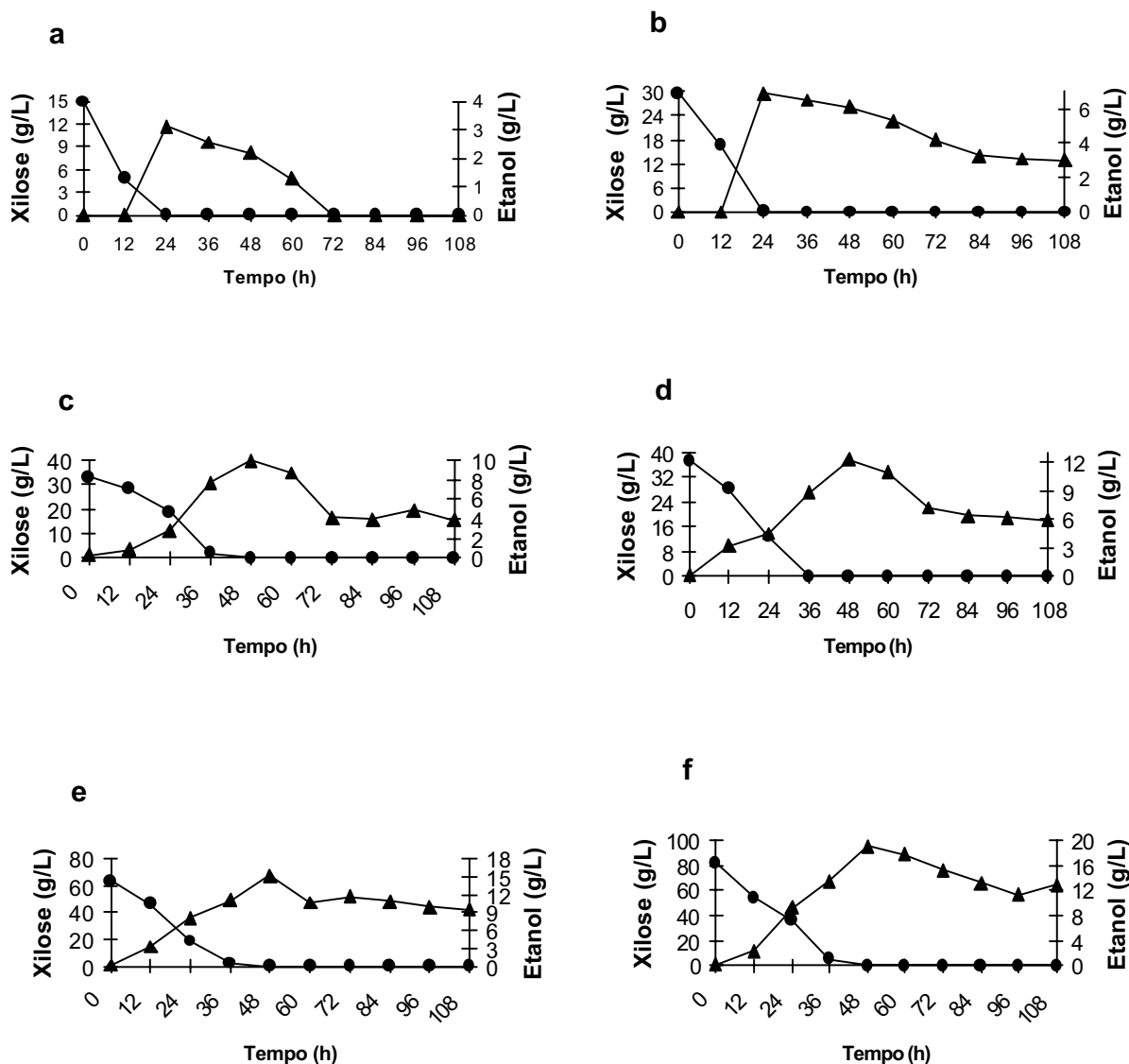


Figura 62. Produção de etanol (▲) e consumo de xilose (●) por *Candida shehatae* Y-12858 em diferentes concentrações de substrato: (a) 20 g·L⁻¹; (b) 40 g·L⁻¹; (c) 50 g·L⁻¹; (d) 60 g·L⁻¹; (e) 80 g·L⁻¹ e (f) 100 g·L⁻¹.

Resultados semelhantes foram publicados por FURLAN et al. (1994) para fermentações efetuadas a partir de meio contendo 20 g·L⁻¹ de xilose com *C. shehatae* ($Y_{x/s} = 0,10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$; $Y_{p/s} = 0,21 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$; $Q_p = 0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Por outro lado, du PREEZ et al. (1986), utilizando meio contendo 50 g·L⁻¹ de xilose, obtiveram melhores resultados que os produzidos nesse trabalho ($Y_{x/s} = 0,09 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$; $Y_{p/s} = 0,37 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$;

$Q_p = 0,96 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); porém, as diferenças podem ser atribuídas à diferença de cepa ou até mesmo ao tipo de fermentador utilizado.

Considerando os valores de produtividade volumétrica e rendimento de etanol para as fermentações efetuadas com $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, esta foi a concentração escolhida para o início dos testes de fermentação na presença dos compostos aromáticos de baixa massa molar, oriundos da degradação de carboidratos e lignina produzidos durante o pré-tratamento por explosão a vapor.

Tabela 25. Efeito da concentração inicial de xilose nos parâmetros de fermentação da levedura *C. shehatae* Y-12858.

Concentração inicial de xilose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Tempo de produção máxima de etanol (h)	Máxima concentração de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Xilose residual ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a	$Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a	Q_p ^a
20	24	3,12	< L.D.*	0,21	0,14	0,26
40	24	6,89	0,15	0,23	0,13	0,57
50	48	9,96	< L.D.*	0,30	0,08	0,41
60	48	12,29	< L.D.*	0,33	0,10	0,29
80	48	15,17	< L.D.*	0,24	0,10	0,34
100	48	19,07	0,13	0,23	0,08	0,46

Símbolos:

^a: valor determinado no ponto de máxima produção de etanol.

$Y_{p/s}$: rendimento de etanol produzido a partir da xilose consumida.

$Y_{x/s}$: rendimento de células produzidas a partir da xilose consumida.

Q_p : produtividade volumétrica de etanol (12→12 horas).

*: abaixo do limite de detecção.

4.5.2. AÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS DE BAIXA MASSA MOLAR SOBRE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR *Candida shehatae* Y-12858

As fermentações com *Candida shehatae* Y-12858 foram efetuadas em meio contendo xilose suplementado com diferentes concentrações dos seguintes compostos aromáticos de baixa massa molar: siringaldeído, vanilina, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *trans*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

Todos esses compostos foram identificados e quantificados previamente no hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (item 4.3.2) e as concentrações testadas variaram para cada composto.

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado com *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído a 5,0 g·L⁻¹ estão mostrados nas Figuras 63, 64 e 65, respectivamente. Esses aldeídos inibiram fortemente o crescimento celular (Figuras 63a, 64a e 65a), a produção de etanol (Figura 63b, 64b e 65b) e, por conseguinte, o consumo de xilose (Figura 63c, 64c e 65c). Aparentemente a xilose consumida foi praticamente utilizada apenas para o crescimento celular, como mostrado nas Figuras 63a, 64a e 65a.

O efeito inibitório para os três aldeídos foi praticamente o mesmo. A produção de etanol foi nula quando *p*-hidroxibenzaldeído (Figura 63b) e siringaldeído (Figura 65b) foram utilizados e quando a vanilina foi testada, a produção de álcool foi de apenas 7,9% em relação ao controle (Figura 64b).

Concentrações menores desses aldeídos não puderam ser testadas. Entretanto, de acordo com DELGENES et al. (1996), concentrações menores também causaram efeitos inibitórios significativos. Esses autores relataram que a vanilina foi o composto com o maior poder inibitório (na concentração de 1,0 g·L⁻¹), quando foi utilizada *C. shehatae* ATCC 22984 com a concentração de xilose no meio de 20 g·L⁻¹. Verificaram ainda que os outros aldeídos testados (*p*-hidroxibenzaldeído e siringaldeído) também foram altamente tóxicos à ação da levedura e a diferença de inibição entre eles foi muito sutil. No mesmo trabalho, os autores observaram que, em relação à produção de etanol, as porcentagens de inibição foram de 4,5%, 4% e 3,3% de 2,0 g·L⁻¹ de vanilina, 1,5 g·L⁻¹ de *p*-hidroxibenzaldeído e 1,5 g·L⁻¹ de siringaldeído, respectivamente e em relação ao crescimento microbiano, a inibição foi de 1,6%, 0,8% e 5% de vanilina (2,0 g·L⁻¹), 1,5 g·L⁻¹ de *p*-hidroxibenzaldeído e 1,5 g·L⁻¹ de siringaldeído, respectivamente.

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado com os ácidos *p*-hidroxibenzóico, *trans*-cumárico, ferúlico, vanílico e siríngico a 5,0 g·L⁻¹ estão mostrados nas Figuras 66 a 70.

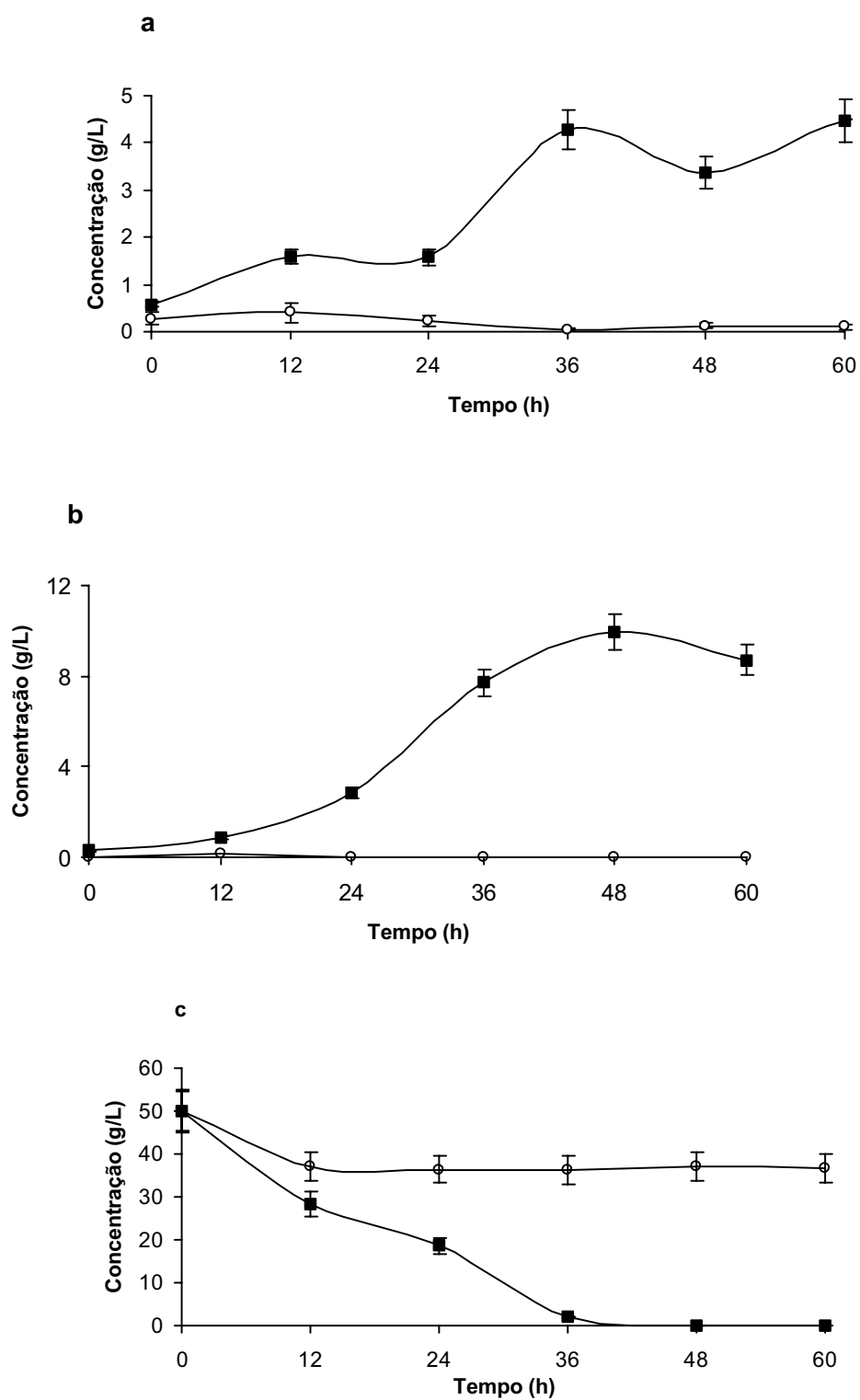


Figura 63. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de *p*-hidroxibenzaldeído na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

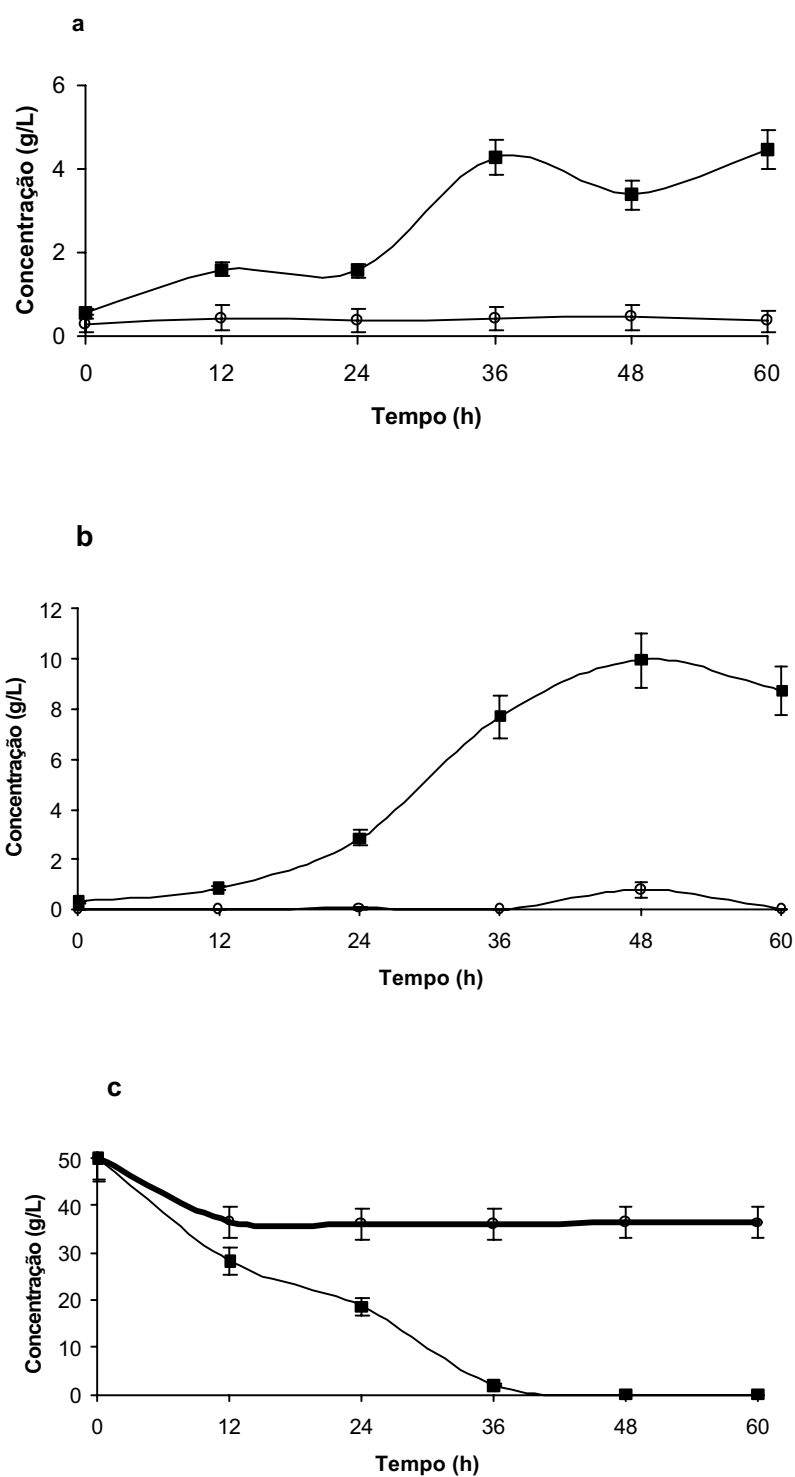


Figura 64. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de vanilina na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

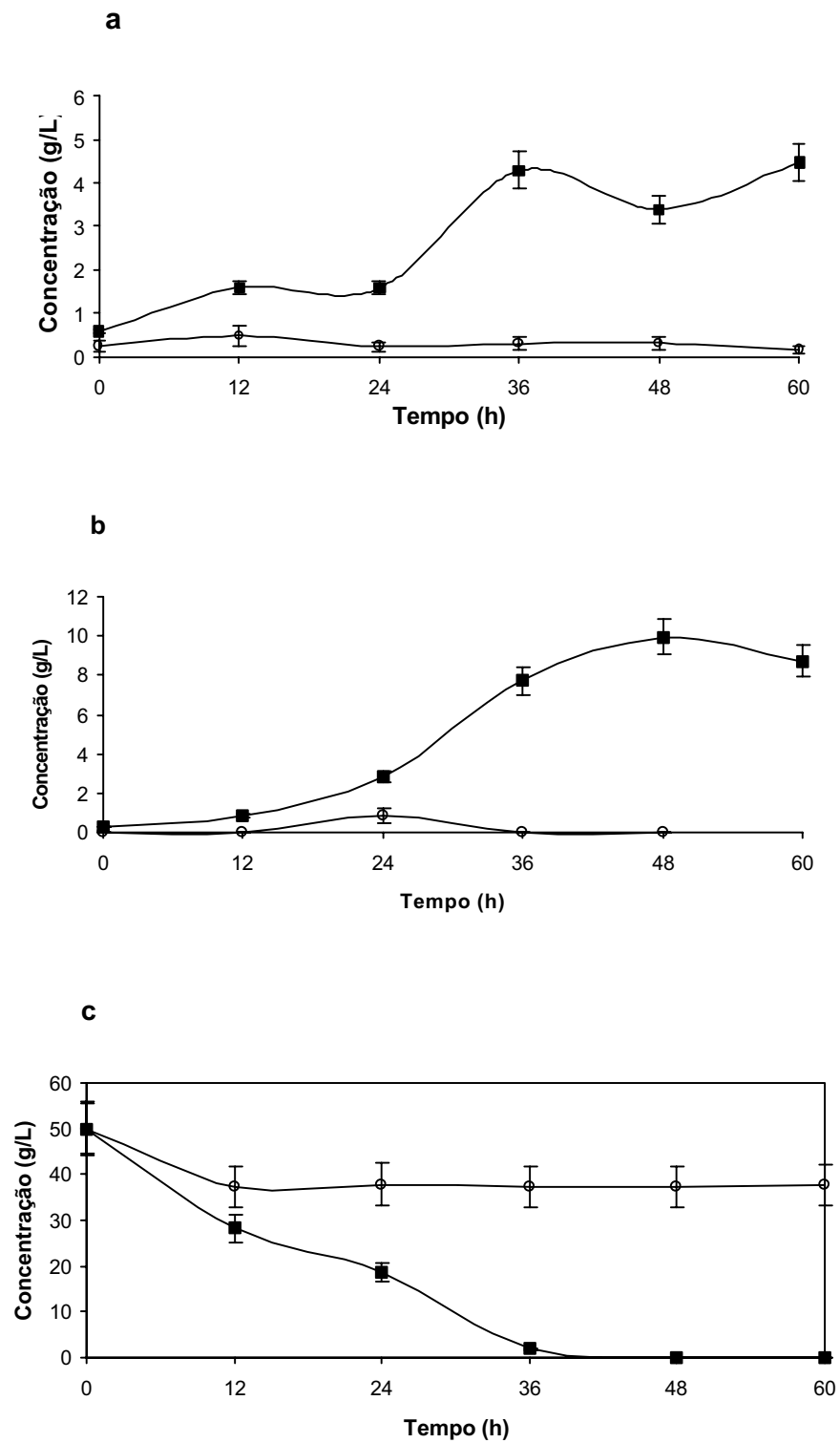


Figura 65. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de siringaldeído na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

A concentração de 5,0 g·L⁻¹ dos ácidos *trans*-cumárico, ferúlico e vanílico inibiu totalmente o crescimento celular (Figuras 67a, 68a e 69a, respectivamente), não havendo, portanto, consumo de xilose (Figuras 67c, 68c e 69c, respectivamente) ou a produção de etanol (Figuras 67b, 68b e 69b, respectivamente) durante a fermentação.

Para os ácidos *p*-hidroxibenzóico e siríngico, a concentração de 5,0 g·L⁻¹ não foi totalmente inibitória nem ao crescimento celular (Figuras 66a e 70a) e nem à produção de etanol por *C. shehatae* (Figuras 66b e 70b, respectivamente). O ácido *p*-hidroxibenzóico produziu menos etanol que o controle durante todo o processo e, com o ácido siríngico, houve inibição da produção de etanol apenas após 30 horas de fermentação. Com 48 horas de fermentação, o etanol estava sendo produzido em altas quantidades: 7,43 g·L⁻¹ na presença de ácido siríngico e 2,63 g·L⁻¹ na presença de ácido *p*-hidroxibenzóico (75% e 26% do controle, respectivamente), restando um excedente de xilose no meio para os dois compostos (7,42 g·L⁻¹ e 32,1 g·L⁻¹, respectivamente).

Assim, os dados de produção de etanol e crescimento celular mostraram que o ácido siríngico e o ácido *p*-hidroxibenzóico não são fortes inibidores à ação da *C. shehatae*, mesmo na concentração de 5,0 g·L⁻¹, considerada altamente tóxica à levedura quando usados com os outros compostos ácidos testados.

Dentre os compostos ácidos testados, o efeito inibitório afetou mais a produção de etanol do que o crescimento celular. Quando a concentração de 5,0 g·L⁻¹ foi utilizada, o ácido *trans*-cumárico inibiu em 89,4% a produção de células e os ácidos ferúlico e vanílico em 87,3% e 87%, respectivamente. Para todos esses compostos, não houve produção de etanol na concentração de 5,0 g·L⁻¹.

Os ácidos *trans*-cumárico, ferúlico e vanílico foram mais tóxicos para o crescimento celular e para a produção de etanol que os três aldeídos testados e discutidos anteriormente. Por outro lado, o ácido siríngico foi o composto que apresentou menor efeito inibitório para o crescimento celular e para a produção de etanol, seguido do ácido *p*-hidroxibenzóico.

Na literatura, a ação inibitória desses ácidos aromáticos derivados da lignina foi encontrada em fermentações de xilose a etanol mostrando sua forte ação inibitória, porém frente a outros microrganismos que não a *C. shehatae*, como *S. cerevisiae* (MARTIN et al., 2002), *Z. mobilis* (RANATUNGA et al., 1997), *K. pneumoniae* (NISHIKAWA et al., 1988; TRAN e CHAMBERS, 1986), *G. oxydans* e *F. oxysporum* (BUCHERT et al., 1989) e *E. coli* (ZALDIVAR e INGRAM, 1999).

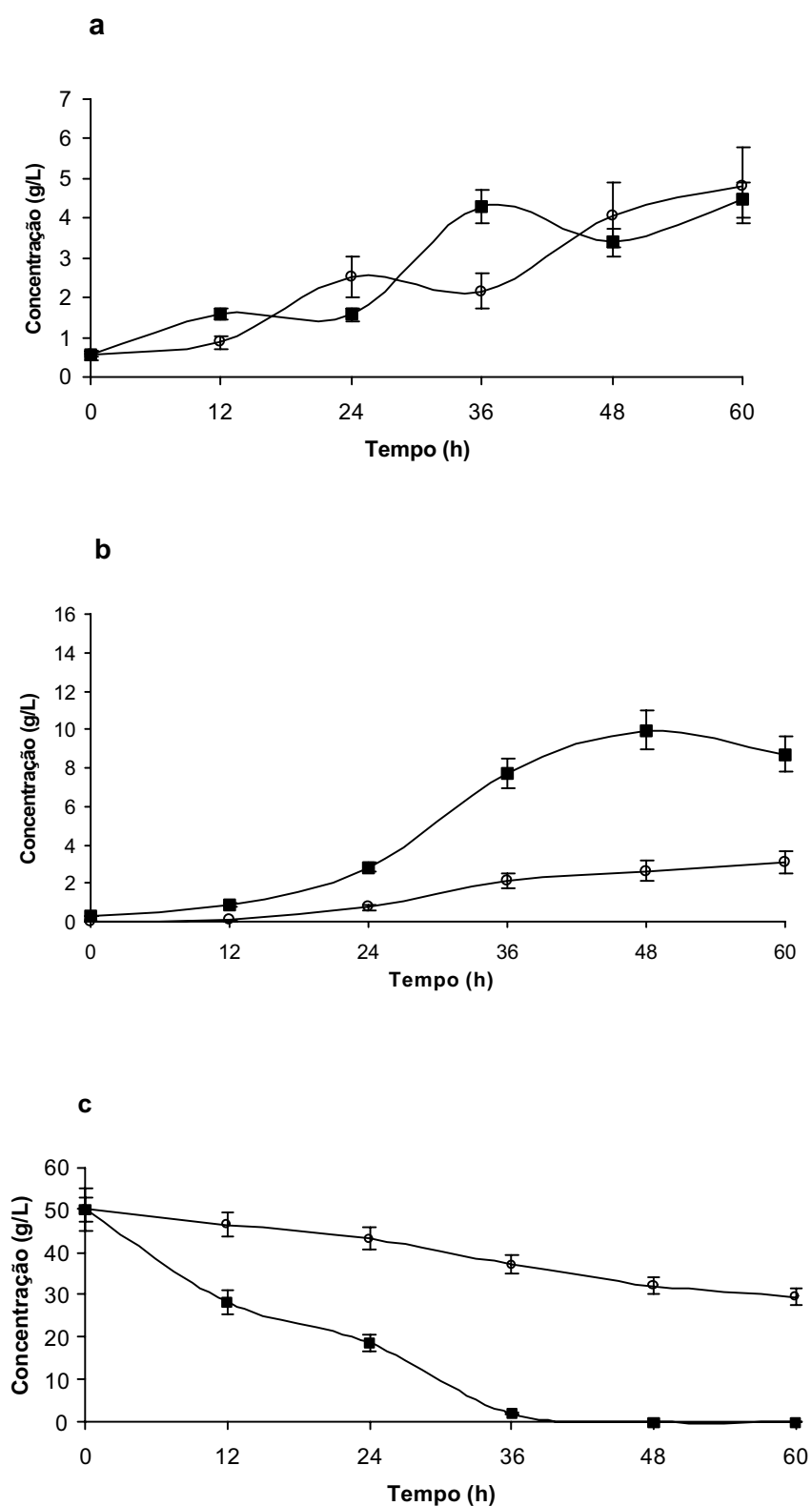


Figura 66. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

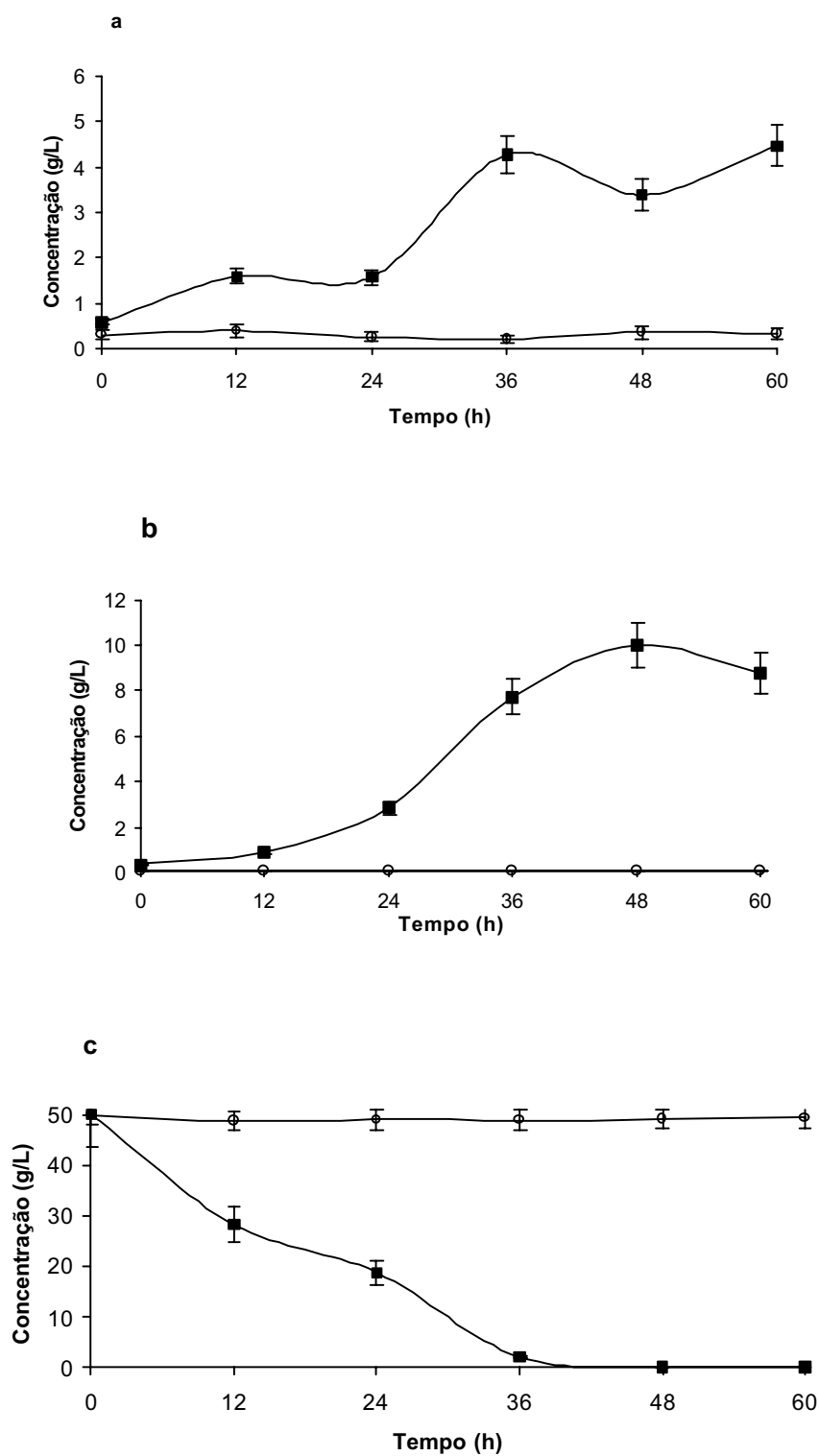


Figura 67. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido *trans*-cumárico na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

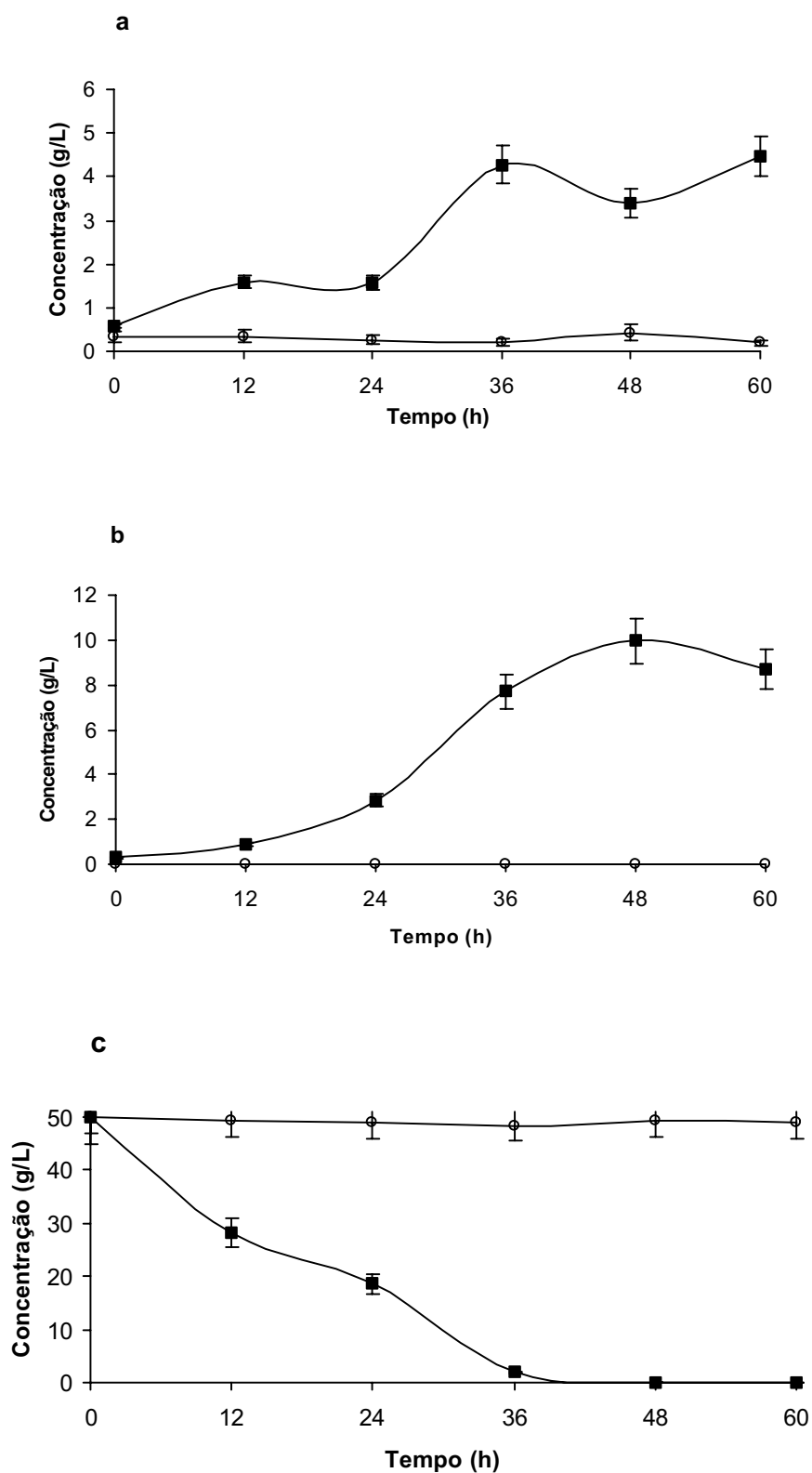


Figura 68. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de ácido ferúlico na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■ Controle; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

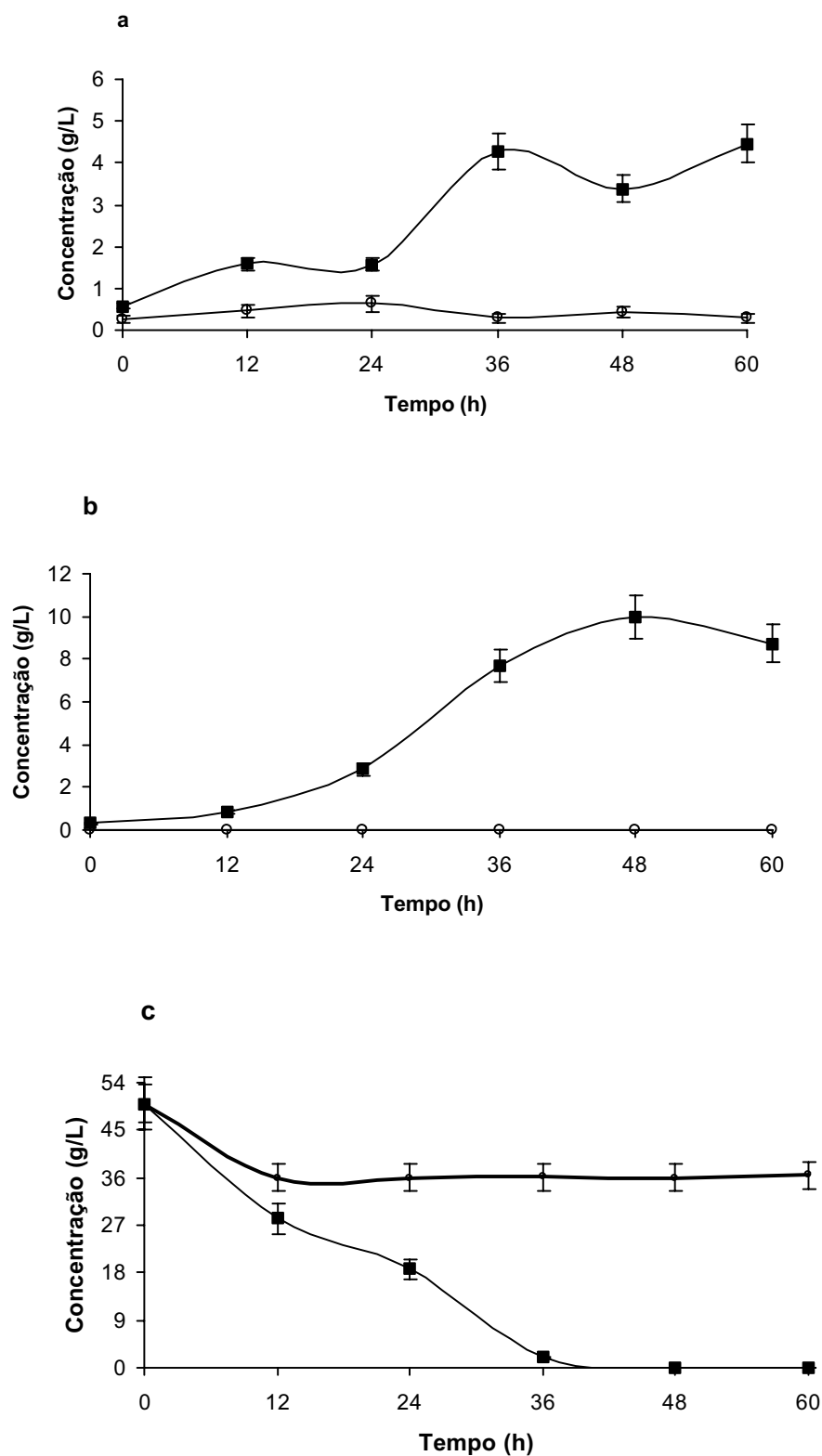


Figura 69. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de ácido vanílico na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■ Controle; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

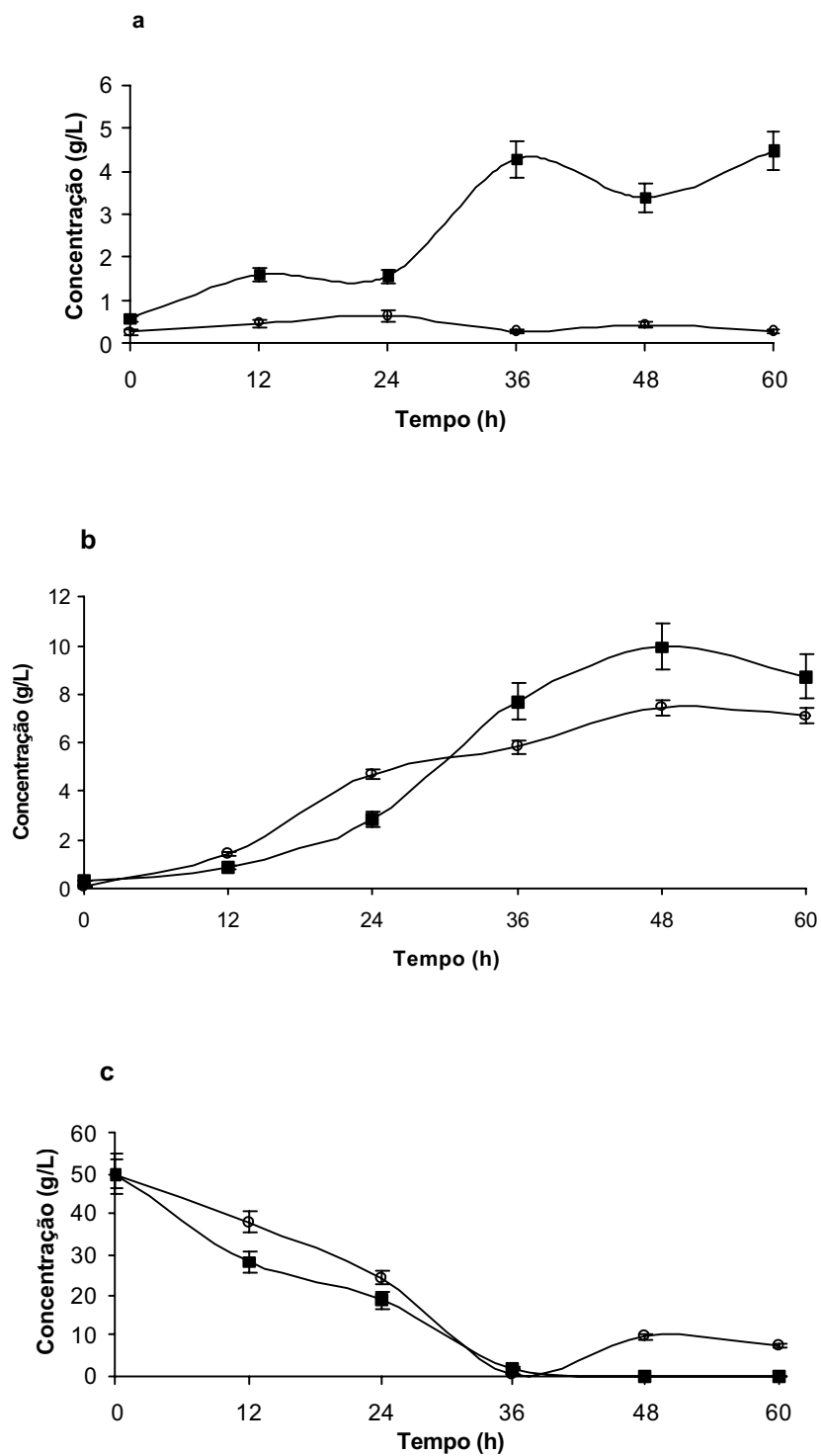


Figura 70. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de ácido sirínico na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■ Controle; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado com ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural estão mostrados nas Figuras 71 a 73. Na concentração de 5,0 g·L⁻¹, esses compostos derivados da degradação dos carboidratos inibiram quase que totalmente o crescimento celular (Figuras 71a-73a), a produção de etanol (Figuras 71b-73b) e, por conseguinte, o consumo de xilose (Figuras 71c-73c).

A concentração de ácido acético a 2,0 g·L⁻¹ foi quase tão tóxica ao crescimento celular e à produção de etanol quanto a concentração de 5,0 g·L⁻¹ (Figura 71b). Na concentração de 2,0 g·L⁻¹ de ácido acético, apenas 13,3% do crescimento microbiano e 21% da produção de etanol foram observados. Quando a concentração aumentou para 5,0 g·L⁻¹, a produção de álcool já era nula e a produção de células de apenas 13,3% em relação ao controle. O grau de toxicidade do ácido acético tem sido atribuído à sua forma não dissociada, sendo, portanto, dependente do pH (PRIOR et al., 1978). Estudando a levedura *P. tannophilus*, LEE e MCCASKEY (1983) verificaram que a presença de 0,5% de ácido acético no meio de fermentação inibiu completamente o crescimento da levedura em pH 3,0, 4,2 e 5,2; entretanto, as concentrações de 0,05% e 0,1% estimularam o crescimento nesses valores de pH. O crescimento foi também favorecido com 0,25% de ácido acético em pH 4,2 e 5,2; porém, em pH 3,0, ocorreu inibição.

A sensibilidade das atividades fermentativas do ácido acético aparentemente é dependente da cepa e do microrganismo utilizado (DELGENES et al., 1996). Com uma concentração de ácido acético de 11,9 g·L⁻¹, a produção de etanol por *P. stipitis* CBS 5776 foi de 24% do controle (TRAN e CHAMBERS, 1986), enquanto 13 g·L⁻¹ do ácido inibiu completamente a produção de etanol a partir da xilose por *P. tannophilus* (WATSON et al., 1984). A concentração de 2,0 g·L⁻¹ de furfural apresentou uma fraca inibição sobre o metabolismo da levedura durante toda a fermentação (Figura 72a) e foi tóxica à produção de etanol após 30 horas de processo (Figura 72b).

Para todos os compostos inibidores testados, o processo de crescimento celular da *C. shehatae* foi inibido em uma menor extensão que o processo de produção de etanol. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por DELGENES et al. (1996), que estudaram a ação de alguns compostos inibidores à ação de *C. shehatae* e *P. stipitis*, por BANERJEE et al. (1981), usando *Saccharomyces cerevisiae* cultivada na presença de furfural e por NISHIKAWA et al. (1988), estudando o efeito dos compostos derivados de lignina nas atividades fermentadoras de *Klebsiella pneumoniae*.

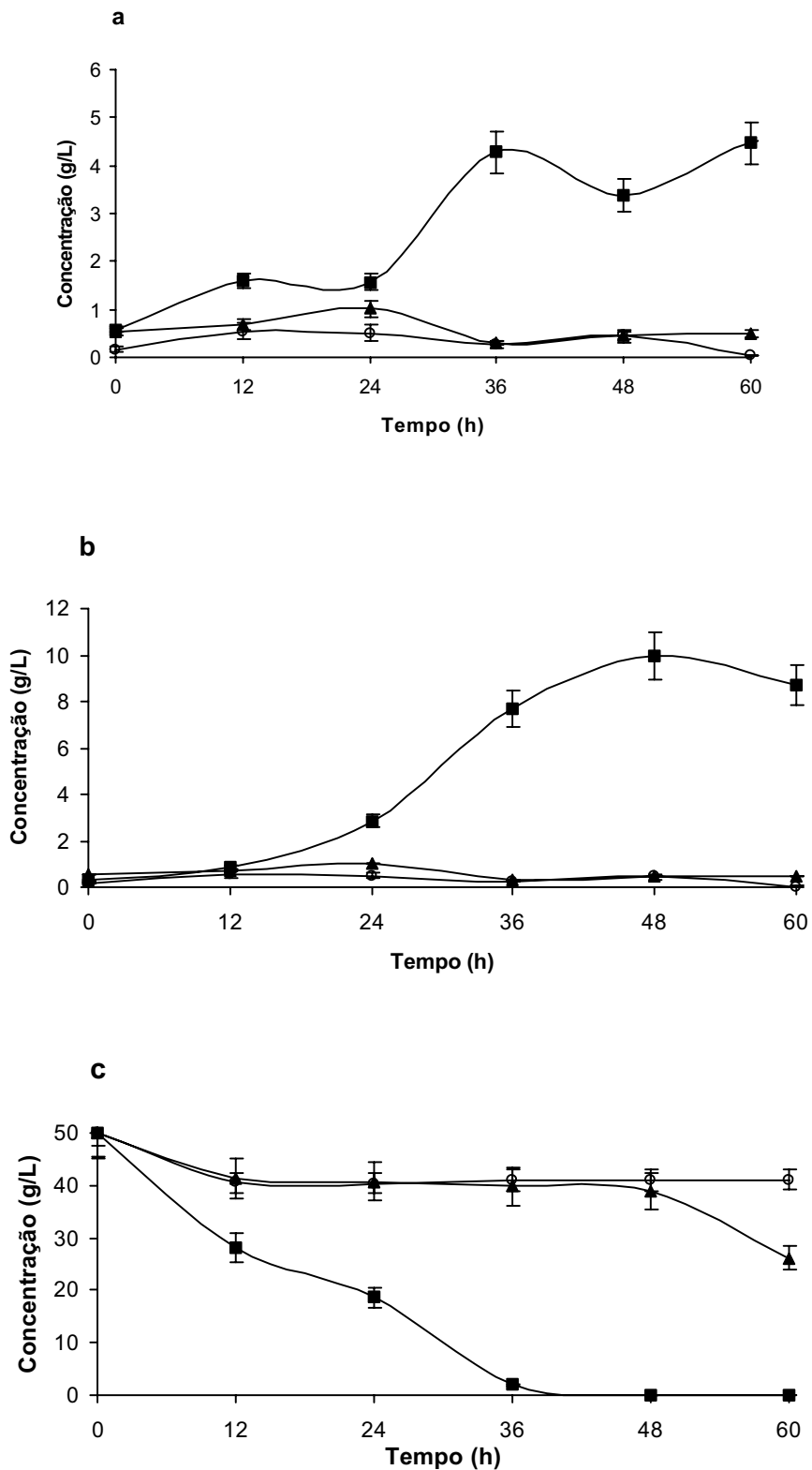


Figura 71. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de ácido acético em diferentes concentrações (■ Controle; $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

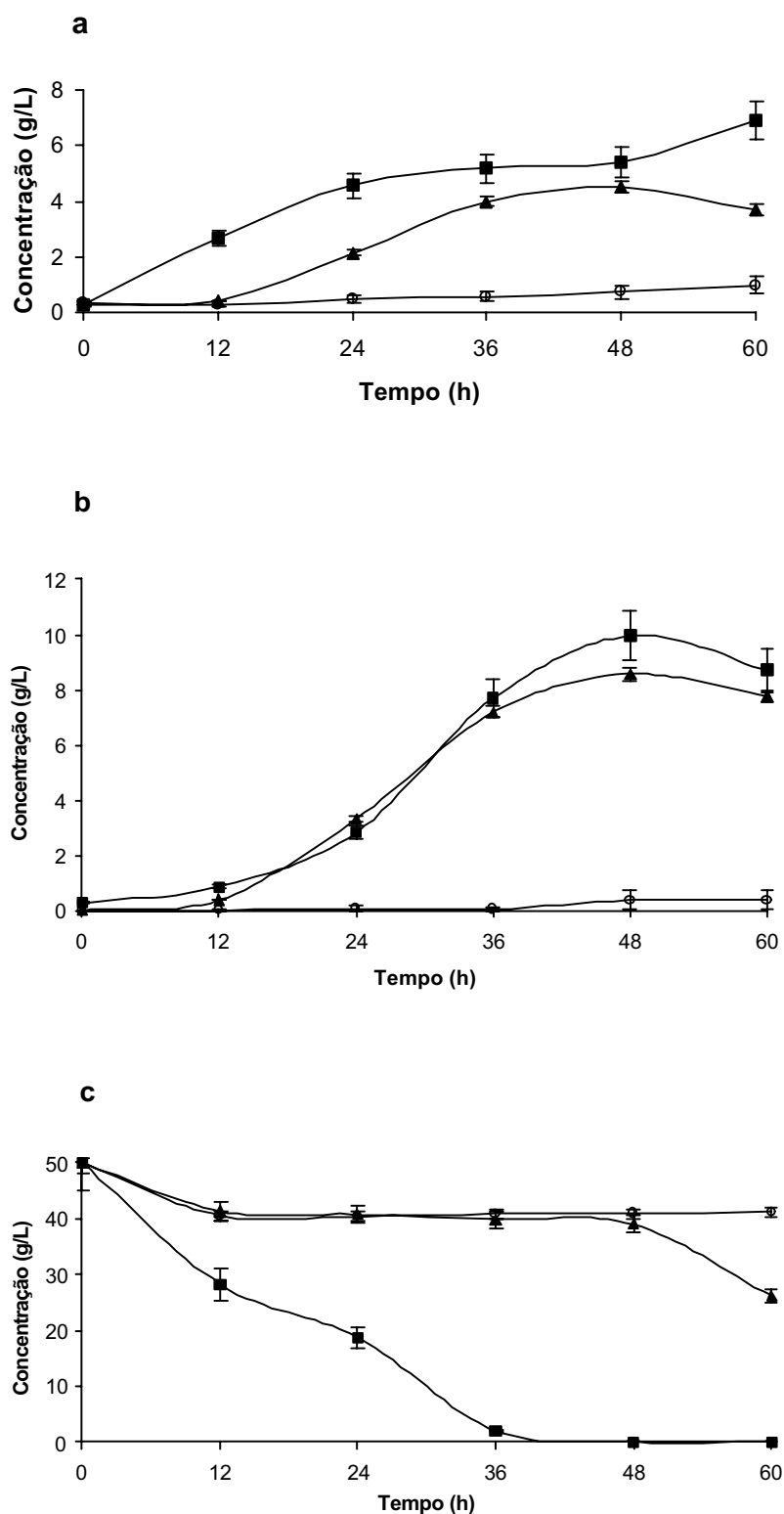


Figura 72. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de furfural em diferentes concentrações (■ Controle; ▲ $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ◻ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

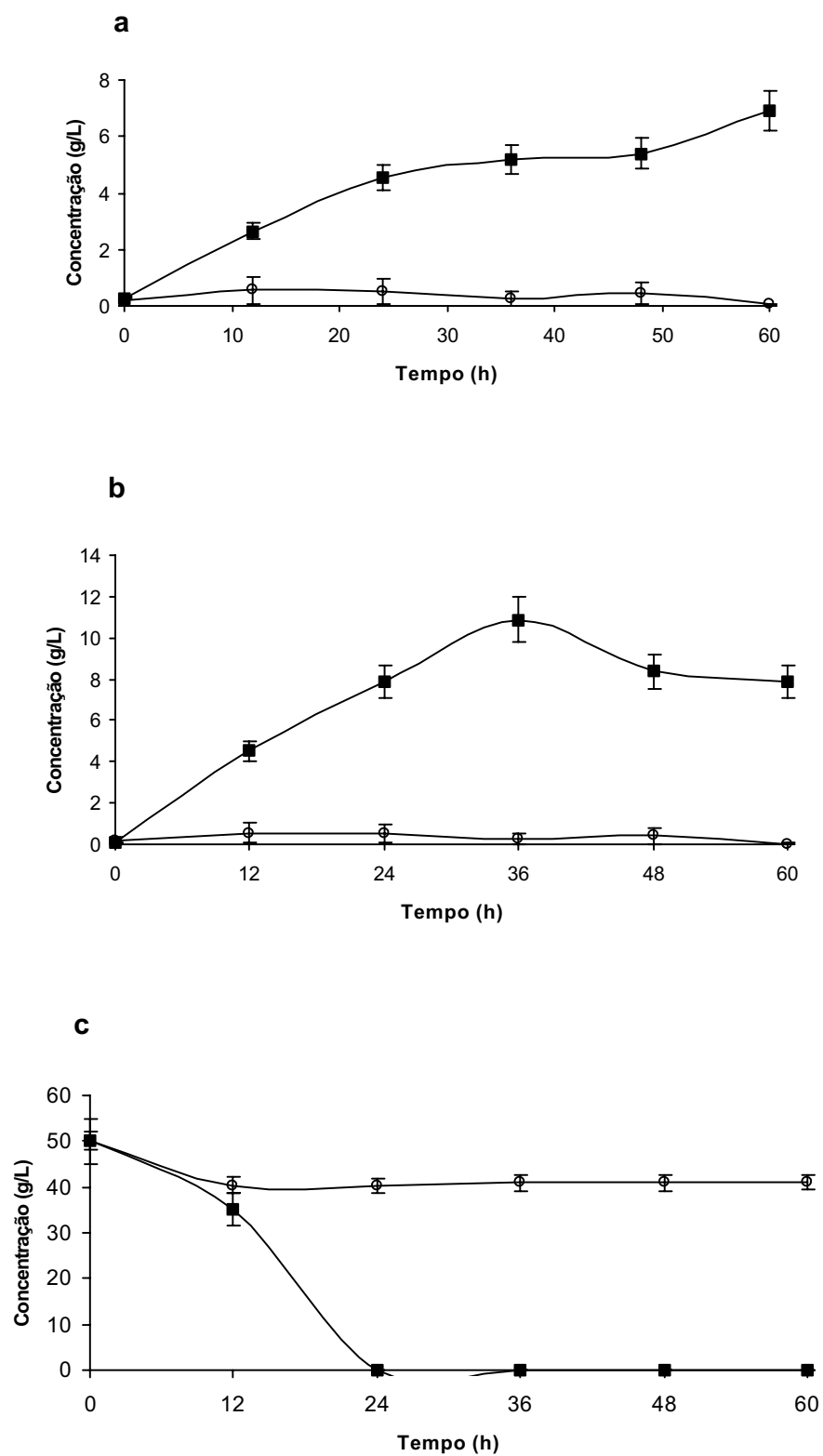


Figura 73. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y-12858 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de hidroximetilfurfural na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■ Controle; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.5.3. FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR *Pichia stipitis* CBS 5774

As fermentações de xilose a etanol em meio sintético por *Pichia stipitis* CBS 5774 foram feitas sem o ajuste prévio de pH para o monitoramento da mudança deste parâmetro no decorrer do processo fermentativo. O pH inicial para todas as concentrações de xilose testadas foi de 5,70 a 5,82, e entretanto, com o início do processo fermentativo, observou-se variação de pH nos meios. A variação de pH em função do tempo de fermentação para as diferentes concentrações iniciais de xilose é mostrada na figura 74.

Verificou-se que, durante o processo fermentativo, houve formação de ácidos (abaixamento de pH) e que em concentrações menores (20 g·L⁻¹ e 40 g·L⁻¹), esta variação foi intercalada pela produção e consumo desses ácidos.

A partir de 60 g·L⁻¹ de xilose, o pH atingiu seu valor mínimo com 36 horas de processo fermentativo, coincidindo com o ápice da produção de etanol para todas as fermentações, como mostrado na figura 76.

De certa forma, a variação de pH para *P. stipitis* CBS 5774 foi semelhante à observada para *C. shehatae* Y-12858 (figura 59).

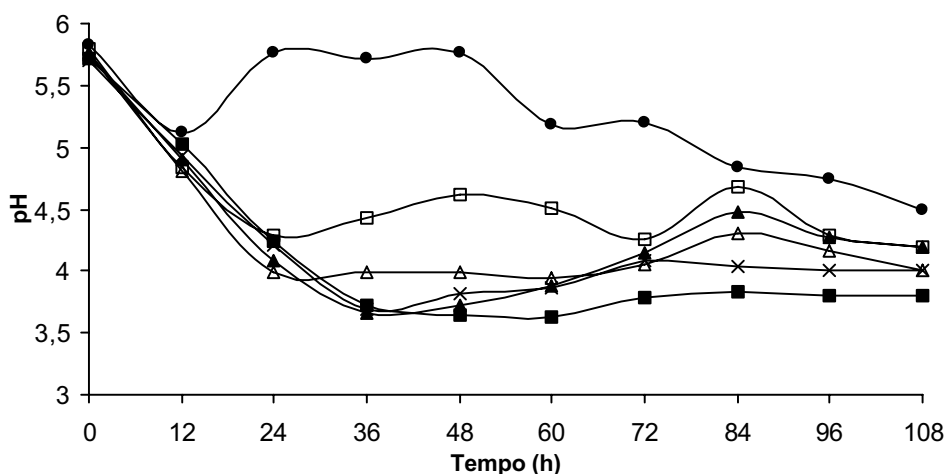


Figura 74. Variação do pH durante a fermentação de xilose a etanol por *P. stipitis* CBS 5774 (◻ 20 g·L⁻¹; ◻ 40 g·L⁻¹; ◻ 50 g·L⁻¹; ◻ 60 g·L⁻¹; × 80 g·L⁻¹; ◻ 100 g·L⁻¹).

A variação do crescimento celular da levedura *Pichia stipitis* CBS 5774, em função do tempo de fermentação para as diferentes concentrações iniciais de xilose, é mostrada na figura 75.

O crescimento celular atingiu um máximo no intervalo entre 96 e 108 horas de fermentação, independentemente da concentração inicial de xilose utilizada.

Em geral, o crescimento até 36 horas foi muito rápido (fase exponencial), coincidindo com o ápice da produção de etanol e, após este período, as células continuaram a se reproduzir mais vagarosamente (fase estacionária). Assim, a produção de etanol está correlacionada com a quantidade de células formadas no meio de fermentação.

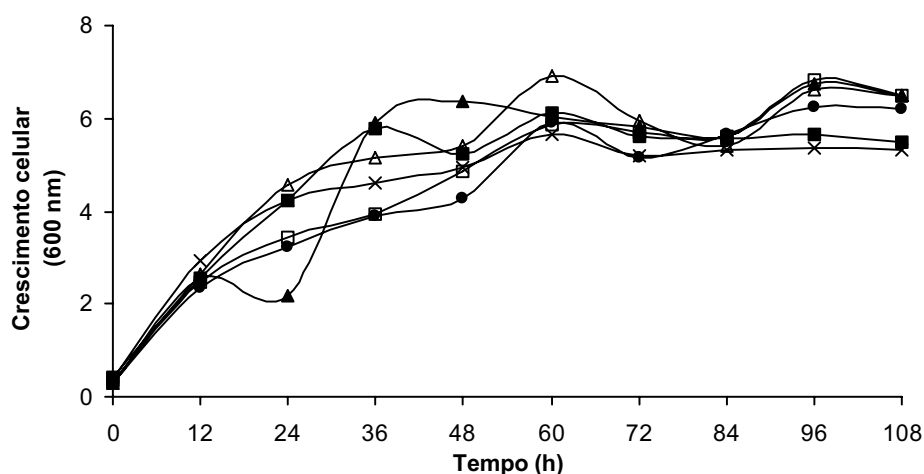


Figura 75. Crescimento celular da levedura *P. stipitis* CBS 5774 nas fermentações de xilose em meio sintético (Concentração inicial de xilose: 20 g·L⁻¹; 40 g·L⁻¹; 50 g·L⁻¹; 60 g·L⁻¹; x 80 g·L⁻¹; 100 g·L⁻¹).

Como dito anteriormente, as concentrações máximas de etanol foram obtidas com 36 horas de fermentação. A figura 76 mostra a comparação das concentrações máximas de etanol obtidas nas diferentes concentrações de xilose testadas. Observou-se um aumento gradativo da concentração de etanol proporcional ao aumento da concentração inicial do substrato, exceto para as concentrações de xilose de 50 g·L⁻¹ e 60 g·L⁻¹, que apresentaram valores de concentração de etanol muito próximos (10,88 g·L⁻¹ e 10,11 g·L⁻¹, respectivamente). O etanol foi produzido em maior concentração (19,08 g·L⁻¹) em 36 horas de fermentação em meio contendo 100 g·L⁻¹ de xilose.

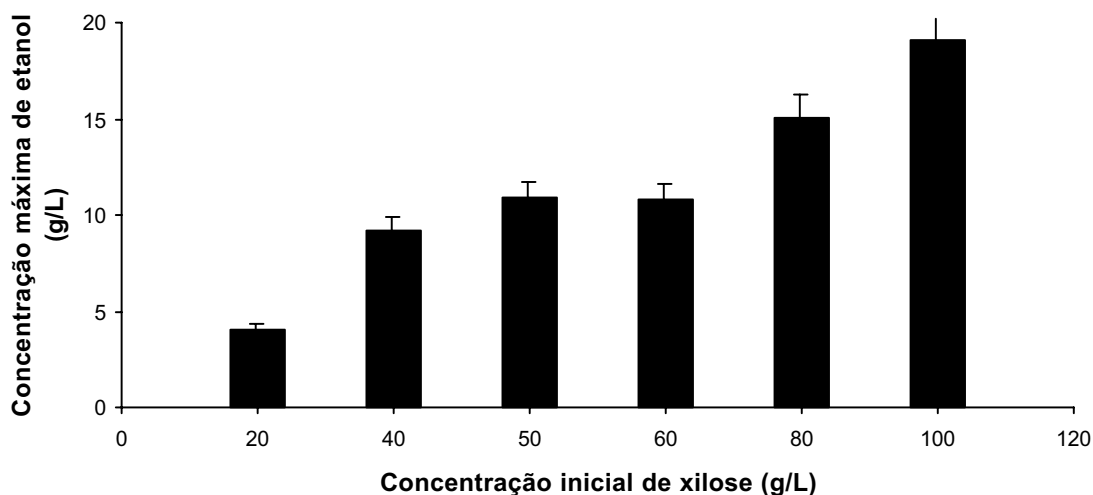


Figura 76. Comparação das concentrações máximas de etanol produzidas durante 36 horas de fermentação em meios contendo diferentes concentrações de xilose por *Pichia stipitis* CBS 5774.

As cinéticas relativas ao consumo de xilose e à produção de etanol para as fermentações cujas concentrações máximas de etanol foram mostradas acima estão apresentadas na figura 77.

Para todas as concentrações testadas (20 g·L⁻¹ a 100 g·L⁻¹) as curvas mostraram um perfil semelhante, no qual a produção máxima de etanol se deu em 36 horas, com o subsequente consumo do etanol formado. Para as fermentações com xilose a 20 g·L⁻¹, observou-se o consumo de todo o etanol formado após 72 horas. Apesar disso, as concentrações máximas de etanol coincidiram com o consumo total de xilose, independentemente da concentração inicial do substrato.

A concentração máxima de etanol em função do tempo de fermentação, a quantidade de xilose residual, o rendimento de etanol, o rendimento de células e a produtividade volumétrica para as fermentações efetuadas a partir das diferentes concentrações de substrato estão apresentadas na tabela 26.

O rendimento máximo de etanol foi obtido em meio líquido com 50 g·L⁻¹ de xilose ($Y_{p/s} = 0,27$), que corresponde a 53% do rendimento teórico ($Y_{p/s} = 0,51$). A produtividade volumétrica foi considerada razoável ($Q_p = 0,28$). A maior produtividade volumétrica foi observada na fermentação com 100 g·L⁻¹ de xilose ($Q_p = 0,81$);

entretanto, nessa mesma concentração, o rendimento de etanol foi de $Y_{p/s} = 0,23$, o que corresponde a 45% do rendimento teórico.

Considerando os valores de produtividade volumétrica e rendimento de etanol para as fermentações efetuadas com $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, esta foi a concentração escolhida para o início dos testes de fermentação na presença dos compostos aromáticos de baixa massa molar oriundos da degradação de carboidratos e lignina produzidos durante o pré-tratamento por explosão a vapor.

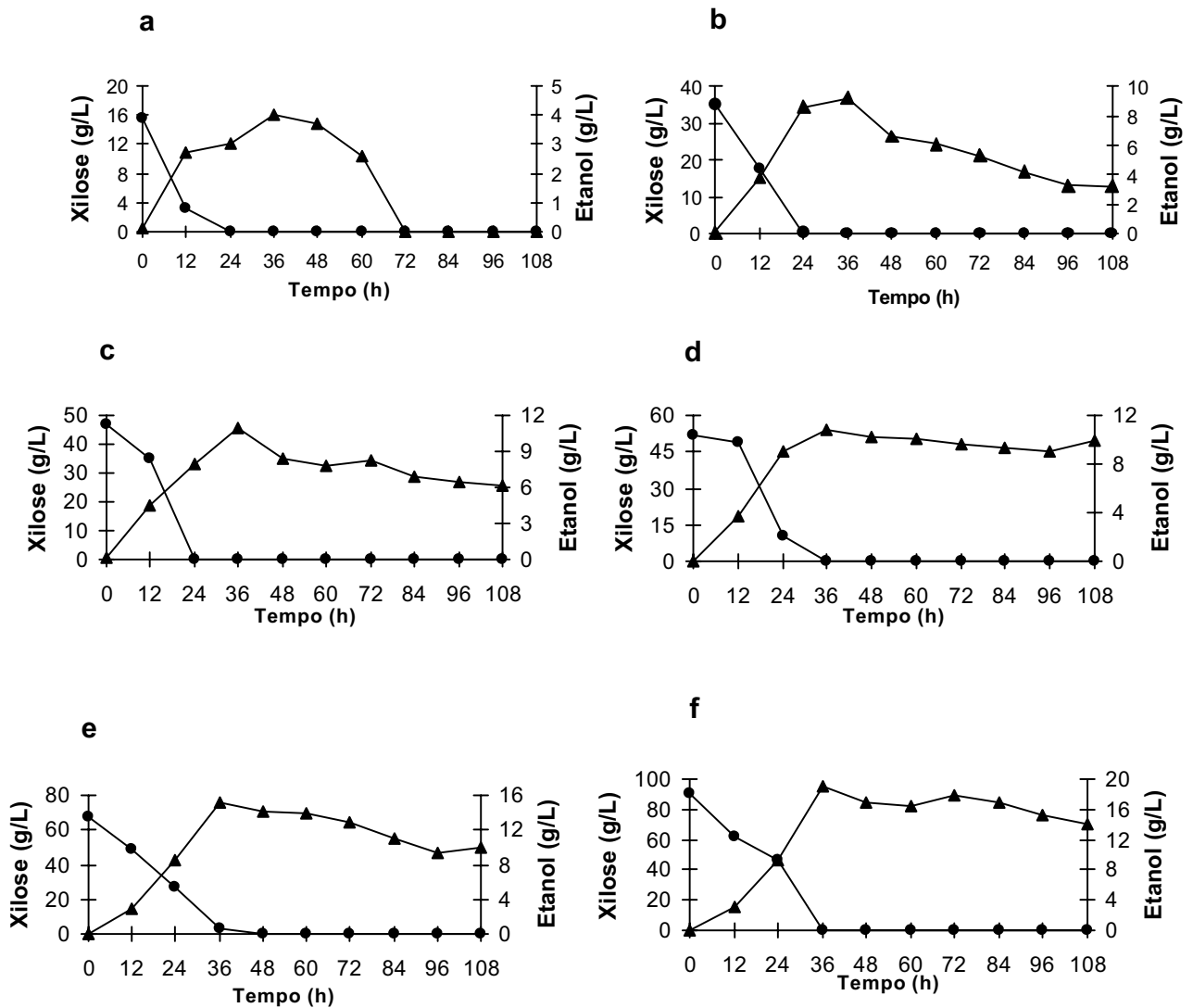


Figura 77. Produção de etanol (▲) e consumo de xilose (●) por *Pichia stipitis* CBS 5774 em diferentes concentrações de substrato: (a) 20 gL⁻¹; (b) 40 gL⁻¹; (c) 50 gL⁻¹; (d) 60 gL⁻¹; (e) 80 gL⁻¹ e (f) 100 gL⁻¹.

Tabela 26. Efeito da concentração inicial de xilose nos parâmetros de fermentação da *Pichia stipitis* CBS 5774.

Concentração inicial de xilose (g·L ⁻¹)	Tempo de produção máxima de etanol (h)	Máxima concentração de etanol (g·L ⁻¹)	Xilose residual (g·L ⁻¹)	Yp/s (g·g ⁻¹) ^a	Yx/s (g·g ⁻¹) ^a	Qp ^a
20	36	4,04	< L.D.*	0,25	0,23	0,11
40	36	9,20	0,02	0,26	0,10	0,22
50	36	10,88	< L.D.*	0,27	0,10	0,28
60	36	10,80	0,11	0,21	0,11	0,45
80	36	15,08	0,17	0,24	0,06	0,55
100	36	19,08	0,13	0,23	0,08	0,81

Símbolos:

^a: valor determinado no ponto de máxima produção de etanol.

Yp/s: rendimento de etanol produzido a partir da xilose consumida.

Yx/s: rendimento de células produzidas a partir da xilose consumida.

Qp: produtividade volumétrica de etanol (12→12 horas).

*: abaixo do limite de detecção.

Comparando-se as duas leveduras utilizadas na fermentação de xilose a etanol em meio sintético, verificou-se que o perfil do crescimento celular da levedura *C. shehatae* Y-12858 (figura 60) foi semelhante ao da *P. stipitis* CBS 5774 (figura 77), onde o máximo do crescimento foi atingido nas últimas 96 horas de processo fermentativo. Para ambas as leveduras testadas, o crescimento foi rápido nas primeiras 36 horas de fermentação, tornando-se mais vagaroso no decorrer do processo. As fermentações com *C. shehatae* produziram etanol em maior concentração em 48 horas de processo fermentativo, exceto para as concentrações de 20 e 40 gL⁻¹, onde o máximo foi obtido em 24 horas (figura 62), enquanto que *P. stipitis* exigiu 36 horas para todas as concentrações testadas (figura 77).

4.5.4. AÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DE BAIXA MASSA MOLAR SOBRE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE A ETANOL POR *Pichia stipitis* CBS

5774

As fermentações com *Pichia stipitis* CBS 5774 foram efetuadas em meio contendo xilose suplementado com concentrações diferentes dos seguintes compostos aromáticos de baixa massa molar: siringaldeído, vanilina, *p*-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico, ácido siríntrico, ácido *trans*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado com *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído em diferentes concentrações estão mostrados nas figuras 78, 79 e 80, respectivamente. Esses aldeídos, em concentração de 5,0 g·L⁻¹, inibiram fortemente o crescimento celular (figuras 78a, 79a e 80a), a produção de etanol (figura 78b, 79b e 80b) e, por conseguinte, o consumo de xilose (figura 78c, 79c e 80c). A xilose consumida foi utilizada totalmente para o crescimento celular, que foi praticamente insignificante, como mostrado nas figuras 78a, 79a e 80a.

Os compostos também foram testados em outras concentrações. Na concentração de 1,0 g·L⁻¹, o *p*-hidroxibenzaldeído inibiu o crescimento celular em 58,4% (figura 78a), reduzindo o rendimento de etanol (figura 78b) e o consumo de xilose, que foi praticamente nulo nas primeiras 24 horas de fermentação (figura 78c). Entretanto, com 36 horas, o rendimento de etanol foi igual ao obtido no controle.

Na cultura suplementada com vanilina, a concentração de 1,0 g·L⁻¹ apresentou acentuada inibição do crescimento celular durante as primeiras 48 horas do processo (figura 79a). Nessa mesma concentração, a produção de etanol também foi inibida, sendo que a toxicidade foi maior nas primeiras 40 horas fermentação (figura 79b).

Na cultura suplementada com siringaldeído, ocorreu inibição ao crescimento celular durante todo o processo fermentativo para as concentrações de 0,002 g·L⁻¹ e 1,0 g·L⁻¹ (figura 80a). A figura 80b mostra também que essas concentrações inibiram a produção de etanol nas primeiras 40 horas de processo fermentativo. O consumo de xilose também foi mais lento devido ao poder inibitório dos compostos testados (figura 80c).

O siringaldeído demonstrou maior efeito inibitório do que a vanilina, obtendo-se menores rendimentos e produtividades de etanol.

Vários estudos relacionam a estrutura química dos aldeídos com os resultados das fermentações (FENSKE et al., 1998; DELGENES et al., 1996; TRAN e CHAMBERS, 1985). Vale salientar que a diferença entre os aldeídos testados reside simplesmente na ausência ou presença de metoxilas ligadas ao anel aromático.

Comparando-se os resultados entre os três aldeídos, verificou-se que as concentrações maiores que $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ exerceram efeitos inibitórios ao metabolismo da levedura. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DELGENES et al. (1996), que observaram a vanilina como maior composto inibitório (na concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando *Pichia stipitis* NRRL Y 7124 com a concentração de xilose no meio de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, embora os outros aldeídos testados (*p*-hidroxibenzaldeído e siringaldeído) também foram altamente tóxicos à ação da levedura. No mesmo trabalho, os autores observaram que $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina, $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído e $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de siringaldeído, reduziram o rendimento de etanol em 4,5, 4,0 e 3,3% , respectivamente. Verificou-se também que $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de vanilina, $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de *p*-hidroxibenzaldeído e $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de siringaldeído reduziram o crescimento celular em 1,6%, 0,8% e 5%, respectivamente, no tempo de fermentação de 48 horas.

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado a $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com os ácidos *p*-hidroxibenzoico, *trans*-cumárico, ferúlico, vanílico e sirínico estão mostrados nas figuras 81 a 85, respectivamente. A concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ inibiu totalmente o crescimento celular (figuras 82a, 83a e 84a, respectivamente) e a produção de etanol pelos ácidos *trans*-cumárico, ferúlico e vanílico (figuras 82b, 83b e 84b, respectivamente), não havendo, portanto, consumo de xilose (figuras 82c, 83c e 84c, respectivamente). O ácido *trans*-cumárico foi mais inibidor do crescimento microbiano do que da produção de etanol, pois a inibição por esse composto foi de 98,5%. O ácido ferúlico inibiu a produção de células em 98% e o ácido vanílico, em 97%.

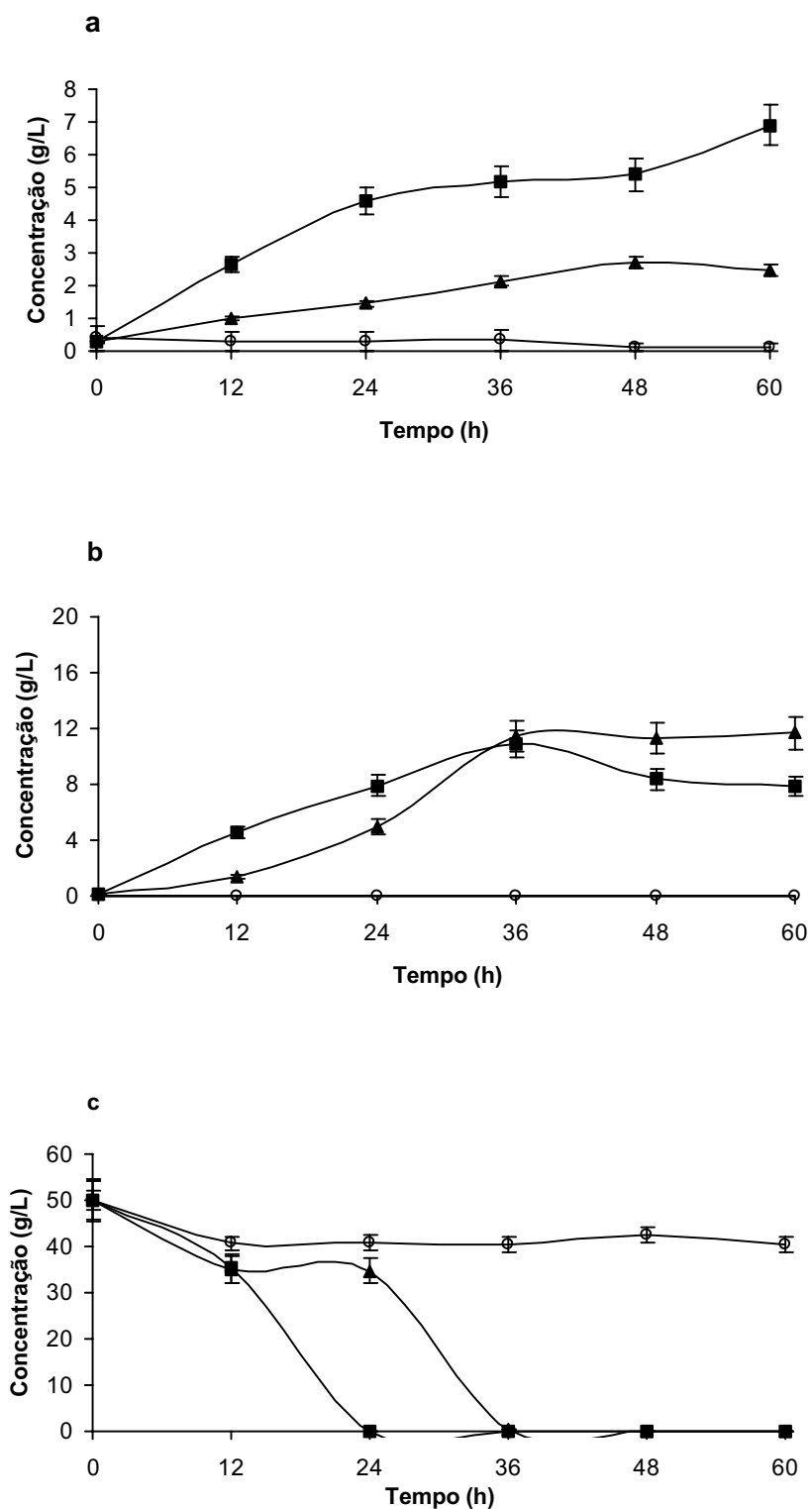


Figura 78. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose com adição de *p*-hidroxibenzaldeído em diferentes concentrações (■ Controle; 2,0 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

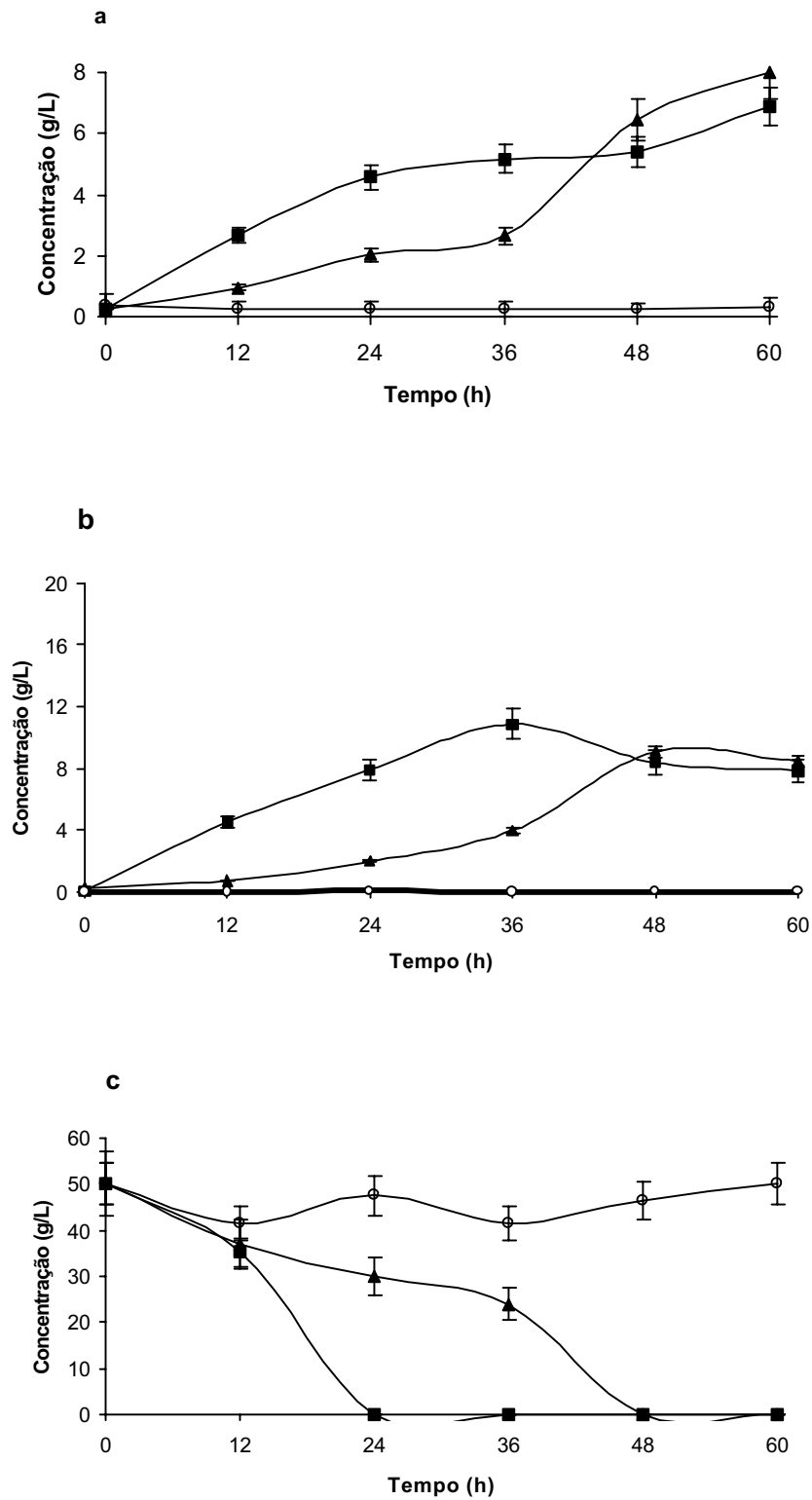


Figura 79. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de vanilina em diferentes concentrações (■ Controle; 2,0 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

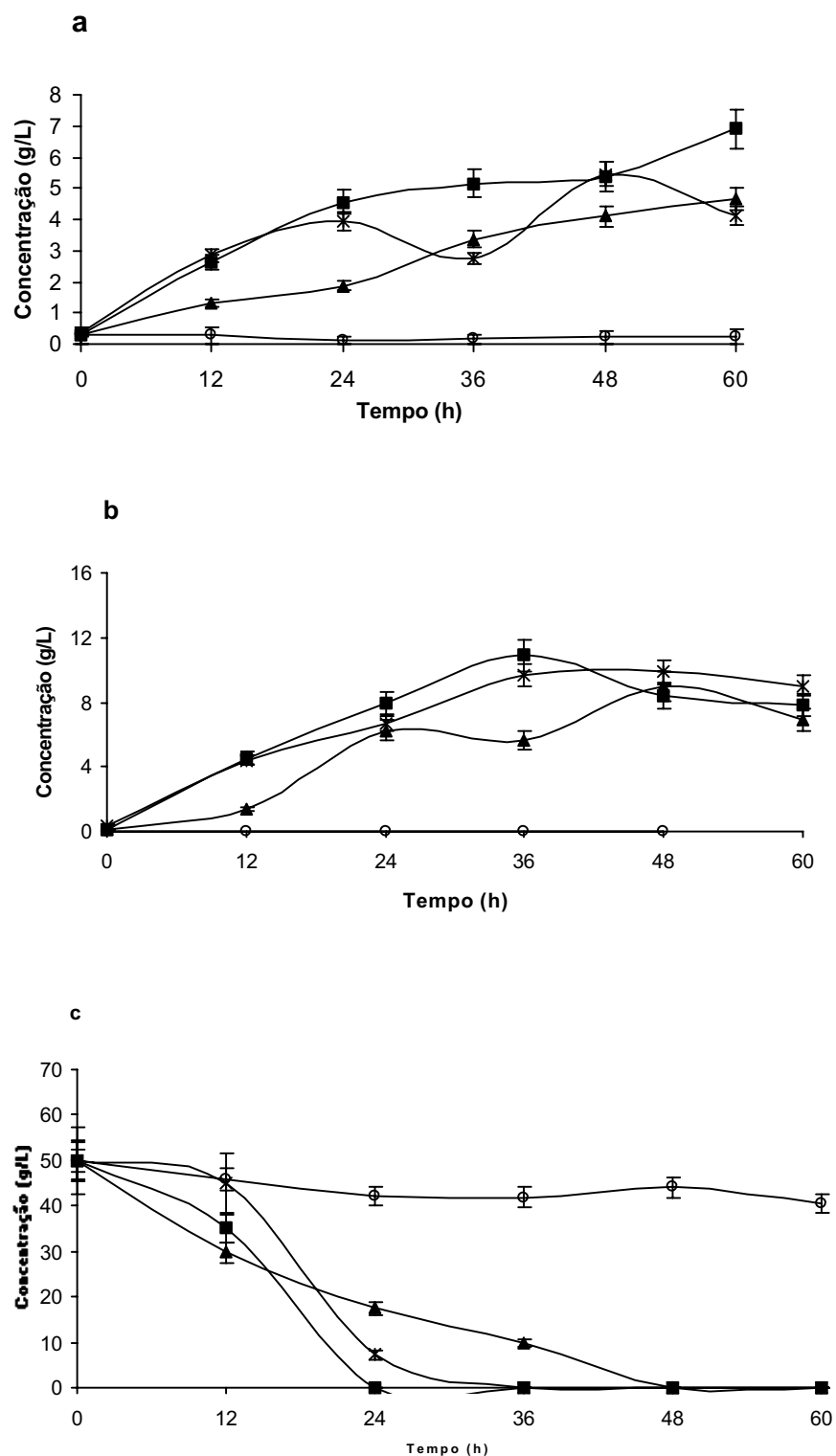


Figura 80. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS5774 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de sirringaldeído em diferentes concentrações (■ Controle; ⊕ $0,002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ▲ $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ○ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para os ácidos *p*-hidroxibenzóico e sirínico, a concentração de 5,0 g·L⁻¹ não foi totalmente inibitória nem ao crescimento celular (figuras 81a e 85a), nem à produção de etanol por *C. shehatae* (figuras 81b e 85b, respectivamente). Na presença de ácido *p*-hidroxibenzóico, a produção de etanol somente ocorreu após 24 horas de processo, atingindo uma produção de 2,31 g·L⁻¹ sem que houvesse o consumo total de xilose no meio (figura 81c). Com o ácido sirínico, houve uma produção gradativa de etanol (figura 85b) até que, no final do processo fermentativo (60 horas), observou-se uma produção relevante de 9,15 g·L⁻¹, ou seja, 84% em relação à produção do controle (50 g·L⁻¹ de xilose), restando um excedente de xilose no meio de 2,32 g·L⁻¹ (4,64% do controle) (figura 85c). Assim, o ácido sirínico e o ácido *p*-hidroxibenzóico não são fortes inibidores à ação da *C. shehatae*, mesmo na concentração de 5,0 g·L⁻¹, considerada altamente tóxica à levedura nos testes em que os outros compostos ácidos foram empregados.

Além da concentração de 5,0 g·L⁻¹, o ácido *trans*-cumárico também foi testado na concentração de 0,2 g·L⁻¹ (figura 82). Os resultados mostraram que houve fraca inibição ao crescimento celular quando essa concentração foi testada (26% de inibição nas primeiras 36 horas de processo fermentativo) (figura 82a). Nessa concentração, praticamente não houve inibição da produção de etanol (figura 82b), pois o perfil da curva foi semelhante ao do controle. Este comportamento pode ser confirmado pelo rápido consumo de xilose (figura 84c).

O ácido ferúlico foi testado também nas concentrações de 0,2 g·L⁻¹ e 1,0 g·L⁻¹. Verificou-se que houve inibição ao crescimento celular quando essas concentrações foram testadas (39% e 56% de inibição, respectivamente) (figura 83a). A presença do ácido ferúlico apresentou fraca inibição à produção de etanol durante quase toda a fermentação, quando as concentrações de 0,2 g·L⁻¹ e 1,0 g·L⁻¹ foram testadas (figura 83b). Entretanto, a maior inibição foi obtida pela concentração de 1,0 g·L⁻¹, o que foi acompanhado pelo consumo mais lento de xilose (figura 83c).

Os resultados mostraram que o crescimento celular foi mais sensível à ação dos ácidos do que à produção de etanol quando a levedura *P. stipitis* foi utilizada. Verificou-se também que, em concentrações elevadas, os aldeídos foram mais inibitórios do que os ácidos.

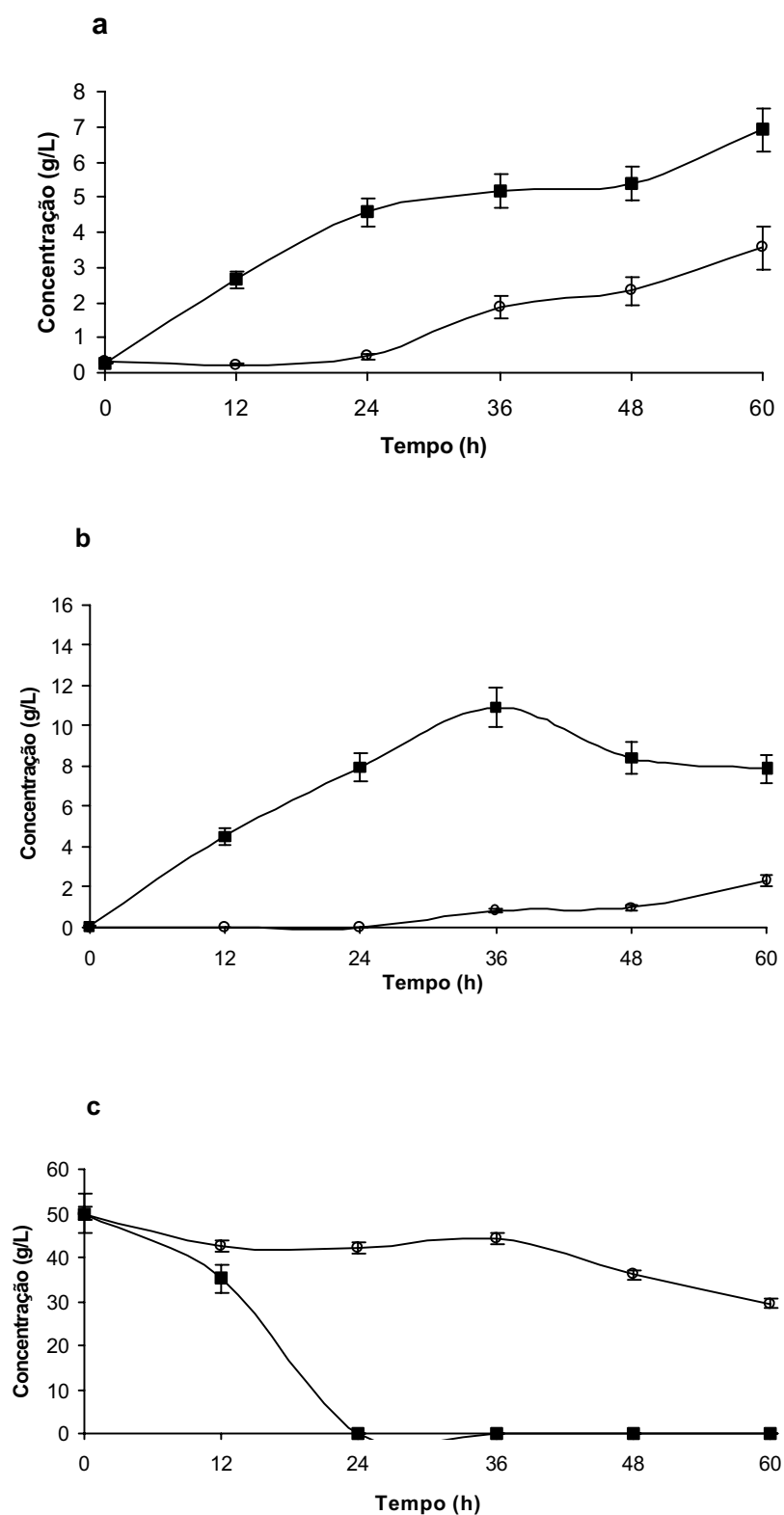


Figura 81. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido *p*-hidroxibenzoico na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

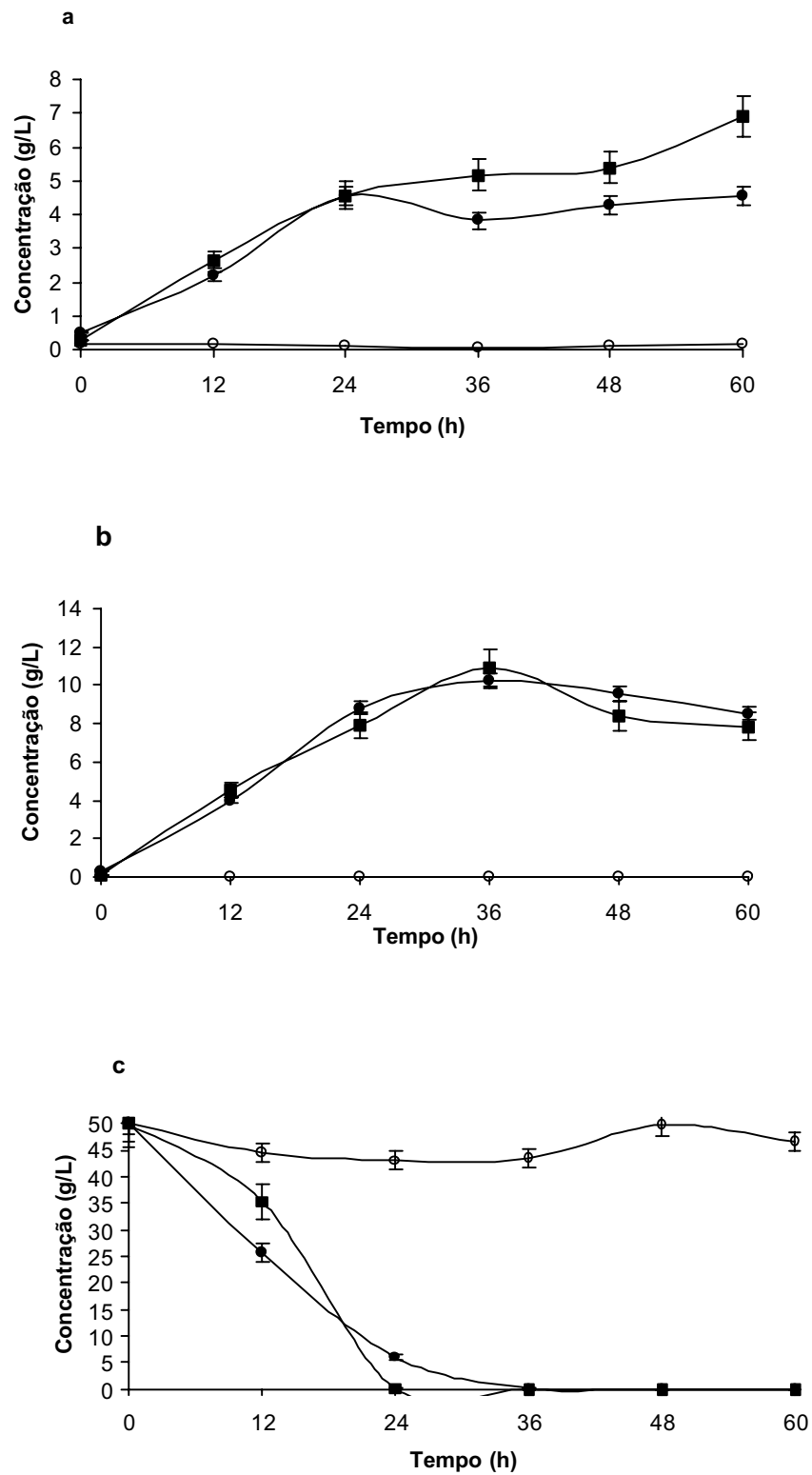


Figura 82. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido *trans*-cumárico em diferentes concentrações (■ Controle; ● 0,2 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

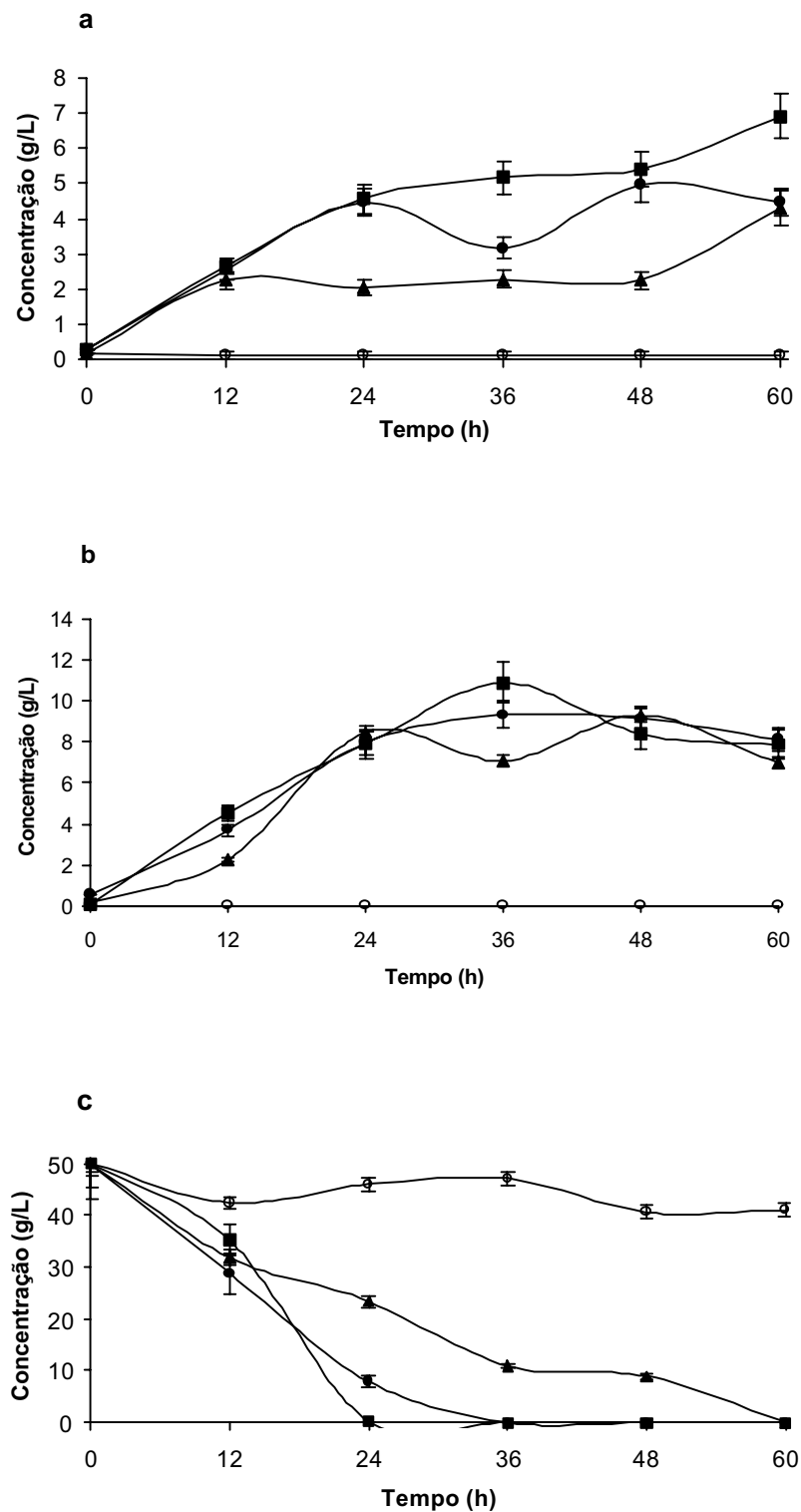


Figura 83. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com adição de ácido ferúlico em diferentes concentrações (■ Controle; ● $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ▲ $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; ◻ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

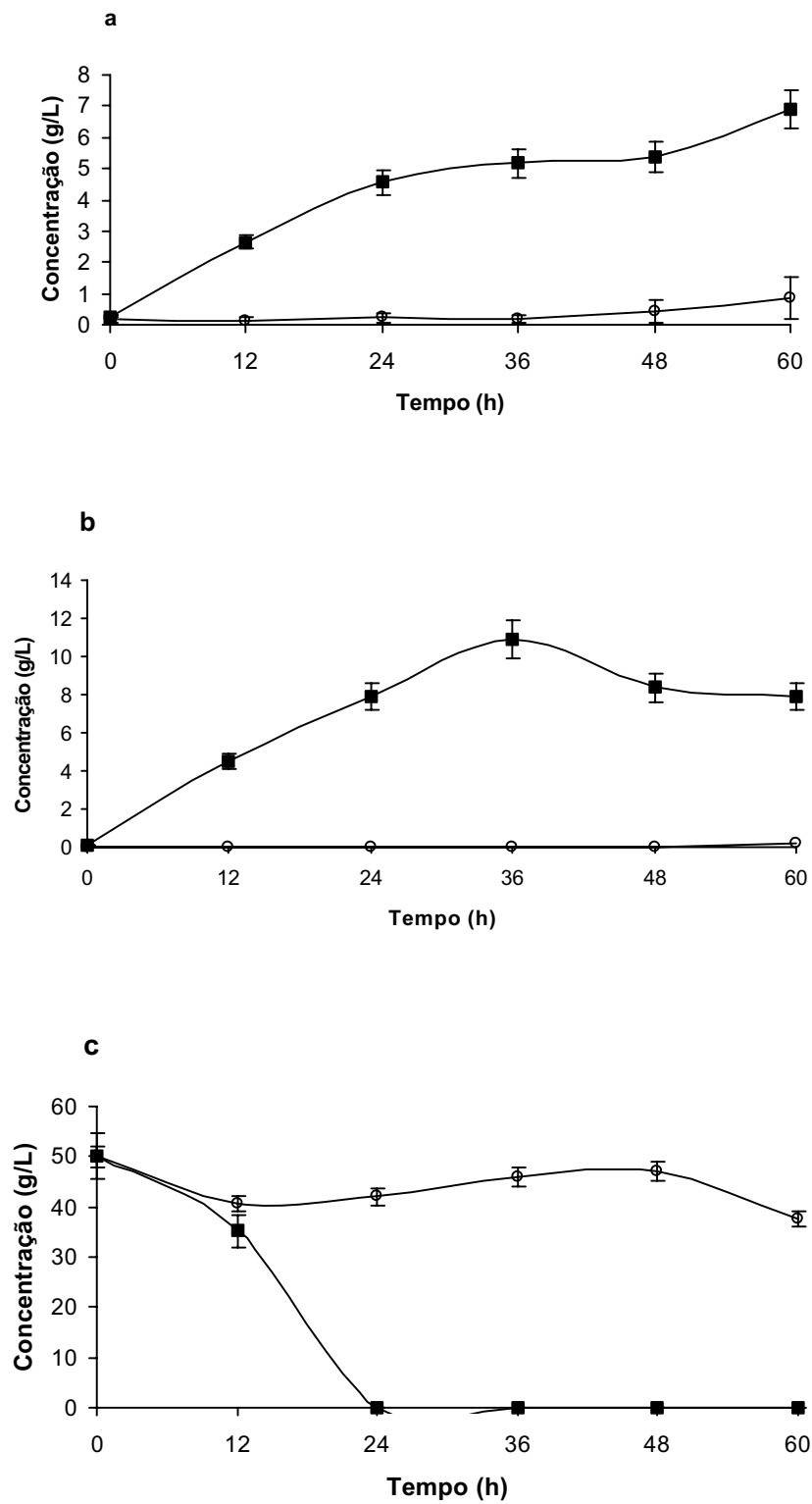


Figura 84. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido vanílico na concentração de 5,0 g·L⁻¹ (■ Controle; ○ 5,0 g·L⁻¹).

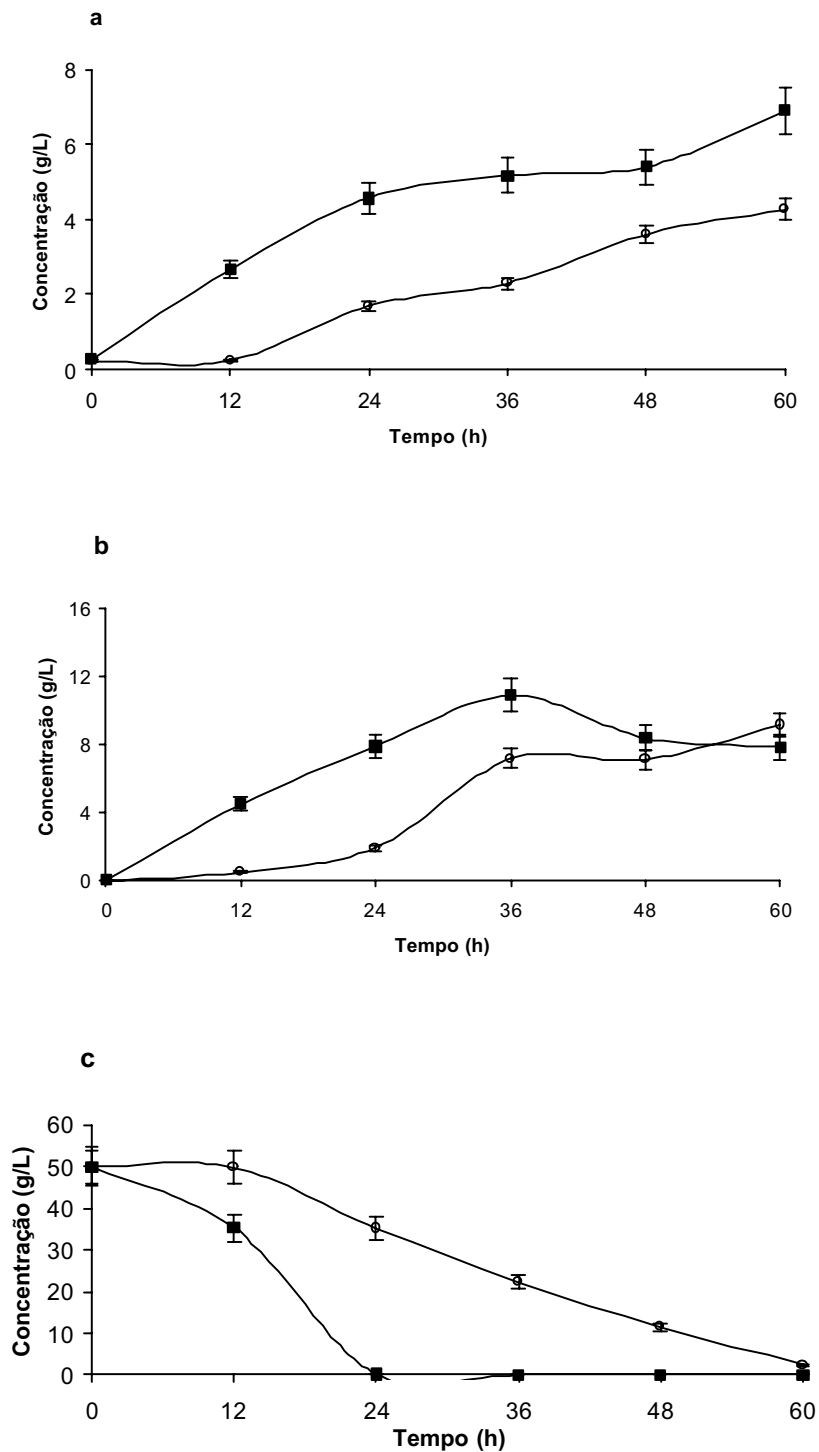


Figura 85. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 gL^{-1}) com adição de ácido síngico na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (■ Controle; □ $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Os resultados das fermentações de xilose a etanol em meio suplementado com ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural estão mostrados nas figuras 86, 87 e 88, respectivamente. Na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, esses compostos derivados da degradação dos carboidratos inibiram quase que totalmente o crescimento celular (figuras 86a, 87a e 88a, respectivamente), a produção de etanol (figuras 86b, 87b e 88b, respectivamente) e, por conseguinte, o consumo de xilose (figuras 86c, 87c e 88c, respectivamente).

Quando o ácido acético foi inserido no meio de cultura na concentração de $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, verificou-se uma inibição de 60,9% sobre o crescimento celular e, na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a inibição foi praticamente total (95%) (figura 86a). Em relação à produção de etanol, a concentração de $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi tão tóxica à ação da levedura quanto na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (figura 86b), seguido de lento consumo de xilose (figura 86c).

No meio suplementado com $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural, observou-se uma inibição moderada do crescimento celular (figura 87a), diminuindo-se a velocidade de formação de etanol (figura 87 b) e a velocidade do consumo de xilose (figura 87 c). A concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi inibitória para o crescimento celular e para a produção de etanol nas primeiras 24 horas de fermentação.

A concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidroximetilfurfural foi fracamente inibitória ao crescimento celular durante todo o processo (figura 88a) e foi tóxica à produção de etanol após 30 horas de fermentação (figura 88b). Na concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o hidroximetilfurfural inibiu totalmente a produção de etanol e também foi inibitório ao metabolismo celular (figura 88a).

Furfural e hidroximetilfurfural foram menos tóxicos que os produtos de degradação da lignina. Na concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, hidroximetilfurfural inibiu a produção de etanol em 14%, no tempo de fermentação de 36 horas. Para o furfural, quando a concentração de $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi usada, ainda havia uma pequena produção de etanol com 36 horas de processo (3,8% do controle), ou seja, a inibição ainda não havia sido completa nessa concentração. Já para o hidroximetilfurfural, a inibição foi quase total. Esta diferença pode ser atribuída ao grupo hidroximetil em sua estrutura química.

BJORLING e LINDMAN (1989) avaliaram o efeito do ácido acético em diferentes valores de pH na produção de etanol por *P. stipitis*. A presença do ácido, na concentração de $3,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, inibiu completamente a produção de etanol em pH 4,0 e

apenas 1,7 g·L⁻¹ de etanol foi formado em pH 5,0. Entretanto, trabalhando com pH 6,0, a produção de etanol foi semelhante à obtida na ausência deste composto.

VAN ZYL et al. (1991) constataram que o grau de inibição, causado pelo ácido acético na fermentação de xilose por *P. stipitis*, variou com a concentração do ácido, com o nível de aeração e com o pH. Sob condições anaeróbias em pH 5,1, a presença de 1,0 g·L⁻¹ de ácido acético inibiu a produção de etanol em 50%. Este mesmo grau de inibição foi observado em pH 6,5 somente em concentrações de ácido acético acima de 15 g·L⁻¹.

FERRARI et al. (1992) avaliaram o efeito do pH inicial na produção de etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de madeira contendo 10 g·L⁻¹ de ácido acético. Segundo estes autores, a inibição da fermentação foi total em pH 5,0 e, na faixa de pH entre 5,5 e 6,5, o consumo de açúcares (99%) e a produção de etanol (12 g·L⁻¹) foram similares. Entretanto, as produtividades volumétricas aumentaram de 2,1 para 4,0 g·L⁻¹ por dia quando o pH do meio foi elevado de 5,5 para 6,5. Estes autores verificaram ainda que o consumo de ácido acético foi estimulado pelo aumento do pH inicial e, mesmo após ter atingido a concentração máxima em etanol, a levedura continuou a utilizar este ácido.

Comparado ao controle (xilose 50 g·L⁻¹), verificou-se que a grande maioria das culturas suplementadas com os compostos inibidores apresentou um decréscimo na produção de etanol e no crescimento celular a partir de 30 horas de processo fermentativo, utilizando-se a levedura *Pichia stipitis* na fermentação de xilose a etanol. Em geral, a intensidade da inibição está diretamente relacionada com a concentração dos compostos inibitórios testados, ou seja, para a maioria dos compostos testados, a inibição aumenta com o aumento da concentração dos produtos (du PREEZ et al., 1986).

Para todos os compostos testados, o processo de crescimento celular da *P. stipitis* foi inibido em uma maior extensão que o processo de produção de etanol. A partir de 1,0 g·L⁻¹, notou-se uma inibição considerável para quase todos os compostos.

Comparando-se as duas leveduras testadas, verificou-se que a *P. stipitis* CBS 5774 foi mais sensível à ação dos produtos de degradação dos carboidratos e da lignina que a *C. shehatae* Y-12858. Este resultado está de acordo com o obtido por DELGENES et al. (1996), no qual verificou-se que *C. shehatae* ATCC 22984 foi mais resistente a compostos tóxicos que *P. stipitis* NRRL Y 7124.

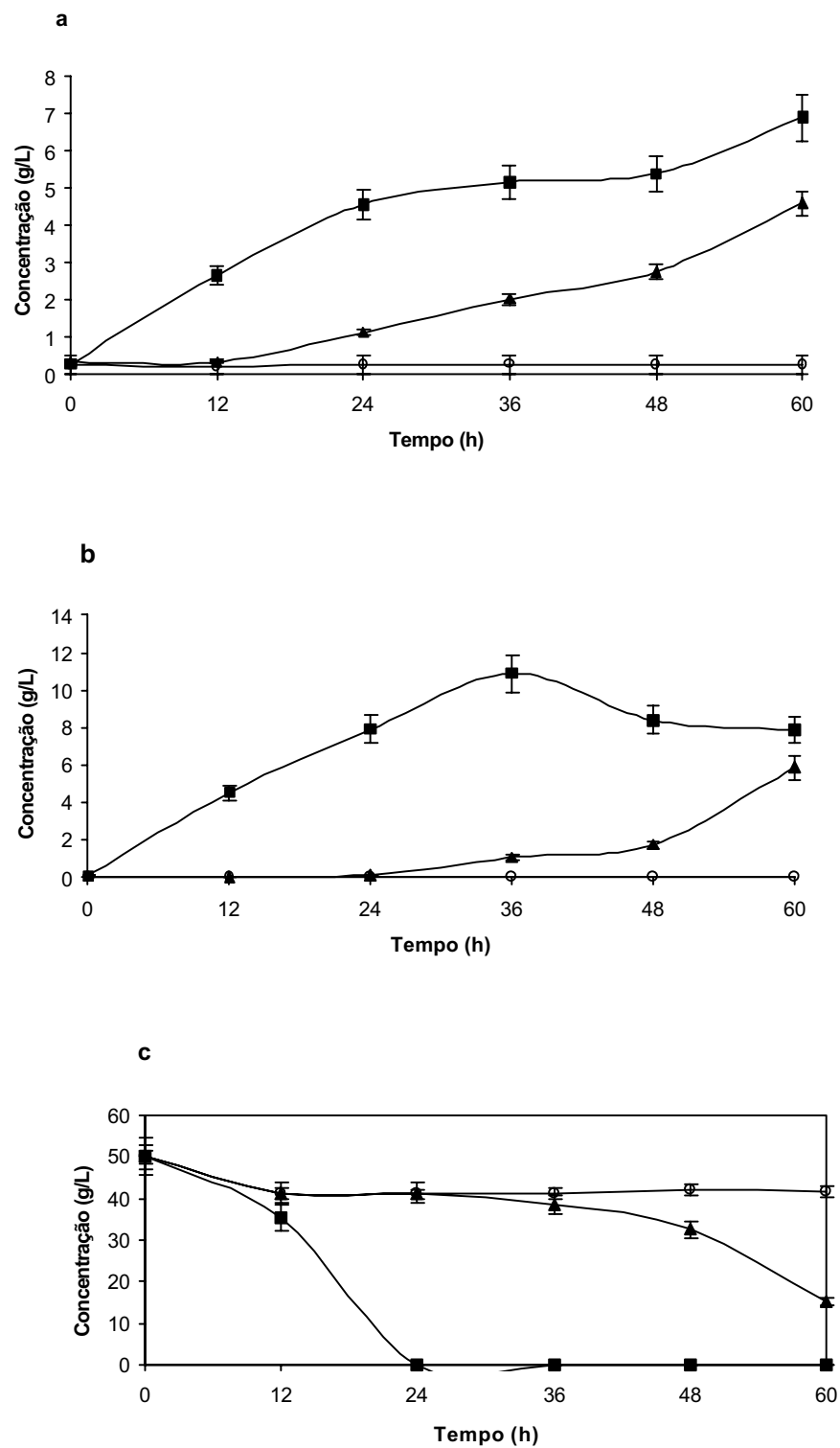


Figura 86. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de ácido acético em diferentes concentrações (■ Controle; ▲ 2,0 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

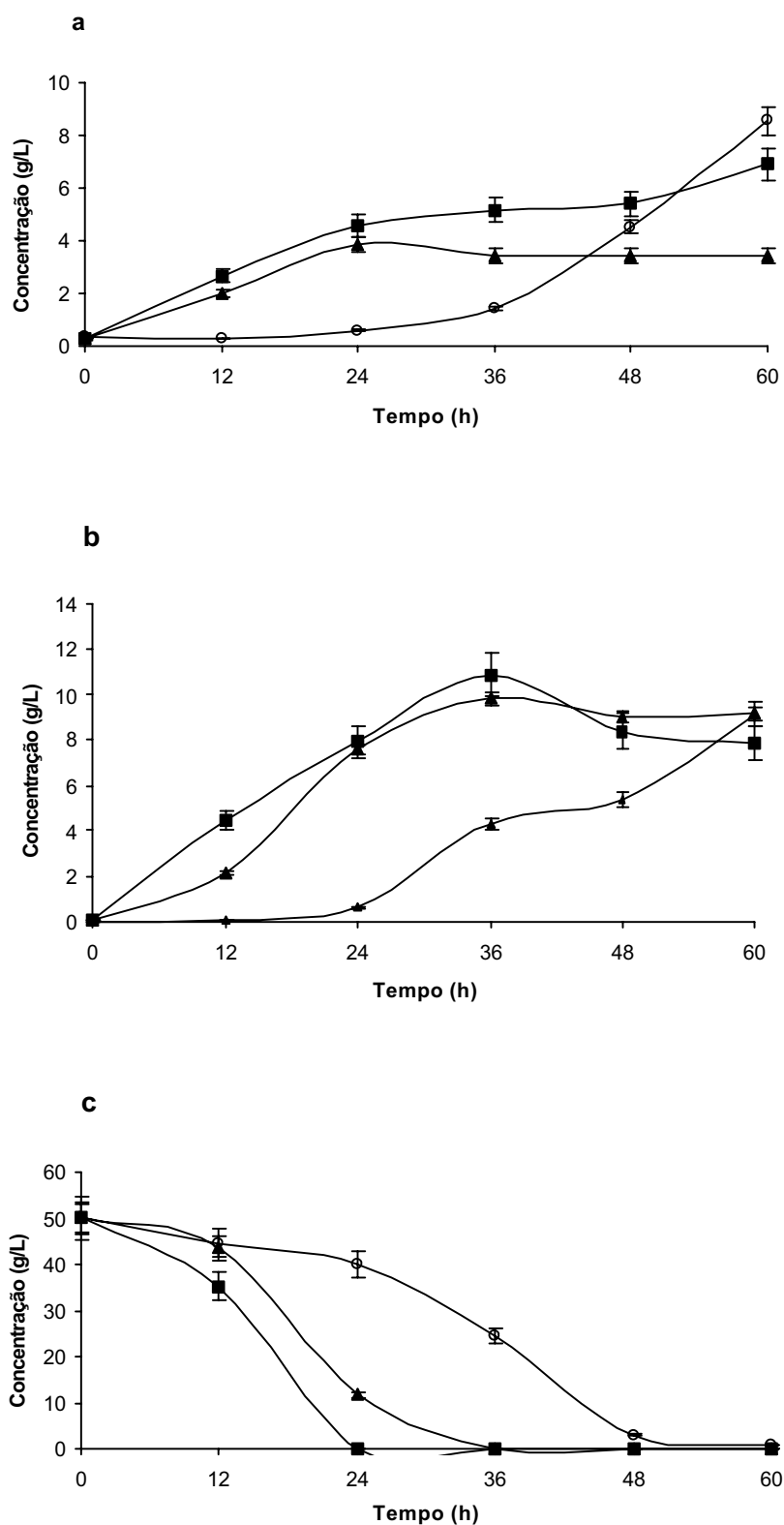


Figura 87. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de furfural em diferentes concentrações (■ Controle; ▲ 2,0 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

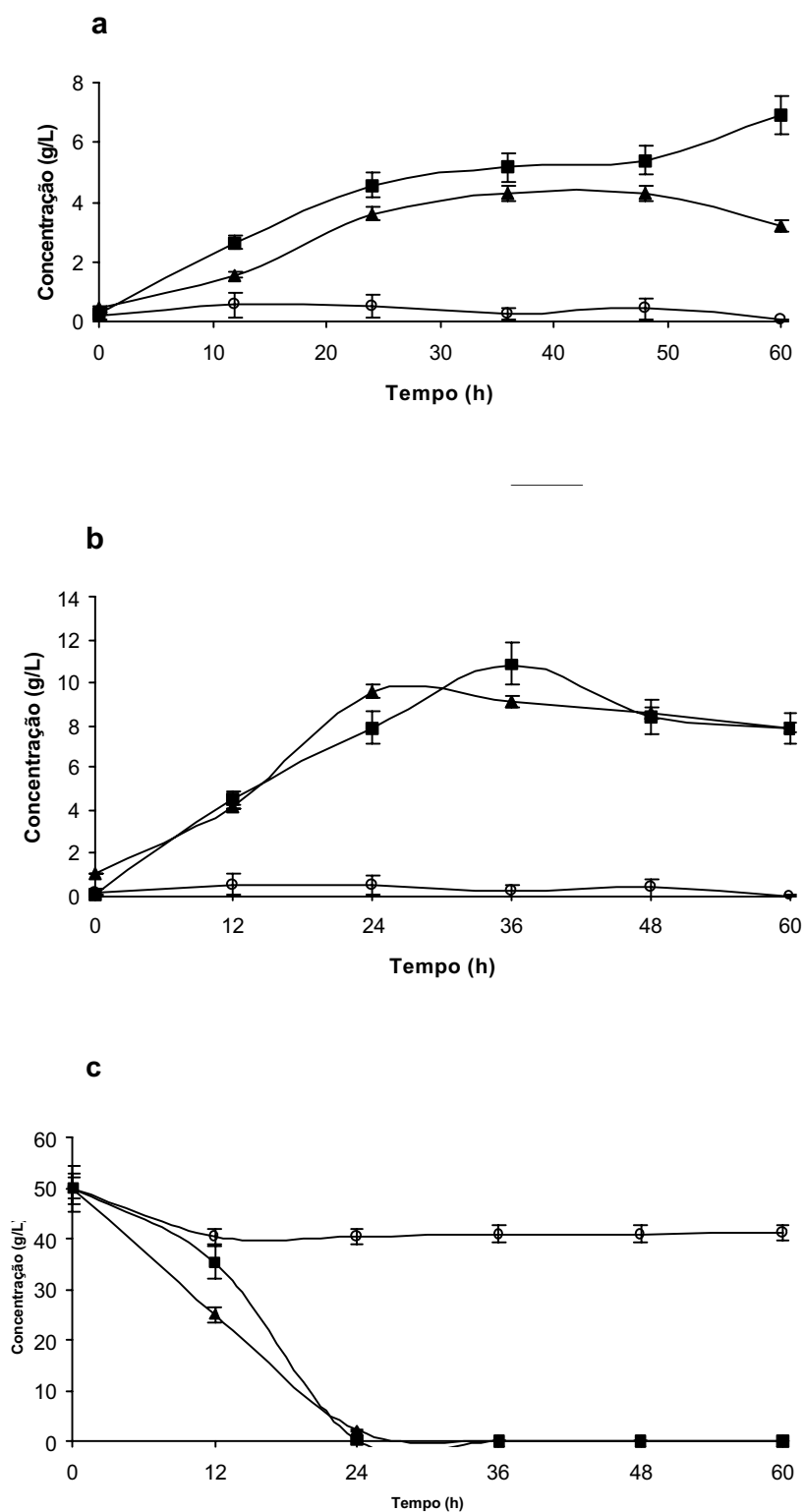


Figura 88. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em meio sintético de xilose (50 g·L⁻¹) com adição de hidroximetilfurfural em diferentes concentrações (■ Controle; ▲ 1,0 g·L⁻¹; ○ 5,0 g·L⁻¹).

4.6. FERMENTAÇÃO DOS CARBOIDRATOS PRESENTES NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO POR *Candida shehatae* Y-12858 e *Pichia stipitis* CBS 5774

Os resultados da fermentação de xilose em meio sintético a etanol pelas leveduras *Candida shehatae* Y-12858 e *Pichia stipitis* CBS 5774 foram previamente mostrados nos itens 4.5.1 e 4.5.3., respectivamente, inclusive os testes realizados com os compostos de baixa massa molar derivados da degradação de açúcares e da lignina, que são conhecidos como inibidores das fermentações (itens 4.5.2. e 4.5.4).

D-xilose e seus oligômeros compreendem a fração predominante do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por explosão a vapor ($14,7 \pm 0,3\%$ - Tabela 9). Por esse motivo, foram realizados testes de fermentação utilizando o hidrolisado hemicelulósico, que contém todos os compostos de baixa massa molar testados anteriormente.

Foram testados o hidrolisado puro, obtido do pré-tratamento por explosão a vapor (aproximadamente $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose e oligômeros), e o hidrolisado concentrado para render uma fração de cerca de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose e oligômeros.

Para o monitoramento da mudança de pH no decorrer do processo foi necessário o ajuste inicial de pH do hidrolisado para um valor considerado ideal para fermentação (pH = 5,5), pois abaixo desse valor, ocorre uma diminuição da produção de etanol pelas leveduras devido ao efeito do ácido acético liberado durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, que se encontram parcialmente na forma dissociada (BJORLING e LINDMANM, 1989). Logo, o pH do hidrolisado puro foi ajustado de 3,92 para 5,5 e o pH do hidrolisado concentrado de 3,87 para 5,5, com solução de NaOH 0,1 N.

Quando a carga de massa celular foi adicionada aos frascos contendo hidrolisado e nutrientes, o pH do meio aumentou. Assim, no início do processo fermentativo, o pH do hidrolisado e do controle (15 e $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, respectivamente) variou entre 6,0 a 7,5. Entretanto, com o decorrer do processo fermentativo, observou-se uma variação considerável no pH nos meios (Figura 89).

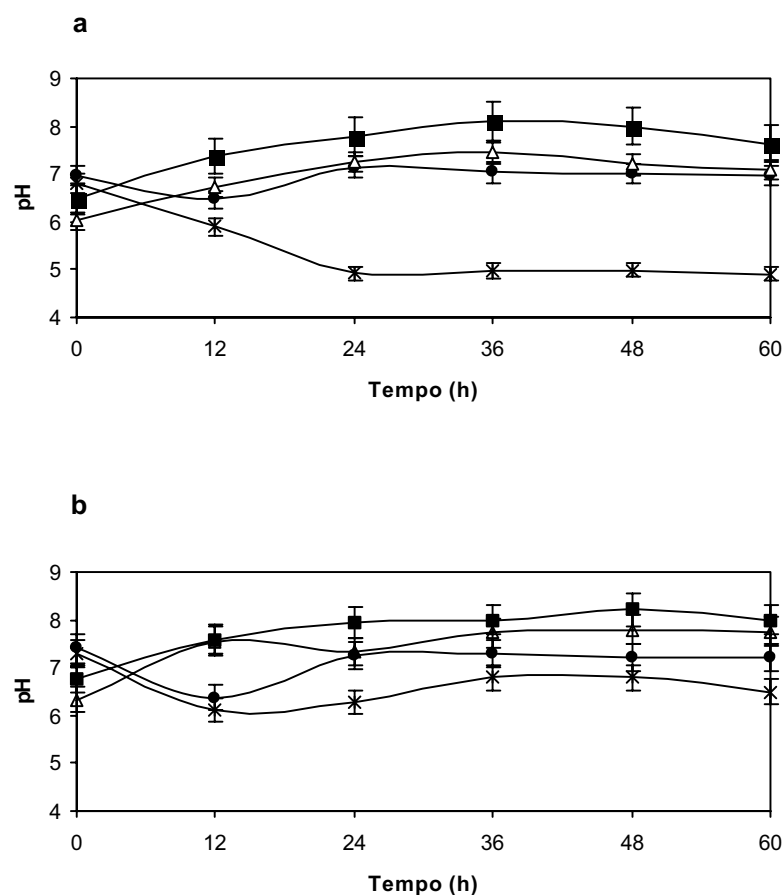


Figura 89. Variação de pH em função do tempo de fermentação para os controles e para os hidrolisados pelas leveduras (a) *Candida shehatae* Y-12858 e (b) *Pichia stipitis* CBS 5774 (■ Controle xilose 15 g·L⁻¹ ! Hidrolisado 15 g·L⁻¹ ● Controle xilose 50 g·L⁻¹ ▲ Hidrolisado 50 g·L⁻¹).

A Figura 89 mostra que o perfil da variação das curvas de pH para as duas leveduras foi muito semelhante. Durante o processo fermentativo, o pH dos hidrolisados (15 e 50 g·L⁻¹) variou menos que o dos controles (xilose 15 e 50 g·L⁻¹) para ambas as leveduras testadas, significando que pode ter ocorrido consumo de ácidos formados durante o processo.

As variações do crescimento celular, da produção de etanol e do consumo de xilose pelas leveduras *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* em função do tempo de fermentação para os hidrolisados testados são mostrados nas Figuras 90 e 91, respectivamente.

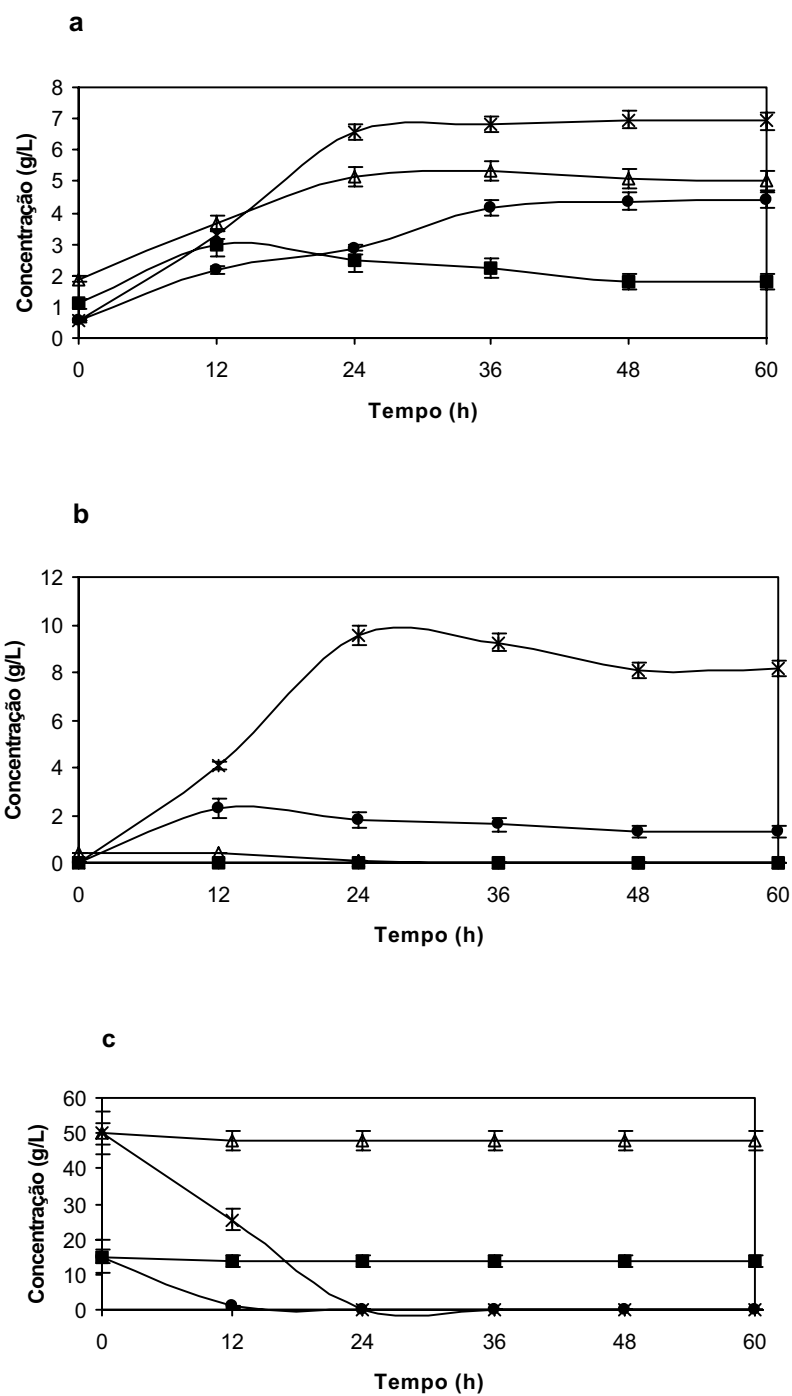


Figura 90. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *C. shehatae* Y- 12858 cultivada em hidrolisados (15 g·L⁻¹ e 50 g·L⁻¹) comparadas aos controles (xilose 15 g·L⁻¹ e 50 g·L⁻¹) (▲ Controle xilose 15 g·L⁻¹ ; Hidrolisado 15 g·L⁻¹ ● Controle xilose 50 g·L⁻¹ ; Hidrolisado 50 g·L⁻¹).

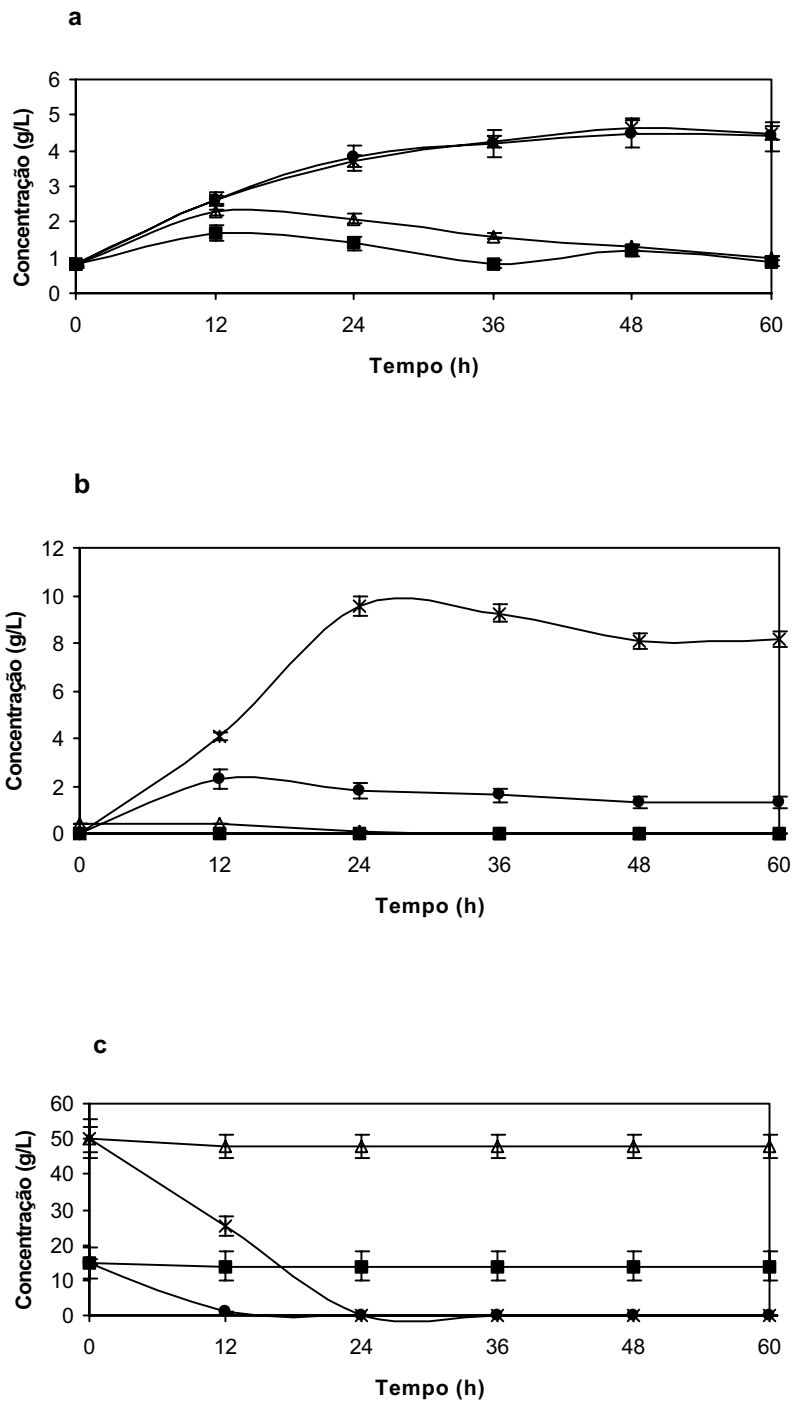


Figura 91. Curvas de crescimento celular (a), produção de etanol (b) e consumo de xilose (c) da levedura *P. stipitis* CBS 5774 cultivada em hidrolisados ($15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) comparadas aos controles (xilose $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (▲ Controle xilose $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Hidrolisado $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ■ Controle xilose $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Hidrolisado $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

O crescimento celular nos dois hidrolisados testados (15 g·L⁻¹ e 50 g·L⁻¹) foi inferior ao do controle durante todo o processo em que as duas leveduras foram utilizadas (Figuras 90a e 91a), sugerindo que os compostos de baixa massa molar presentes nos hidrolisados foram considerados tóxicos ao crescimento microbiano.

ROBERTO et al. (1991) observaram que, quando a levedura *P. stipitis* CBS 5773 foi inoculada no hidrolisado de bagaço de cana sem tratamento prévio, exceto pelo ajuste de pH a 5,0 com NaOH e a remoção do precipitado resultante, o crescimento celular também foi inferior ao controle e após 96 horas de fermentação, nenhum crescimento celular foi observado. Esse efeito também foi observado por VAN ZYL et al. (1988), que utilizou *P. stipitis* CBS 7126 em hidrolisado de bagaço de cana.

A inibição ao crescimento celular não pode ser atribuído ao furfural, que se encontrou presente a 0,66 g·L⁻¹ no hidrolisado. Estudos anteriores (NIGAM et al., 2001; ROBERTO et al., 1991) indicaram que o furfural deve apresentar danos ao metabolismo da levedura somente a partir da concentração de 1,0 g·L⁻¹. O mesmo ocorre para o ácido acético, presente no hidrolisado a 1,0 g·L⁻¹, que apresenta efeito inibitório em concentração de entre 2,0 a 5,0 g·L⁻¹ (NIGAM, 2001; VAN ZYL et al., 1988; TRAN e CHAMBERS, 1985). Assim, provavelmente o efeito inibitório apresentado ao crescimento celular deve ser atribuído em maior escala aos compostos aromáticos de baixa massa molar derivados da lignina e também aos derivados de lignina de massa molar mais alta que não foram identificados por CG/EM e CG/DIC (item 4.3.2.1.). Como há um grande número de compostos potencialmente tóxicos no hidrolisado, é pertinente considerar os efeitos combinados e sinérgicos desses compostos no meio de fermentação.

As curvas mostradas nas Figuras 90b e 91b apresentaram a produção de etanol concomitante ao consumo de xilose (Figuras 91c e 92c) nos meios fermentativos em função do tempo para os hidrolisados testados. Verificou-se que, para as duas leveduras testadas, os compostos de baixa e provavelmente de alta massa molar inibiram totalmente a produção de etanol e, por conseguinte, o consumo de xilose foi nulo.

Os perfis das curvas das Figuras 90 e 91 mostraram que os compostos derivados da lignina foram mais inibitórios à produção de etanol do que ao crescimento celular para as duas leveduras testadas.

É necessário ressaltar que ainda não se pode atribuir a inibição apenas aos compostos de baixa massa molar derivados da lignina. Logo, recomenda-se testar o hidrolisado hemicelulósico livre de compostos de baixa massa molar, com o objetivo de concluir se os compostos de alta massa molar são ou não compostos inibidores de fermentação. Esse estudo ainda não foi encontrado na literatura atual.

Resultados anteriores demonstraram que o hidrolisado, mesmo na concentração de $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, deve ser destoxificado previamente ao processo de fermentação. Uma variedade de métodos de destoxificação pode ser utilizada para reduzir a concentração dos compostos inibidores a níveis não-inibitórios, produzindo assim, hidrolisados altamente fermentescíveis. Os métodos mais comuns incluem neutralização, “overliming”, aquecimento, arraste a vapor (steam stripping), rotoevaporação, troca iônica, extração e tratamento com carvão ativado e peneira molecular (MARTÍN et al., 2002; PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a,b; MARTINEZ et al., 2000; LARSSON et al., 1999a; McMILLAN, 1994b; PALMQVIST et al., 1997; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Entretanto, esses métodos não podem ser estritamente comparados, visto que diferentes hidrolisados e diferentes microrganismos são utilizados. Também deve-se adotar melhorias nas condições de hidrólise da biomassa para minimizar a formação de inibidores.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu fazer uma caracterização mais refinada do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, envolvendo os principais compostos derivados da fração hemicelulósica.

- Os resultados mostraram que no hidrolisado, os principais componentes obtidos foram oligômeros de xilose, com grau de polimerização variando de 2 a 6, com predominância de xilobiose e xilotriose.
- Os compostos de baixa massa molar derivados da lignina foram isolados a partir do fracionamento do hidrolisado por extração líquido-líquido, identificados por CG/MS e confirmados por Espectroscopia no UV/Visível e no Infravermelho. Além de compostos monoméricos, as frações orgânicas possuem oligômeros de lignina (ricos em grupos H condensados) como principais compostos, resultado este verificado por GPC.
- A distribuição de massa molar média aparente das frações orgânicas variou de 469,9 a 4058,9 g·mol⁻¹. Os conteúdos de metoxilas e hidroxilas fenólicas foram bem inferiores aos valores reportados na literatura para a lignina de bagaço de cana (SILVA, 1995).
- Os resultados de CG/MS mostraram que a quantidade da maioria dos compostos identificados aumentou, quando comparados com os resultados anteriores (CUNHA, 1999), principalmente para o ácido *trans*-cumárico. O aumento foi atribuído à origem do bagaço de cana utilizado neste trabalho.
- Os resultados obtidos a partir das análises das frações que contêm compostos de baixa massa molar mostraram que, durante o procedimento de explosão a vapor do bagaço de cana a 190°C por 15 min, são solubilizados predominantemente os compostos contendo grupos do tipo H, contidos na lignina de bagaço, que é do tipo HGS.
- O pré-tratamento por explosão a vapor alterou extensivamente a ultraestrutura da superfície do bagaço de cana, além de promover as reações de hidrólise das hemiceluloses e da celulose, a qual foi levemente despolimerizada, induzindo à fragilização da coesão da estrutura.

Este trabalho comprovou o efeito inibitório dos compostos de baixa massa molar derivados dos carboidratos e da lignina.

- A fermentação alcóolica do principal açúcar encontrado no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (xilose) em meio sintético pela levedura *C. shehatae* Y-12858 foi afetada pela presença de produtos de decomposição da biomassa a partir de 48 horas de fermentação. Da maioria dos compostos testados na concentração de $5,0 \text{ gL}^{-1}$, apenas os ácidos siríngico e ácido *p*-hidroxibenzoico não apresentaram inibição considerável. Os resultados mostraram que o grau de inibição dos compostos testados depende da natureza e da concentração dos inibidores.

- A fermentação alcóolica de xilose em meio sintético pela levedura *Pichia stipitis* CBS 5774 foi afetada pela presença de produtos de decomposição da biomassa a partir de 36 horas de fermentação para maioria dos compostos testados. Na concentração de $5,0 \text{ gL}^{-1}$, apenas ácido siríngico, furfural e ácido *p*-hidroxibenzoico não apresentaram inibição considerável.

- Quando os hidrolisados nas concentrações de 15 gL^{-1} e 50 gL^{-1} foram inoculados com as leveduras *C. shehatae* e *P. stipitis*, observou-se a inibição do crescimento microbiano e da produção de etanol, indicando a necessidade de destoxificar o hidrolisado previamente à fermentação.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, recomenda-se estudar a fermentação de xilose a etanol na presença dos compostos de baixa massa molar derivados dos carboidratos e da lignina em outras concentrações, a fim de complementar o estudo; testar o efeito sinérgico desses compostos através da ação combinada entre eles; estudar a ação dos compostos de massa molar mais alta presentes no hidrolisado, separadamente dos compostos de baixa massa molar; utilizar as diversas frações obtidas no fracionamento por extração líquido-líquido do hidrolisado (frações aquosas e orgânicas) em processos fermentativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBI, M.; KUHAD, R.C.; SINGH, A. Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *C. shehatae* (NCL-3501): fermentation behaviour. Process Biochemistry, v. 31, n. 6, p. 555-560, 1996.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VASZQUÉZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. Journal of Food Engineering, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALVO, P.; SAVOIE, P.; TREMBLAY, D.; ÉMOND, J.P.; TURCOTTE, G. A systems approach for the evaluation of ethanol production based on forages. Bioresource Technology, v. 56, p. 61-68, 1996.
- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology, v.64, n.6, p.567-570, 1986.
- ARISTIDOU, A.; PENTILLA, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. Current Opinion in Biotechnology, v. 11, p. 187-198, 2000.
- ASTM Methods. D 1106-56. Standard test method for lignin in wood.
- AVELLAR, B.K.; GLASSER, W.G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. Biomass and Bioenergy, v. 14, n. 3, p. 205-218, 1998.
- BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, P.; MANZANARES, M.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particulate sizes. Process Biochemistry, v. 38, p. 187-192, 2002.

- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v. 11, p. 226-228, 1981.
- BARNET, D.; EXCOFFIER, G.; VIGNON, M. Valorisation de la biomasse lignocellulosique: Autohydrolyse rapide de copeaux de bois de peuplier. Bulletin / Societe Chimique De France, v. 6, p. 836-846, 1989.
- BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G.D.; SCHULTZ, T.P. Scanning electron microscopy of mixed hardwoods subjected to various pretreatment process. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 35, p. 713-716, 1987.
- BJORLING, T.; LINDMAN, B. Evaluation of xylose-fermenting yeasts for ethanol production from spent sulfite liquor. Enzyme and Microbial Technology, v. 11, n. 4, p. 240-246, 1989.
- BOUCHARD, J.; NGUYEN, T.S.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. Analytical methodology for biomass pretreatment - Part 1: Solid residues. Biomass, v. 23, p.243-261, 1990.
- BOUCHARD, J.; NGUYEN, T.S.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P.. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: Characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity. Bioresource Technology, v. 36, p. 121-131, 1991.
- BRANDÃO, M. P. Caracterização das frações aquosas provenientes da extração líquido-líquido do hidrolisado de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Relatório de conclusão de curso de graduação (FAENQUIL). Lorena - SP, 2000.
- BROWNELL, H.H.; SADDLER, J.N. Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering Symposium, v. 17, p. 53-70, 1986.

- BROWNELL, H.H.; YU, E.K.C.; SADDLER, J.N. Steam explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. Biotechnology and Bioengineering, v. 28, p. 792-801, 1986.
- BROWNING, B. Methods of wood chemistry. New York: John Willey and Sons, v. II, 1967.
- BUCHERT, J.; PULS, J.; POUTANEN, K. Comparison of *Pseudomonas fragi* and *Gluconobacter oxydans* for production of xylonic acid from hemicellulose hydrolysates. Applied Microbiology and Biotechnology, v.28, p.367-372, 1988.
- BUCHERT, J.; PULS, J.; POUTANEN, K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 20/21, p.309-318, 1989.
- CARVALHO, V. Fim da queima traz desemprego. Folha de São Paulo, 14 set. 1999. p. 3-5.
- CASTRO, F.B.; PAIVA, T.C.B.; ARCARO, I.J. Substitution of sugar cane bagasse with steam-pretreated eucalyptus (*Eucalyptus grandis*): effects on intake and growth rate of dairy heifers. Animal Feed Science and Technology, v.52, p.93-100, 1995.
- CHEM, C.L.; ROBERT, D. Characterization of lignin by ¹H and ¹³C NRM spectroscopy. Methods Enzymology, v. 161, p. 137-175, 1988.
- CLARK, T.A.; MACKIE, K.L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.34B, p.101-110, 1984.
- CONVERSE, A.O.; WARE, W.. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In: IEA/BIOFOR Workshop on applicatons of Biotechnology in Bioenergy Systems. Proceedings, 18-20 de Outubro, Ottawa, Canada, 1994.

- CONVERTI, A; PEREGO P.; TORRE, P.; SILVA, S.S. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid on xylitol production by *Candida guilliermondii*. Biotechnology Letters, v. 22, p. 1861-1865, 2000.
- COTRIM, A. Separação e caracterização de óleos provenientes da liquefação direta de ligninas da hidrólise ácida de eucalipto. Campinas: UNICAMP/ Instituto de Química, 1990. 115p. (Tese de Doutorado).
- CUNHA, H.C.M. Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos. Lorena:FAENQUIL/DEBIQ, 1999. 109p. Tese de Mestrado.
- CUNHA, H.C.M.; SILVA, F.T. Identification of low molecular weight aromatic compounds present in the hydrolysate from sugar cane bagasse pretreated by steam explosion. In: 6TH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, Guaratinguetá, SP, 25-28 october, 1999. Proceedings, p.288-294, 2001a.
- CUNHA, H.C.M.; SILVA, F.T. Characterization of carbohydrates present in the hydrolysate obtained from sugar cane bagasse pretreated by steam explosion. In: 6TH BRAZ. SYMP. CHEM. LIGNINS AND OTHER WOOD COMPON, Guaratinguetá, SP, 25-28 october, 1999. Proceedings, p.221-226, 2001b.
- DEKKER, R.F.H. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial β -D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. Biotechnology and Bioengineering, v.28, p.1438-1442, 1986.
- DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. Enzyme and Microbial Technology, v.19, p.220-225, 1996.

- DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Pretreatment of sugar cane bagasse for enhanced ruminal digestion. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57/58, p.171-182, 1996.
- DIEN, B.S.; HESPELL, R.B.; WYCKOFF, H.A.; BOTHAST, R.J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *E. coli* strain. Enzyme and Microbial Technology, v. 23, p. 366-371, 1998.
- DOMINGUEZ, J.M.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57/58, p. 49-56, 1996.
- DORAN, J.B.; ALDRICH, H.C.; INGRAM, L.O. Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by *K. Oxytoca* P2 containing chromosomally integrated genes encoding the *Z. mobilis* ethanol pathway. Biotechnology and Bioengineering, v. 44, p. 240-247, 1994.
- DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology, v. 55, p. 1-33, 1996.
- du PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. Enzyme and Microbial Technology, v. 8, p. 360-364, 1986.
- EKEN-SARAÇOĞLU, N.; SRSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. Biotechnology Letters, v. 22, p. 855-858, 2000.
- EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M.R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. Biotechnology and Bioengineering, v.38, p.1308-1317, 1991.
- FAIX, O. Classification of lignins from different botanical origins by FTIR Spectroscopy. Holzforschung, v. 45, p. 21-27, 1991.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood - Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.
- FENSKE, J.J.; GRIFFIN, D.A; PENNER, M.H. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. n. 20, p. 364-368, 1998.
- FERNANDEZ, N.; MORCK, R.; JOHNSRUD, S.; KRINGSTAD, K. Carbon-13 NMR study on lignin from bagasse. Holzforschung, v. 44, p. 35-38, 1990.
- FERRARI, M.D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. "Ethanol production from *Eucalyptus* wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*". Biotechnology and Bioengineering, v. 40, p. 753-759, 1992.
- FERRAZ, A; SOUZA, J.; SILVA, F.; GONÇALVES, A; BRUNS, R.; COTRIM, A. Controlled release of 2,4-D from granule matrix formulations based on six lignins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 45, p. 1001-1005, 1997.
- FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; COTRIM, A.R.; TEIXEIRA DA SILVA, F. The use of white - rot decay as a pretreatment for organosolv delignification of *Eucalyptus grandis* wood. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY. Proceedings. v.6, p. 1996, 221-224.
- FOCHER, B.; MARZETTI, A.; BELTRAME, P.L.; AVELLA, M. Steam exploded biomass for the preparation of conventional and advanced biopolymer-based materials. Biomass and Bioenergy, v. 14, n. 3, p. 187-194, 1998.
- FORSS, K.; KOKKONEN, R; SAGFORS, P. Determination of the molar mass distribution of lignins by gel permeation chromatography. ACS Symposium Series, v. 397, p. 124-133, 1988.
- FURLAN, S. A.; BOUILLAUD, P.; de CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. Process Biochemistry, v. 29, p. 657-662, 1994.

- GEPLACEA. Atlas del bagazo de la cana de azúcar. GEPLACEA/PNUD, México, 1990.
- GOLDSHMID, O. Ultraviolet spectra. In: Lignin - occurrence, formation, structure and reaction. K. V. Sarkanen e L. H. Ludwid. (ed). New York, Wiley/Interscience, 1977.
- GONÇALVES, A R. Oxidação de ligninas e modelos de lignina com oxigênio molecular em meio ácido. Campinas: UNICAMP/ Instituto de Química, 1995, 80p. (Tese de Doutorado).
- GUERRA, A.A. Polimerização de lignina solúvel por polifenoloxidasas e peroxidases de rabanete/H₂O₂. Lorena: FAENQUIL/Departamento de Biotecnologia, 1998. 99p. (Dissertação de Mestrado).
- GUERRA, A.A. Biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispora: caracterização dos polímeros residuais. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2002.143p. (Tese de Doutorado).
- GUERRA, A; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Isolation and characterization of MWL and enzymatically-liberated lignin from loblolly pine (*Pinus taeda*). In: 6TH BRAZ. SYMP. CHEM. LIGNINS AND OTHER WOOD COMPOUNDS, Guaratinguetá, SP, 25-28 october, 1999. Proceedings, p.304-309, 2001.
- GULATI, M.; KOHLMANN, K.; LADISCH, M.R.; HESPELL, R. BOTHAST, R.J. Assessment of ethanol production options for corn products. Bioresource Technology, v. 58, p. 253-264, 1996.
- GRASSI, G. Modern bioenergy in the European Union. In: Sustainable agriculture for food, energy and industry. International Conference. Braunschweig-Alemanha, junho 1997. Proceedings, v.2, p. 829-836, 1998.
- HAHN-HÄGERDAL, B. Ethanol fermentation of lignocellulose hydrolysates. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57/58, p.195-199, 1996.

- HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 28/29, p. 131-144, 1991.
- HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 786-792, 2003.
- HERRERO, A.A.; GOMEZ, R.F.; SNEDECOR, B.; TOLMAN, C.J.; ROBERTS, M.F.. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 22, n. 53, 1985.
- HIGUCHI, T. Biosynthesis and biodegradation of wood components. Florida: Academic Press, Inc., 1985, 679p.
- HISHIYAMA, S.; SUDO, K. Degradation mechanism of lignin by steam-explosion. In: 6th ISWPC. Proceedings. 1989, p. 405-410.
- HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. Biotechnology and Bioengineering, v.36, p.275-287, 1990.
- ICIDCA. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica. La Habana, 1987.
- INGRAM, L.O.; DORAN, J.B, Conversion of cellulosic materials to ethanol. FEMS Microbiology Reviews, v. 16, p. 235-241, 1995.
- JÖNSSON, L.J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N.O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 49, p. 691-697, 1998.

- KOBAYASHI, F.; TAKE, H.; ASADA, C.; NAKAMURA, Y. Methane production from steam-exploded bamboo. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 97, n. 6, p. 426-428, 2004.
- KORAN, Z. Wood Fiber, v. 2, n. 3, p. 247, 1970.
- LACORTE, M.C.G.; BURGI, R.; LACORTE, A.J.F. Bagaço de cana hidrolisado já utilizado em larga escala em confinamento. STAB, v. 5, n. 2, p. 43-52, 1986.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. Enzyme and Microbial Technology, v. 24, p. 151-159, 1999.
- LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.39/40, p.301-322, 1993.
- LEE, Y.Y.; McCASKEY, T.A. Hemicellulose hydrolysis and fermentation of resulting pentoses to ethanol. Tappi Journal, v. 66, n.5, p.102-107, 1983.
- LENZ, B. L. "Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to characterization of lignin". TAPPI, v. 13, p. 363-369, 1968.
- LIN, S.Y.; DENCE, C.W. Methods in lignin chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1992, 578p.
- LOMAX, T.D.; MACKIE, K.L.; MEDER, R.; CROUCHER, M.; BURTON, R.J. Steam explosion of *Pinus radiata* bark. Journal of Wood Chemistry and Technology, v.14, n.4, p. 539-561, 1994.

- LORA, J.H.; WAYMAN, M. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. Tappi, v.61, n.6, p.47-50, 1978.
- MARCHESSAULT, R.H.; COULOMB, S.; HANAI, T.; MORIKAWA, H. Monomers and oligomers from wood. Pulp and Paper Magazine of Canada Transactions TR52-TR56, 1980.
- MARTIN, C.; WAHLBOM, F.; GALBE, M.; JÖNSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Preparation of sugarcane bagasse hydrolysates for alcoholic fermentation by yeasts. In: 6TH BRAZ. SYMP. CHEM. LIGNINS AND OTHER WOOD COMPON, Guaratinguetá, SP, 25-28, october, 2001. Proceedings, p. 361-367.
- MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 274-282, 2002.
- MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Effects of Ca(OH)₂ treatments (Overliming) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. Biotechnology and Bioengineering, v. 69, n. 5, p. 526-536, 2000.
- McDOUGALL, G.J.; MORRISSON, I.M.; STEWART, D.; WEYERS, J.D.B.; HILLMAN, J.R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 62,. p. 1-20, 1993.
- McMILLAN, J.D..Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O. AND OVEREND, R.P. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. New York: American Chemical Society, p. 292-324, 1994a.
- McMILLAN, J.D..Conversion of Hemicellulose Hydrolysates to Ethanol. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O. AND OVEREND, R.P. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. New York: American Chemical Society, p. 411-437, 1994b.

- MES-HARTREE, M.; SADDLER, J.N. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnology Letters, v.5, n.8, p.531-536, 1983.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J.; DAVISON, J.; SALMON, J.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A. Relationship between effect of ethanol on proton flux across plasma membrane and ethanol tolerance in *Pichia stipitis*. Anaerobe, v. 3, p. 423-429, 1997.
- MICHALOWICZ, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M.R. Ultrastructural changes in poplar cell wall during steam explosion treatment. Holzforschung, v.45, n.3, p. 175-179, 1991.
- MONTANÉ, J. Methods in Lignin Chemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1992, 578p.
- MURMANIS, L.; YOUNGQUIST, J.A.; MYERS, G. C. Wood and Fiber Science, v. 18, n. 3, p. 369, 1986.
- NEDER, R. N. Microbiologia - Manual de Laboratório. São Paulo: Nobel, 1992, 138p.
- NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. Biomass and Bioenergy, v. 25, p. 301-308, 2003.
- NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Journal of Biotechnology, v. 87, p. 17-27, 2001.
- NIGAM, J.N. Bioconversion of water-hyacinth (*Euchhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. Journal of Biotechnology, v. 97, p. 107-116, 2002.
- NISHIKAWA, N.K.; SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J.N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.27, p.549-552, 1988.

NOTÍCIAS FAPESP. Produção de etanol utilizando bactéria recombinante.
<http://www.fapesp.br/notfap30.htm>. n. 30, abril 1998.

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

OVEREND, R. P.; JOHNSON, K. G. Lignin-carbohydrate complexes from poplar wood - Isolation and enzymatic degradation. In: Enzymes in biomass conversion. Washington: American Chemical Society, 1991, 520 p.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; LARSSON, M.; STENBERG, K.; SZENGYEL, Z.; TENGBORG, C.; ZACCHI, G. Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. Bioresource Technology, v.58, p.171-179, 1996 (a).

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v.19, p.470-476, 1996 (b).

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N.Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. Biotechnology and Bioengineering, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.

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

PAREKH, S.R.; PAREKH, R.S.; WAYMAN, M. Ethanol and butanol production by fermentation of enzymatically saccharified SO₂-prehydrolysed lignocellulosics. Enzyme and Microbial Technology, v. 10, p. 660-668, 1988.

PARHAM, R.A. Ultra-structure and chemistry. In: HAMILTON, F; LEOPOLD, B. Pulp and Paper Manufacture. Atlanta: TAPPI/CPPA, 1993. v. 3, p. 35-45.

- PFEIFER, P.A.; BONN, G.; BOBLETER, O. Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces carlsbergensis* W 34. Biotechnology Letters, v.6, n.8, p.541-546, 1984.
- PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G.; DU PREEZ, J.C. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Process Biochemistry, v.24, p.21-32, 1989.
- PULS, J.; POUTANEN, K.; KÖRNER, H.; VIKARI, L. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. Applied Microbiology and Biotechnology, v.22, p.416-423, 1985.
- RALPH, S.; RALPH, J. LANDUCCI, L. "NMR database of lignin and cell wall model compounds. Available ar URL <http://www.dfr.wisc.edu/software.html>, 1998.
- RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Química Nova, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- RANATUNGA, T.D.; JERVIS, J.; HELM, R.F.; McMILLAN, J.D.; HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5) xylose fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.67, p.185-198, 1997.
- RIPOLI, T.C.C.; MOLINA JR., W.F.; RIPOLI, M.L.C. Energy potencial of sugar cane biomass in Brazil. Scientia Agricola, v. 57, n. 4, p. 677-681, 2000.
- ROBERT, D.; CHEM, C. L. Biodegradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*: quantitative analysis of biodegraded spruce lignins by ¹³C-NMR Spretroscopy. Holzforschung, v. 43, p. 323-333, 1989.
- ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. Process Biochemistry, v. 26, p. 15-21, 1991.

- ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; FELIPE, M. G. A. SILVA, S. S.; SATO, S. Influence of the aeration and pH on the xylose fermentation to ethanol by *Pichia stiptis*. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v. 37, n. 1, p. 55-63, 1994.
- ROBINSON, J.; KEATING, J. D.; MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N. The fermentability of concentrated softwood-derived hemicellulose fractions with and without supplemental cellulose hydrolysates. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 757-765, 2003.
- ROCHA, G.J.M.; SILVA, F.T.; CURVELO, A.A.S.; ARAÚJO, G.T. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: 5TH BRAZ. SYMP. CHEM. LIGNINS AND OTHER WOOD COMPOUNDS, Curitiba, PR, 31 agosto - 5 setembro. Proceedings. 1997, p.3-8.
- RODRIGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VASQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. Journal of Food Engineering, v. 61, p. 143-152, 2004.
- SASKA, M.; OZER, E. Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. Biotechnology and Bioengineering, v.45, p.517-523, 1995.
- SCHULTZ, T.P.; BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G.D. Steam explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment. Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development, v. 22, p.344-348, 1983.
- SHORT, P. H.; LYON, D. E. Wood Fiber, v. 10, n. 2. p. 92, 1978.
- SILVA, F.T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Campinas: UNICAMP/ Instituto de Química, 1995. 106p. (Tese de Doutorado).

- SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; LEMA, J.M. Inhibition of cellulase activity by sunflower polyphenols. Biotechnology Letters, v.19, n.6, p.521-524, 1997.
- SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry – Fundamentals and Applications. London: Academic Press, 2nd Edition, 1993.
- SJÖSTRÖM, E.; WESTRMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking. Eero Sjöström e Raimo Alén (eds.). Springer Series in Wood Science, Helsinki, pp. 1-20, 1999.
- SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Effect of corn steep liquor on fermentation of mixed sugars by *Candida shehatae* FPL-702. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57/58, p. 551-561, 1996.
- SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. Bioresource Technology, v. 72, p. 253-260, 2000.
- STAMBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. Principles of Fermentation Technology. New York: Pergamon, v. 2, cap. 2, 1995.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUN, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; WANG, Y. X.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. Polymer Degradation and Stability, v. 2004.
- TAI, D. S.; TERAZAWA, M. CHEM, C. L. Lignin biodegradation products from birch wood by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforschung, v. 44, p. 185-190, 1990.

- TANAHASHI, M.; KARINA, M.; TAMABUCHI, K.; HIGUCHI, T. Degradation mechanism of lignin accompanying steam explosion I. Mokuzai Gakkaishi, v.35, n.2, p.135-143, 1989.
- TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. Applied Microbiology and Biotechnology, v.23, p.191-197, 1986.
- TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipis* CBS 5776. Biotechnology Letters, v.7, n.11, p.841-846, 1985.
- UNICA – União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. Disponível em: www.fenasucro.com.br/ptbr/ip-nots.asp?id=2704. Acesso em: 01/06/2004.
- VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C. Acetic acid inhibition of the xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 13, p. 82-86, 1991.
- VON SIVERS, M.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. Bioresource Technology, v. 51, p. 43-52, 1995.
- VON SIVERS, M.; ZACCHI, G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. Bioresource Technology, v. 56, p. 131-140, 1996.
- WATSON, N. E.; PRIOR, B. A.; du PREEZ, J. C., LATEGAN, P. M. Oxygen requirements for the xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. Enzyme and Microbial Technology, v. 6, p. 447-450, 1984.
- WEXLER, A. Characterization of lignosulfonates by ultraviolet spectrometry. Analytical Chemistry, v. 36, p. 213-221, 1964.

WILSON J.J.; DESCHATELETS, L.; NISHIKAWA, N.K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 31, p. 592-596, 1989.

WONG, K.K.Y.; DEVERELL, K. F.; KEITH, L.M.; CLARL, T.A.; DONALDSON, L.A. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p. 447-456, 1988.

WOOD, T.M.; SADDLER, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. Methods Enzymology, v. 160, p. 3-11, 1988.

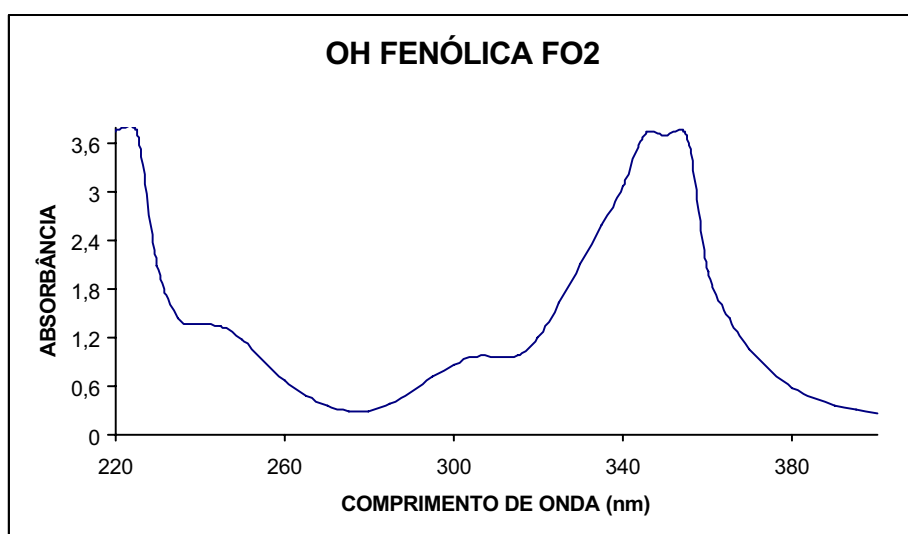
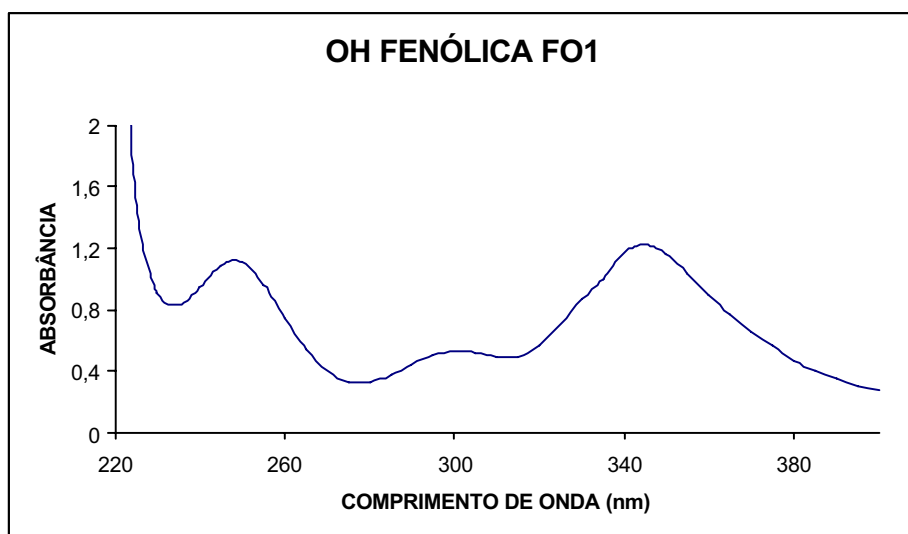
ZALDIVAR, J.; INGRAM, L.O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY 01. Biotechnology and Bioengineering, v.66, n. 4, p. 203-210, 1999.

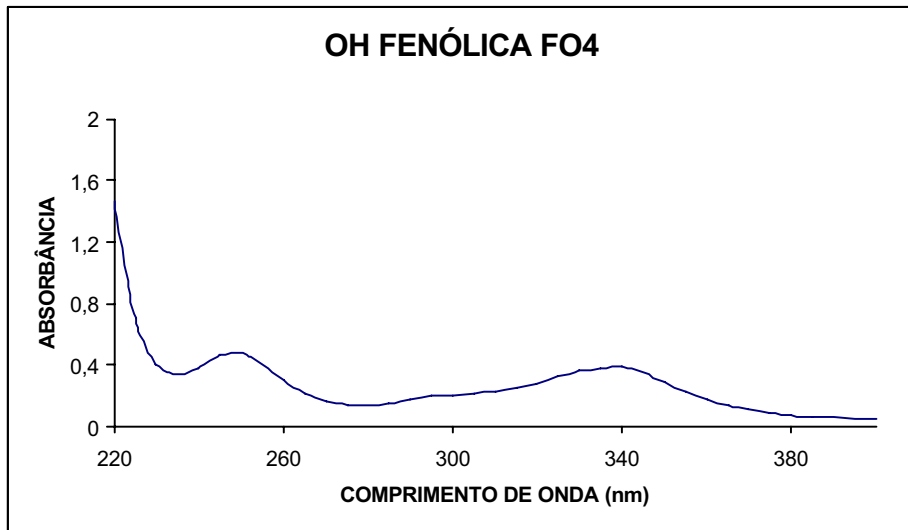
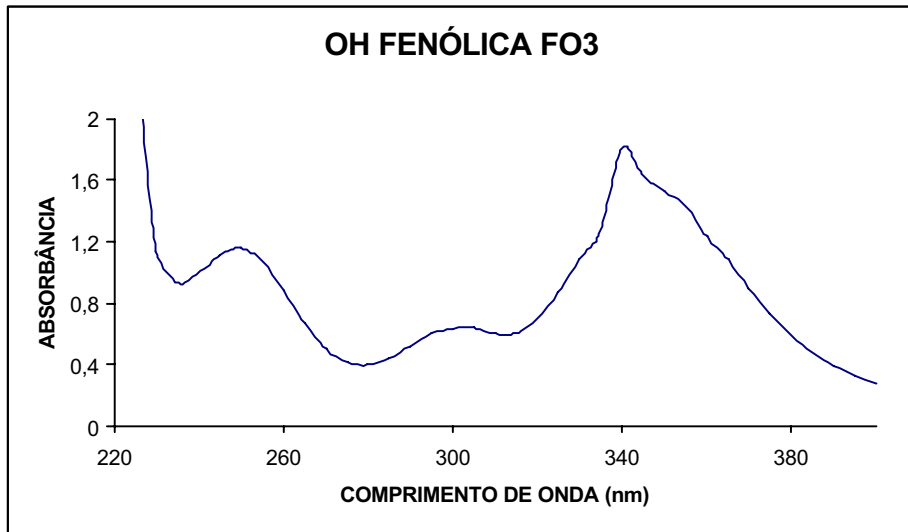
ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, v.68, n. 5, p. 524-530, 2000.

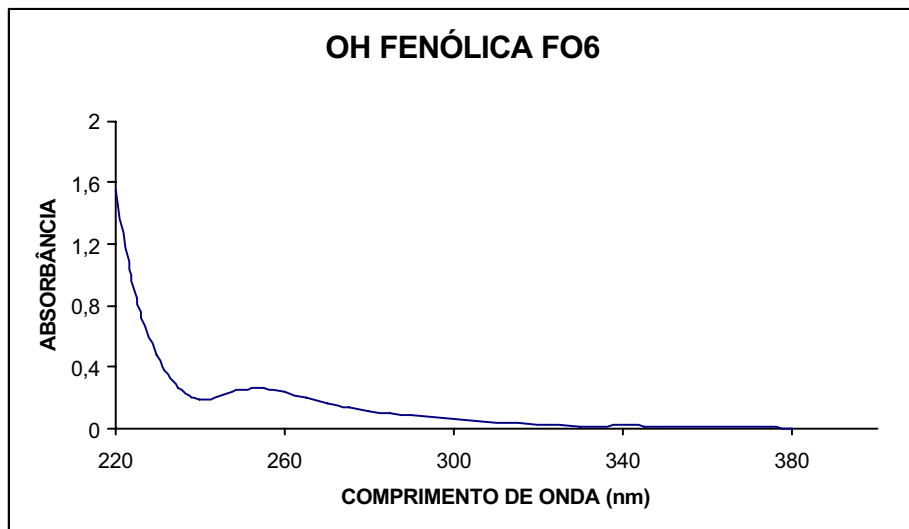
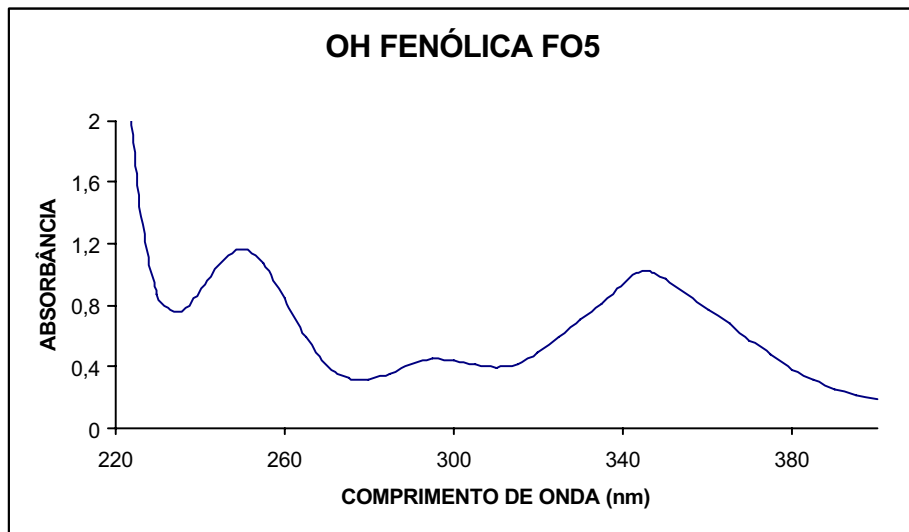
APÊNDICE 1

APÊNDICE 1

Espectros UV diferencial das frações orgânicas obtidas pelo procedimento de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Espectro feito a partir de uma solução com 7,69 g/L de cada fração orgânica em dioxano/água 97%.



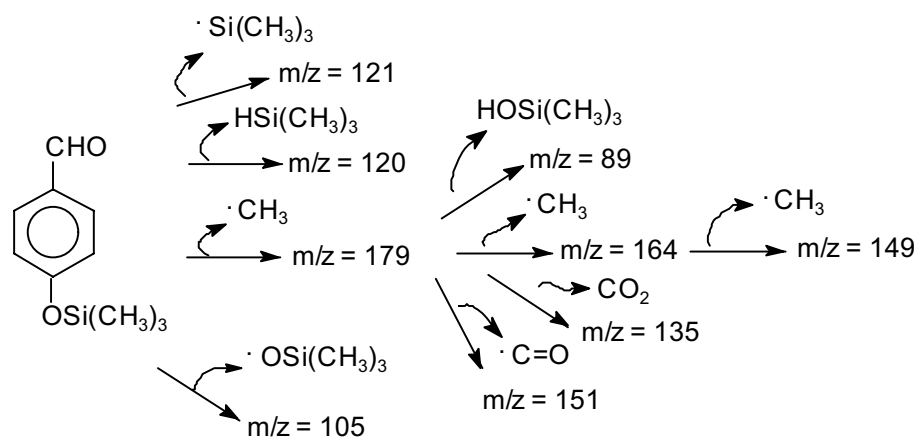
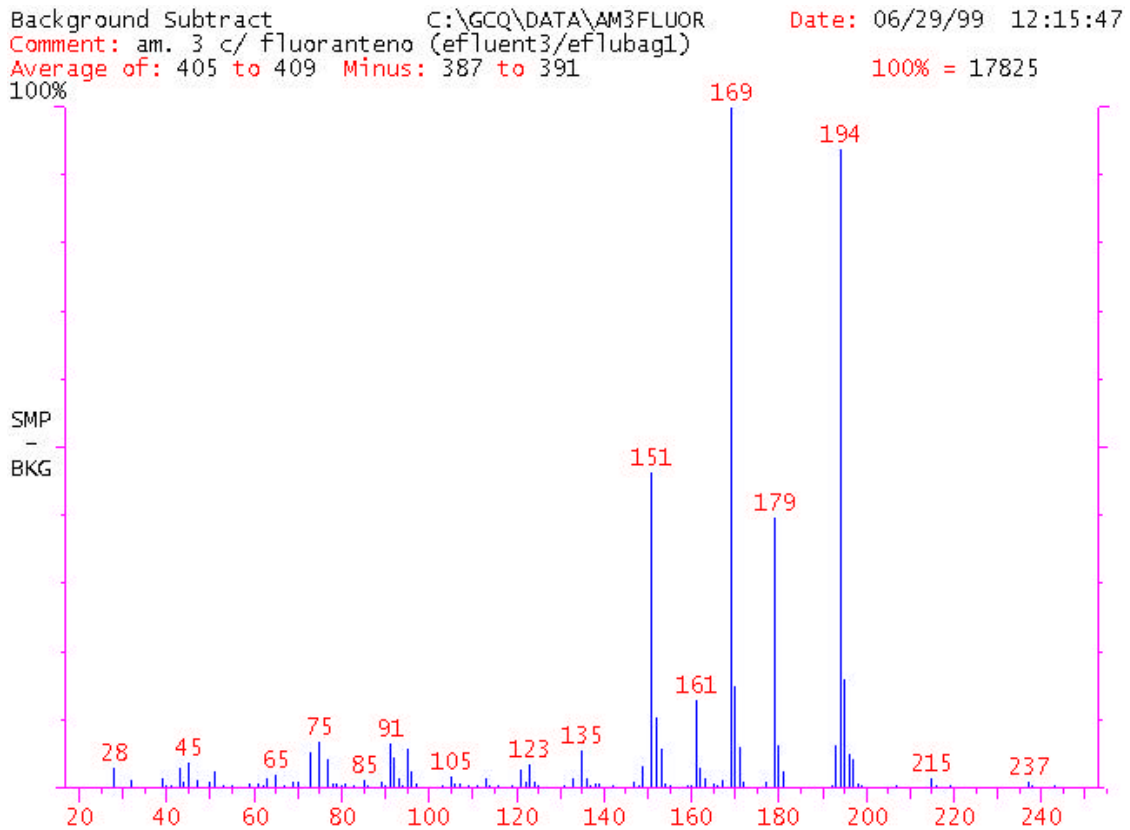




APÊNDICE 2

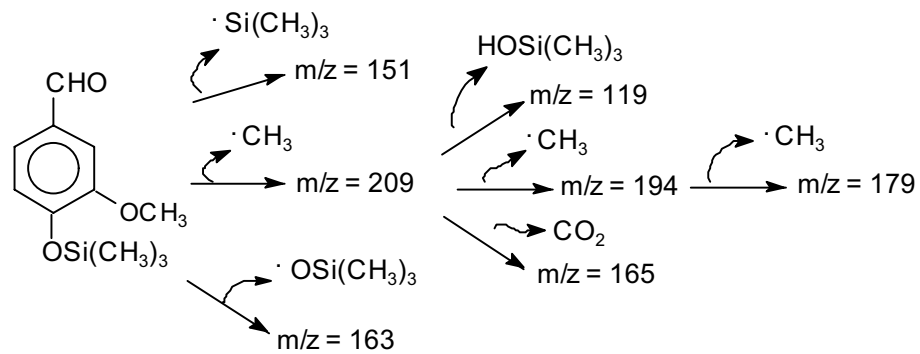
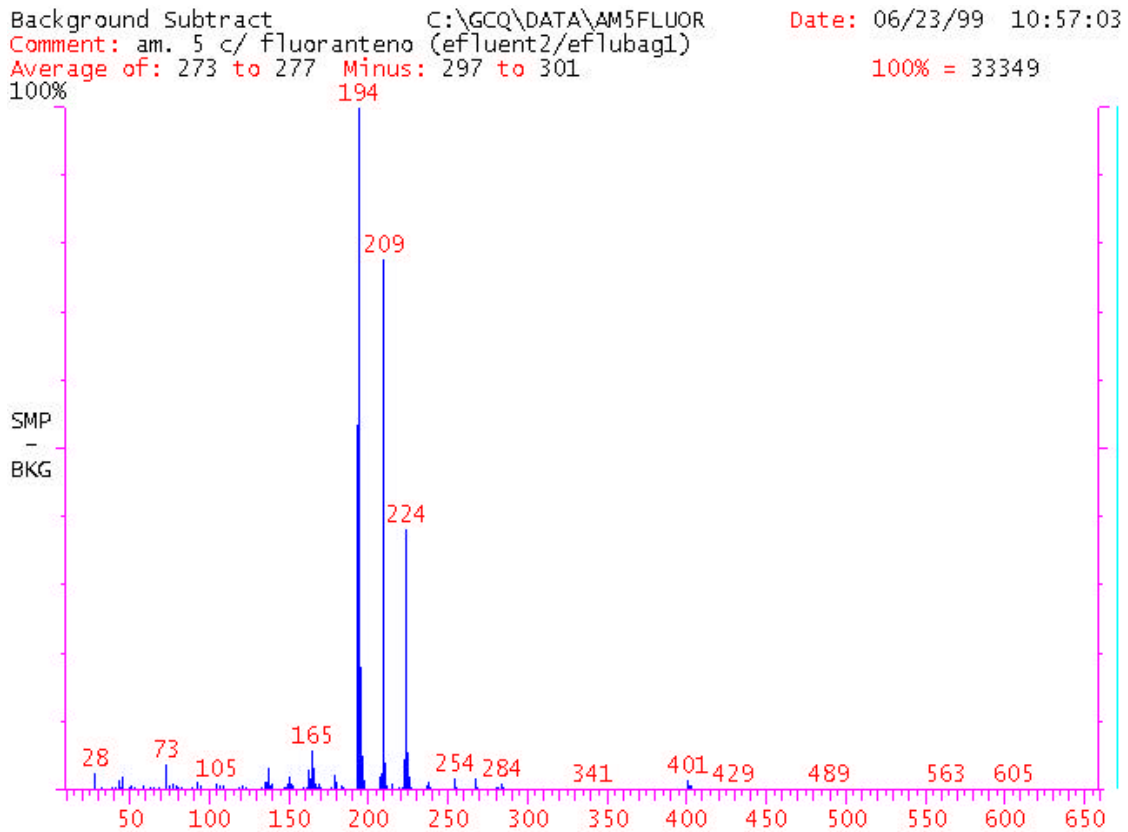
Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o *p*-hidroxibenzaldeído ($m/z=194$).



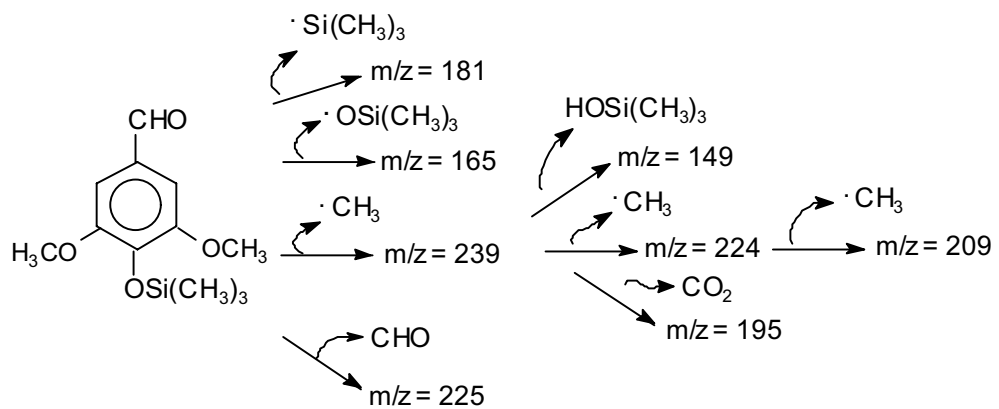
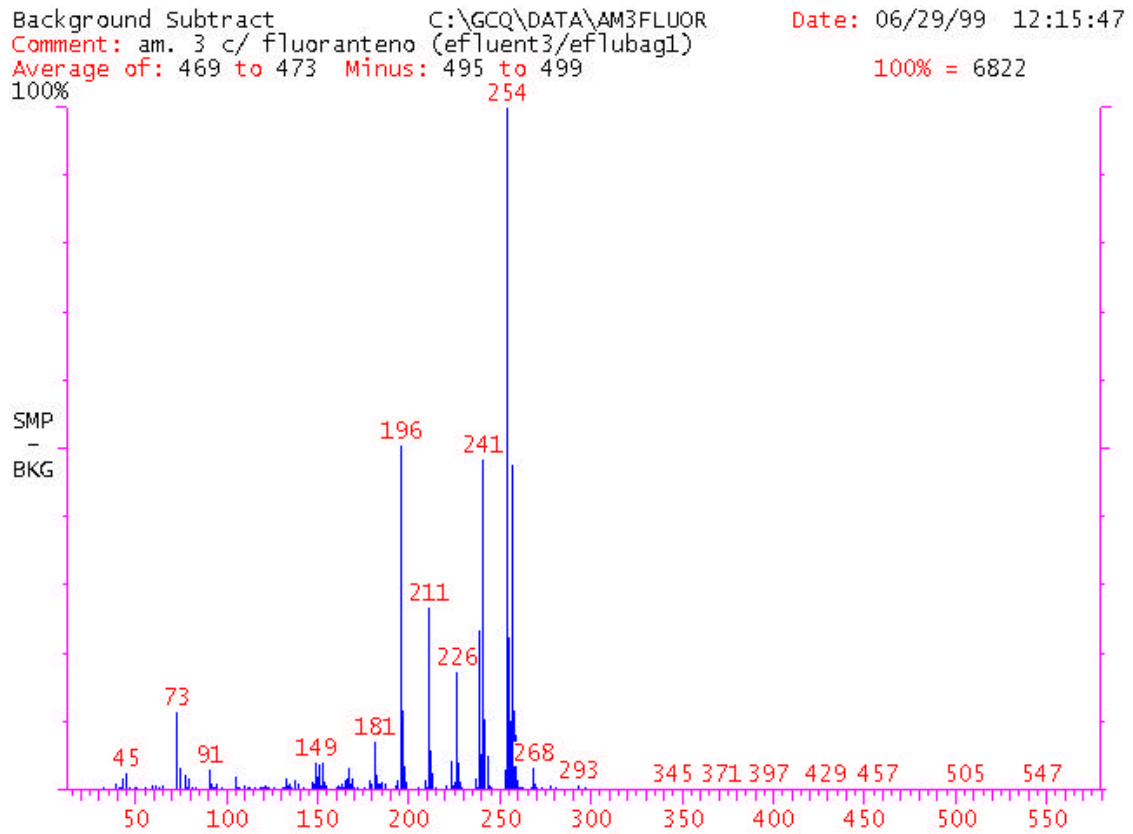
Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para a vanilina ($m/z=224$).



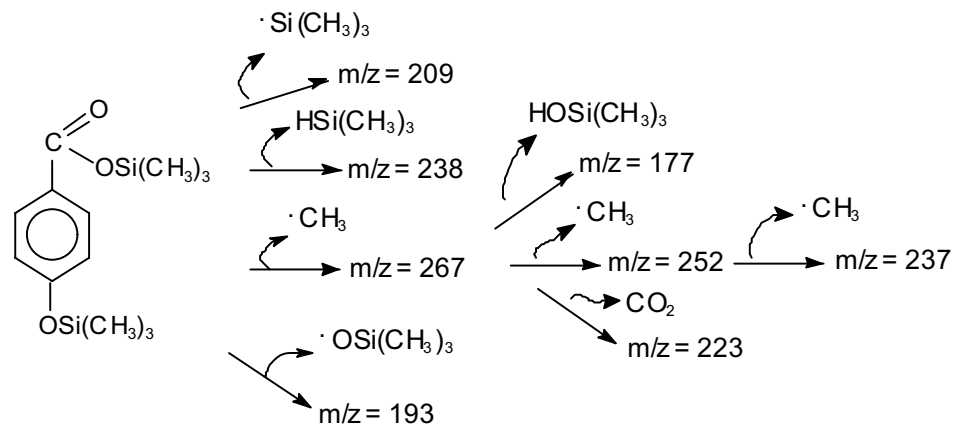
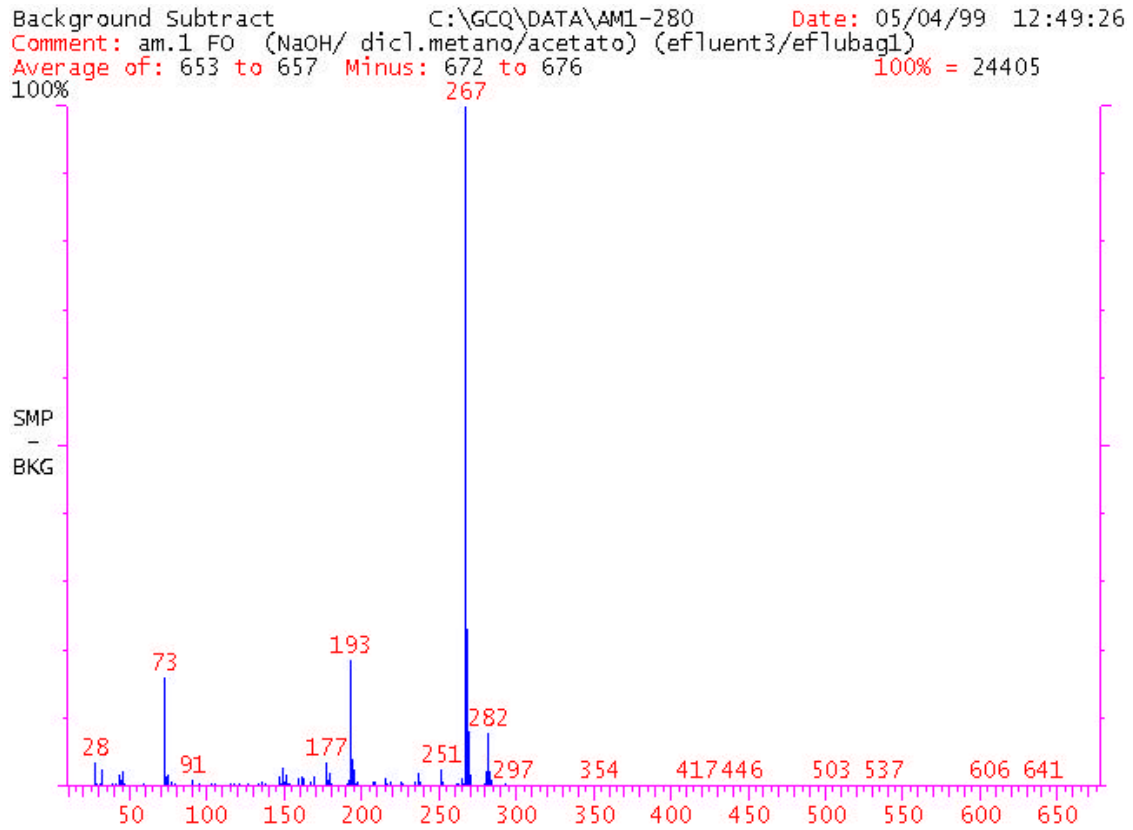
Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o siringaldeído ($m/z=254$).



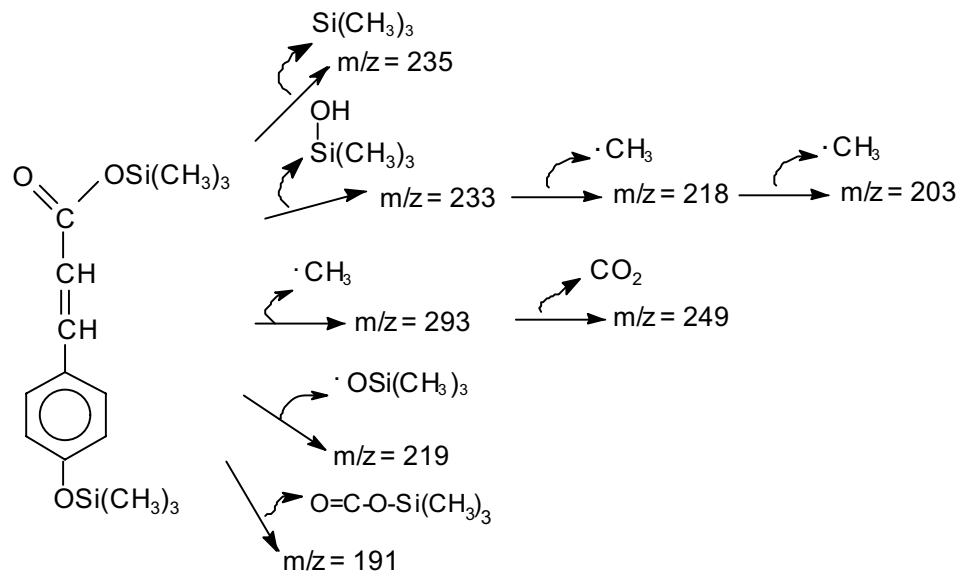
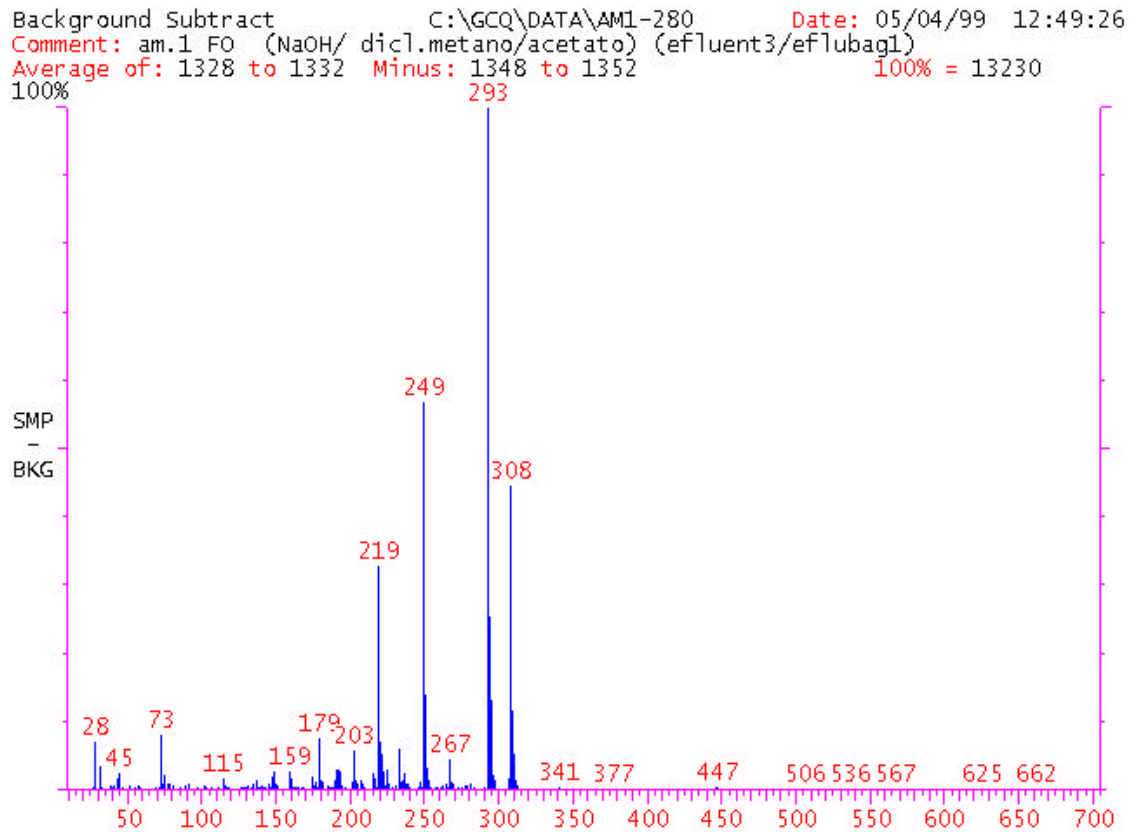
Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido *p*-hidroxibenzóico ($m/z=282$)



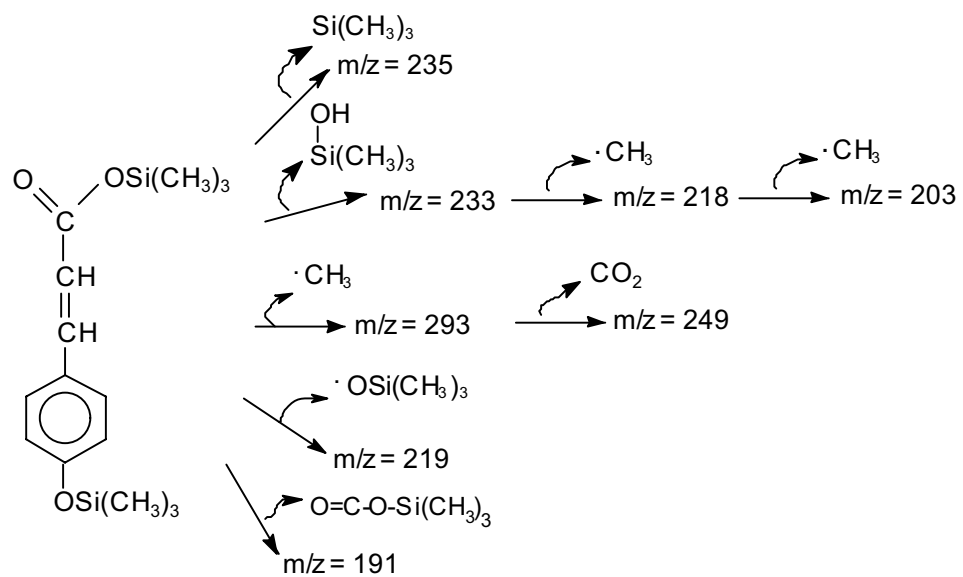
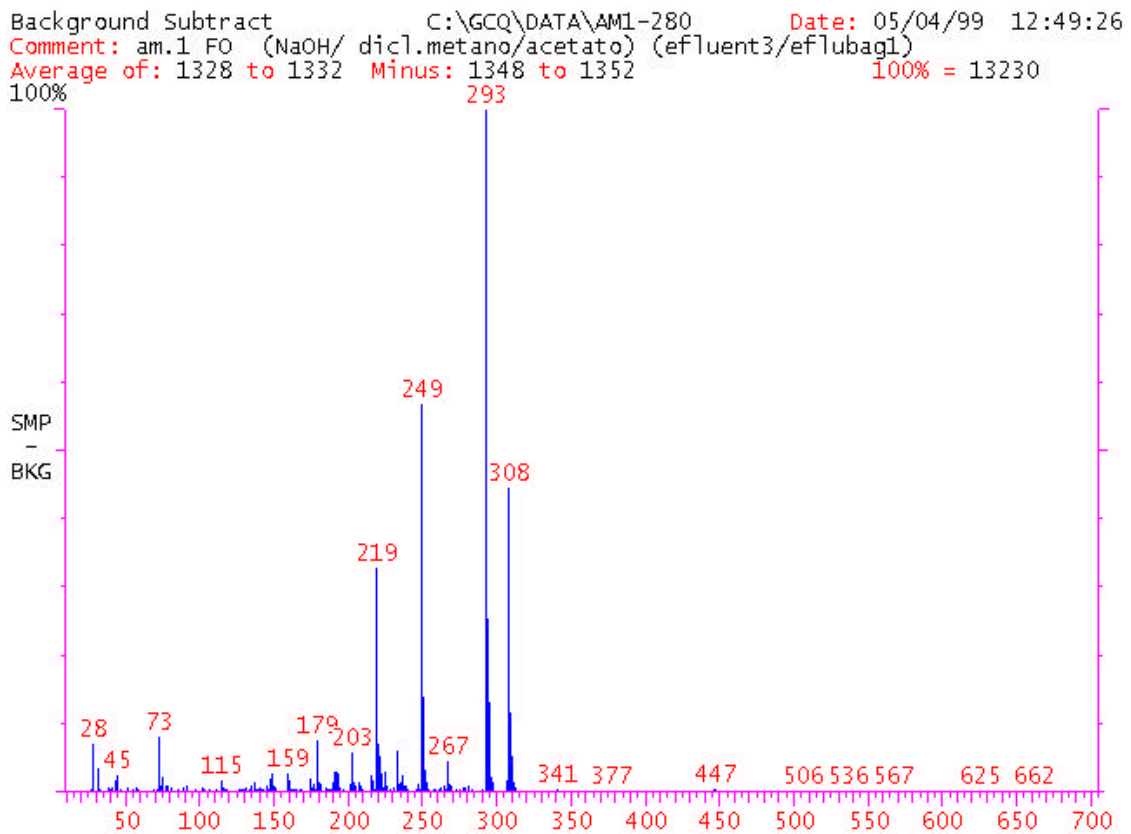
Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido *trans*-cumárico ($m/z=308$).



Apêndice 2

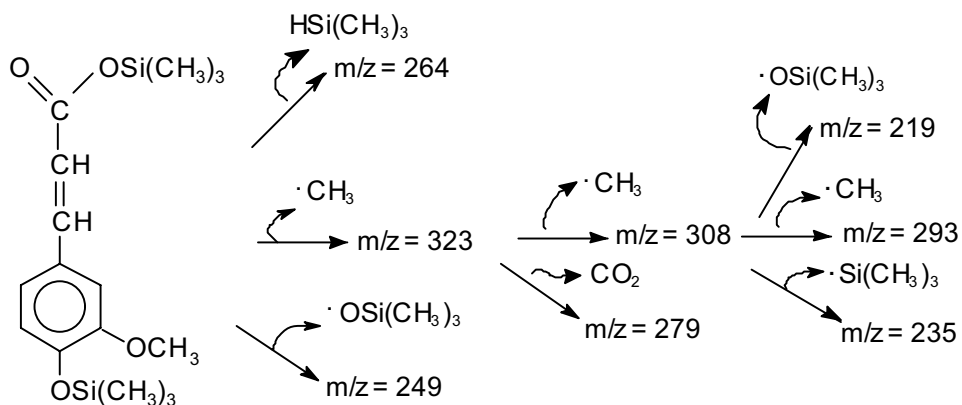
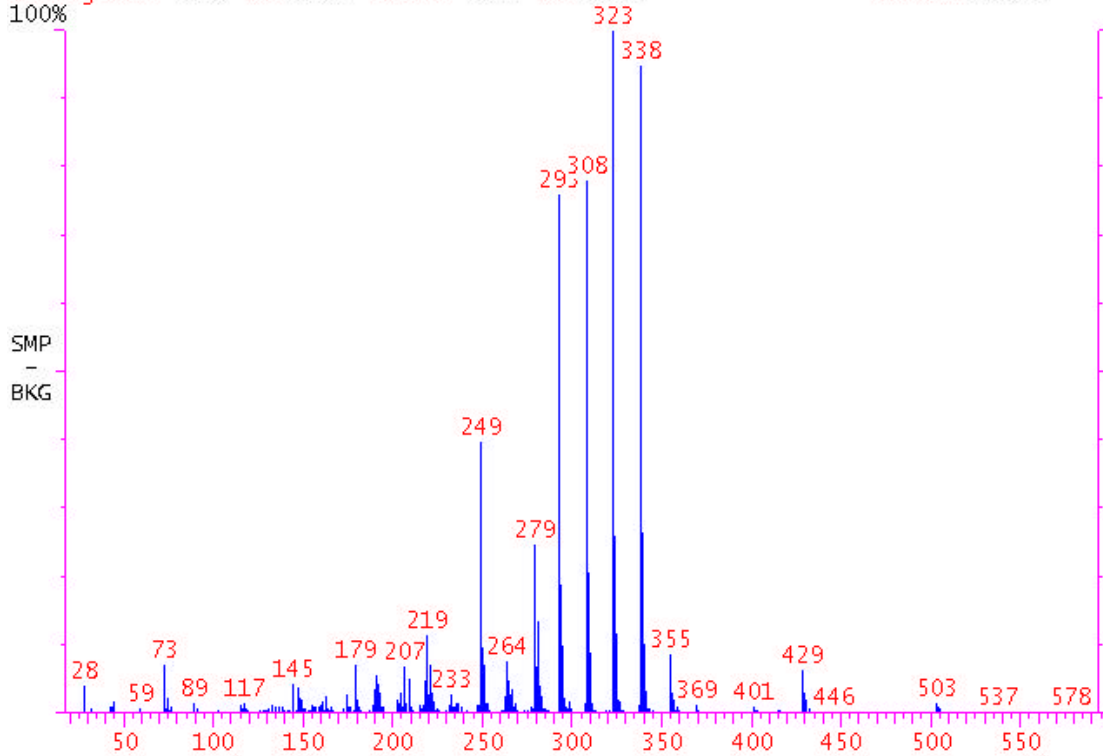
Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido *cis*-cumárico ($m/z=308$).



Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido ferúlico ($m/z=338$).

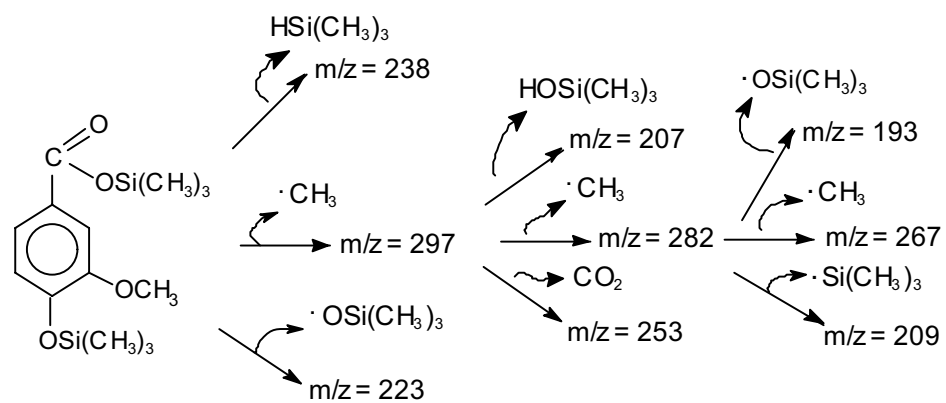
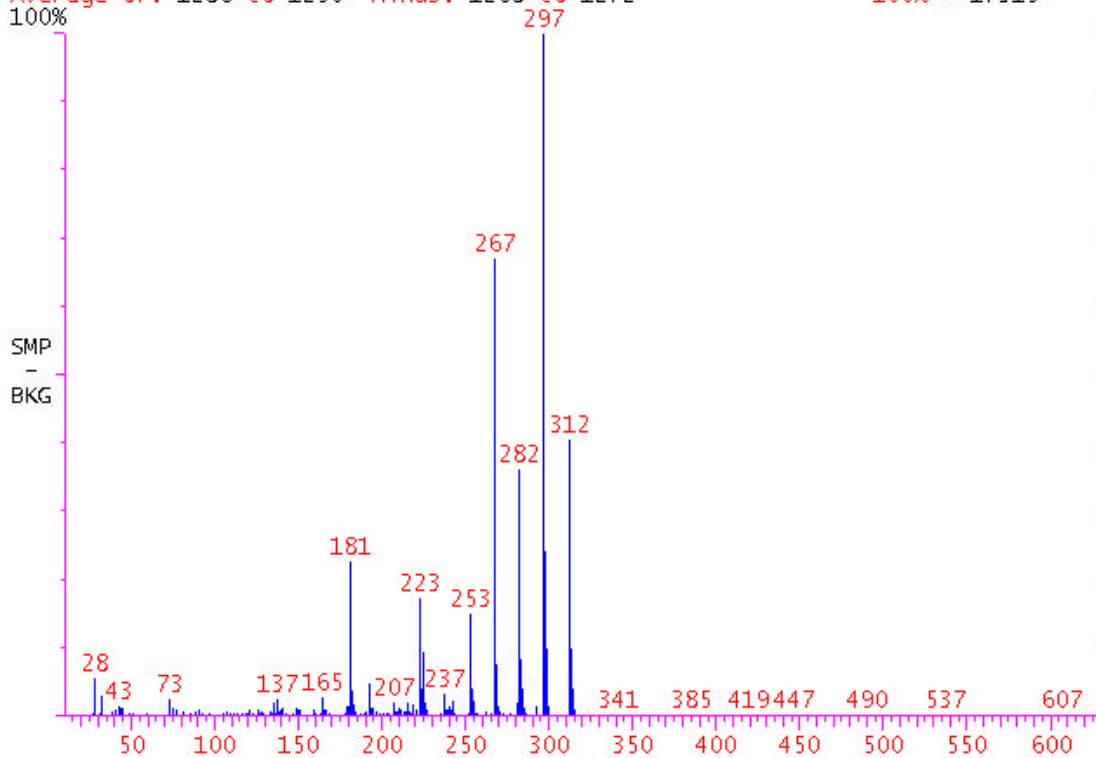
Background Subtract C:\GCQ\DATA\AM1-280 Date: 05/04/99 12:49:26
 Comment: am.1 FO (NaOH/ dicl.metano/acetato) (efluent3/eflubag1)
 Average of: 1805 to 1809 Minus: 1777 to 1781 100% = 29041



Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido vanílico (m/z=312)

Background Subtract C:\GCQ\DATA\AM1-280 Date: 05/04/99 12:49:26
 Comment: am.1 FO (NaOH/ dicl.metano/acetato) (efluent3/eflubag1)
 Average of: 1286 to 1290 Minus: 1268 to 1272 100% = 17319



Apêndice 2

Espectro de massas e proposta de fragmentação para o ácido siríngico ($m/z=342$)

Background Subtract C:\GCQ\DATA\AM2FLUOR Date: 06/29/99 16:52:15
 Comment: am. 2 c/ fluoranteno (melich 2.0-280-10.0/eflubag1)
 Average of: 1315 to 1319 Minus: 1310 to 1314 100% = 2354

