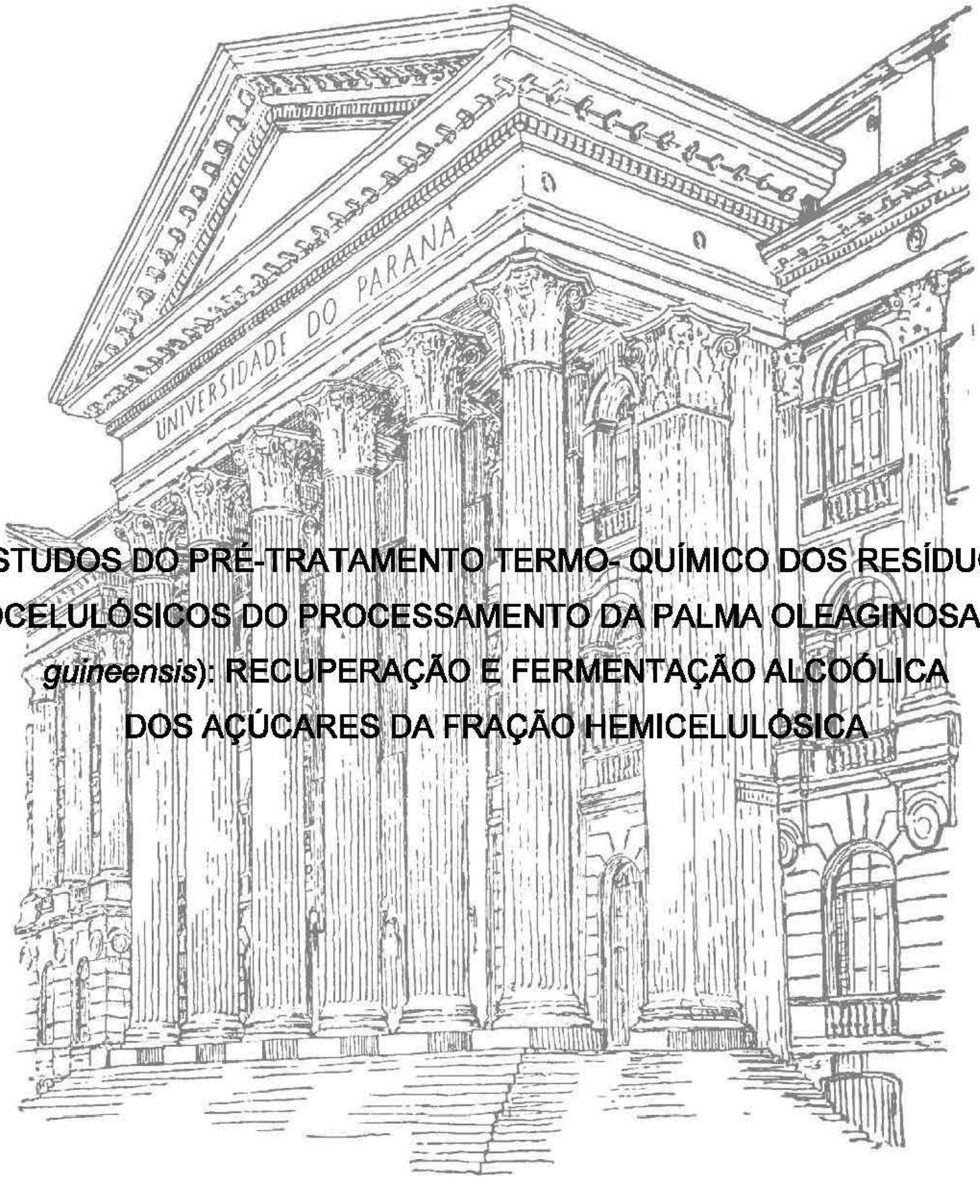
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KELI CRISTINA ALVIM SOBRAL



ESTUDOS DO PRÉ-TRATAMENTO TERMO- QUÍMICO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DO PROCESSAMENTO DA PALMA OLEAGINOSA (*Elaeis guineensis*): RECUPERAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS AÇÚCARES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA

Curitiba

2016

KELI CRISTINA ALVIM SOBRAL

ESTUDOS DO PRÉ-TRATAMENTO TERMO- QUÍMICO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DO PROCESSAMENTO DA PALMA OLEAGINOSA (*Elaeis guineensis*): RECUPERAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS AÇÚCARES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Dourtor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Profª. Drª. Adenise Lorenci Woiciechowski
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2016

Catalogação na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S677e

Sobral, Keli Cristina Alvim
Estudos do pré-tratamento termo-químico dos resíduos lignocelulósicos do processamento da palma oleaginosa (Elaeis guineensis): recuperação e fermentação alcoólica dos açúcares da fração hemicelulósica / Keli Cristina Alvim Sobral. – Curitiba, 2016.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia , Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016.

Orientador: Adenise Lorenci Woiciechowski – Coorientador: Carlos Ricardo Soccol.

1. Palmeira oleaginosa. 2. Hidrólise. 3. Hidrolisados. 4. Fermentação. I. Universidade Federal do Paraná. II. Woiciechowski, Adenise Lorenci. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Título.

CDD: 633.85

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

KELI CRISTINA ALVIM SOBRAL

"ESTUDOS DO PRÉ-TRATAMENTO TERMO-QUÍMICO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DO PROCESSAMENTO DA PALMA OLEAGINOSA *(Elaeis guineensis)*: RECUPERAÇÃO E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS AÇÚCARES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA".

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Prof. Dr. Arion Zandoná Filho

Profa. Dra. Maria Giovana Binder Pagnoncelli

Prof. Dr. Luiz Ferreira de França

Curitiba, 31 de Março de 2016.

Ao meu esposo Arnaldo e minhas filhas Ana Beatriz e Ana Carolina, amores da minha vida. Aos meus pais José e Antonia, e toda a família Alvim, Oliveira e Sobral pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Meu agradecimento especial a DEUS, pela força, pela fé que me moveu em todos os meus dias.

A minha orientadora Profª. Drª. Adenise Lorenci Woiciechowski, pela orientação, amizade e confiança que contribuíram muito para minha formação profissional.

Aos professores do Programa de Pós Graduação de Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, Profª. Drª. Vanete Thomza Soccol, Profª. Drª. Adriane Medeiros, Profª. Drª. Luciana Vandenberghe, Prof. Dr. Júlio Carvalho, Prof. Dr.Luiz Alberto Letti, Profª. Drª. Cristine Rodrigues, pelos ensinamentos, incentivo à pesquisa e amizade.

Ao Programa de Pós Graduação de Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Arion Zandoná, pela orientação, apoio e colaboração durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, pelo consentimento em usar o HPLC, e toda equipe do CEPESQ (Luana, Douglas, Gustavo, Priscila, Matheus, Sandro, Gisele, Vinicius) pelo apoio nas análises de HPLC.

A minha família, em especial meu esposo Arnaldo e minhas filhas Ana Carolina e Ana Beatriz, pelo apoio incondicional. Amo muito vocês.

Aos meus pais, José e Antonia, a minha sogra Maria de Lourdes, que sempre me incentivaram.

Ao meu irmão José Ricardo, pelo incentivo, e exemplo de força de vontade.

A minha irmãzinha, de coração, Vanessa Zorzeto, pelo apoio, por me ouvir, e me incentivar a cada dia.

Aos técnicos Natacha e Otacílio pelo apoio no laboratório.

Aos profissionais que de alguma forma ajudaram em alguma etapa da pesquisa: Cleuza (Laboratório de Nutrição animal) e em especial a técnica Mitiyo Miyaoka, pela orientação na condução dos experimentos e pela amizade.

Aos amigos, que ao longo dos anos de doutorado, tive a felicidade de conhecer e que me apoiaram em todas as circunstâncias. Seria difícil citar todos, e horrível se esquecesse de um deles. Mas vocês sabem quem são. Obrigado por fazerem parte da minha vida, e tornarem meus dias mais alegres e me ajudarem a seguir em frente.

À CAPES pela oportunidade e a empresa Biopalma/Vale pelo financiamento do projeto.

"De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser

interrompidos

antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho

novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!"

(Fernando Sabino)

RESUMO

Resíduos lignocelulósicos são considerados a maior fonte de energia renovável. A sua completa utilização é um dos grandes desafios para a produção em grande escala do etanol celulósico ou 2ª geração. Os principais desafios a serem vencidos estão relacionados à recuperação dos açúcares da celulose e hemicelulose, melhoraria da fermentabilidade dos hidrolisados, obtenção de leveduras mais resistentes aos compostos tóxicos dos hidrolisado hemicelulósicos e principalmente reduzir custos para tornar o processo viável economicamente. Vários resíduos, como: bagaço de cana de açúcar, palha de milho, palha de arroz, palma vêm sendo utilizados como fonte de resíduo lignocelulósico. No Brasil e no mundo, resíduos provenientes da extração do óleo de palma de dendê vêm se destacando como fonte de biomassa lignocelósica devido ao grande volume gerado no seu processamento. Os resíduos sólidos da palma são constituídos do tronco, da folha e dos cachos vazios ou *empty fruit bunches (*EFB), além das fibras do coco após a extração do óleo e das cascas da amêndoa, os quais possuem em sua estrutura uma alta porcentagem de carboidratos que podem ser convertidos em açúcares para a produção de etanol. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições de pré-tratamento ácido dos resíduos da palma, para maior recuperação de xilose da fração hemicelulósica, com baixa formação de compostos secundários, como ácido acético, furfural e 5-Hidroximetilfurfural (HMF), que são inibidores em processo subsequente de fermentação alcoólica. Das frações da palma avaliada (folha e EFB) foi possível recuperar de 70 a 90% das pentoses nos processos de pré-tratamento ácido. Hidrolisados ácidos de EFB foram utilizados para avaliar os fatores que mais afetam a fermentação de pentoses com a levedura *Pichia stipitis*. Os resultados demonstram que embora a produção de etanol seja baixa nestes hidrolisados, através da otimização das condições em termos de aeração, concentração de xilose e inibidores, assim como a adaptação da cepa ao hidrolisado é possível aumentar a produtividade.

Palavras-chave: Palma (*Elaeis guineensis*). Hidrólise ácida em condições brandas. Hidrolisados hemicelulósicos.

ABSTRACT

Lignocellulosic wastes are considered the major source of renewable energy. Its full use is one of the big challenges for large-scale production of cellulosic ethanol or 2nd generation. The main challenges to be overcome are related to the recovery of the cellulose and hemicellulose sugars, improvement of fermentability of hydrolysates, obtaining of yeasts more resistant to toxic compounds from hemicellulosic hydrolysates and mostly cut costs to make the process economically viable. Various wastes, such as sugar cane bagasse, corn stover, rice straw, palm has been used as a source of lignocellulosic waste. In Brazil and in the world, waste from oil palm In Brazil and in the world, waste from oil palm oil extraction have been standing out as a source of biomass lignocelósica due to the large volume generated in processing.The solid wastes of palm are made from the trunk, leaf and empty bunches or empty fruit bunches (EFB), apart from coconut fibers after extraction of oil and almond shells, of which have in its structure a high percentage of carbohydrates that can be converted into sugars for the production of ethanol. The objective of this study was to optimize the conditions of acid pretreatment of palm waste, for greater recovery of the pentoses of hemicellulose fraction, with low formation of toxic secondary compounds, such as acetic acid, furfural and 5-Hydroxymethylfurfural (HMF), which are inhibitors in subsequent process of alcoholic fermentation. Of the fractions of palm evaluated (leaf and EFB) it was possible to recover 70 to 90% of the pentoses in the acid pretreatment processes. Acid hydrolysates of EFB were used to evaluate the factors that most affect the fermentation of pentoses with *Pichia stipitis* yeast. The results demonstrate that although ethanol production is low in these hydrolysates, by optimizing the conditions in terms of aeration, concentration of xylose and inhibitors, it is possible to increase productivity.

Keywords: Palma (*Elaeis guineensis*). Acid hydrolysis under mild conditions. hemicellulosic hydrolyzates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - COMPOSIÇÃO GERAL DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....24
FIGURA 2- ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DA CELULOSE 24
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DA HEMICELULOSE – XILANA.....25
FIGURA 4 - ESTRUTURAS PRECURSORES DA LIGNINA.....27
FIGURA 5 - PALMA OLEAGINOSA. 28
FIGURA 6 - PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA 29
FIGURA 7 - ESQUEMA DE PRÉ TRATAMENTO DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO 30
FIGURA 8 - PRINCIPAIS PRODUTOS GERADOS DURANTE O PROCESSO DE FRACIONAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 34
FIGURA 9 - PARTES DA FOLHA 42
GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA. 53
FIGURA 10 – ETAPAS DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ÁCIDA. 64
FIGURA 11 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA EFB.....73
FIGURA 12 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA:.....75
FIGURA 13 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA EFB.....77
FIGURA 14 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA 79
FIGURA 15 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA PECÍOLO 83
FIGURA 16 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA:.....85
FIGURA 17 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA DA FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO).....86

FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA.....88
FIGURA 19 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA O FOLÍOLO DA PALMA.....93
FIGURA 20 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA.....94
FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA O FOLÍOLO DA PALMA. 96
FIGURA 22 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA.....97
FIGURA 23 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DAS FOLHAS DE COQUEIRO *(ARECA BAMBU)*.....113
FIGURA 24 - FORMAÇÃO DE GÁS EM TUBO DE DUHRAM.....114
GRÁFICO 2 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE LINHAGENS COM HABILIDADE EM FERMENTAR.....115
GRÁFICO 3 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB.....127
FONTE: O autor (2016).....127
FIGURA 25 - CRESCIMENTO DE *Pichia stipitis* EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIO HIDROLISADO DE EFB.....129
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE, PRODUÇÃO DE ETANOL E CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA PARA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES RELAÇÕES VM/VF.....134
FIGURA 27 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB, PARA ADAPTAÇÃO.....136
FIGURA 28 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB. 137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA PALMA OLEAGINOSA51
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA TOTAL DO PECÍOLO, FOLÍOLO E EFB DE PALMA OLEAGINOSA.....55
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DAS FRAÇÕES DA PALMA OLEAGINOSA NA LITERATURA.....56
TABELA 4 - NÍVEIS E VALORES REAIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS, TEMPO, CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO E TEMPERATURA PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (FOLÍOLO E PECÍOLO) E EFB.....65
TABELA 5 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA EFB NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....70
TABELA 6 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA EFB NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....71
TABELA 7 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA A FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....81
TABELA 8 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA A FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....82
TABELA 9 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA FRAÇÃO DA FOLHA (FOLÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....90
TABELA 10 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA FRAÇÃO DA FOLHA (FOLÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....91
TABELA 11 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE EFB.....98

TABELA 12 - ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRÉ-TRATAMENTO DE PECÍOLO 99
TABELA 13 - ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRÉ-TRATAMENTO DE FOLÍOLO 100
TABELA 14 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PLANEJAMENTOS 2^3 PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA 102
TABELA 15 - MATERIAL COLETADO EM CADA REGIÃO.....108
TABELA 16 - NÚMERO DE ESPÉCIES ISOLADAS POR REGIÃO 111
TABELA 17 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL APRESENTADA PELAS CEPAS ISOLADAS NA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE FERMENTAR PENTOSES NOS MEIOS SINTÉTICOS E HIDROLISADOS.....116
TABELA 18 - COMPOSIÇÃO DOS INÓCULOS PARA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE EFB DE ÁCIDO CLORÍDRICO.....122
TABELA 19 - COMPOSIÇÃO DOS INÓCULOS PARA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE EFB DE ÁCIDO SULFÚRICO 123
TABELA 20 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO DE *Pichia stiptis* EM HIDROLISADOS DE EFB.....124
TABELA 21 - COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DO HIDROLISADO CONCENTRADO DE EFB COM ÁCIDO CLORIDRICO 126
TABELA 22 - COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DO HIDROLISADO CONCENTRADO DE EFB COM ÁCIDO SULFÚRICO 126
TABELA 23 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO COM VM/VF = 20% 132
TABELA 25 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO COM VM/VF = 80% 132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EFB	*Empty Fruit Bunches*
ART	Açúcar redutor total
CSC	Coeficientes de severidade combinado
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HMF	5 – Hidroximetilfurfural
HPLC	High performance liquid chromatography
MHdCL	Meio hidrolisado com ácido clorídrico
MHdSO4	Meio hidrolisado com ácido sulfúrico
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PNPB	Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel
TAPPI	*Technical Association for the Pulp, Paper and converting Industry*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVOS 21
2.1 OBJETIVO GERAL 21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21
CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA 22
1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 23
2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 23
2.1 CELULOSE 24
2.2 HEMICELULOSE 25
2.3 LIGNINA 26
3 PALMA OLEAGINOSA 27
4 TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO 29
4.1 PRÉ- TRATAMENTO FÍSICO 31
4.2 PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO 31
5 COMPOSTOS INIBIDORES LIBERADOS DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO 33
5.1 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA DETOXIFICAR OS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS 35
6 PRODUÇÃO DE ETANOL DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA 36
CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DA FOLHA E CACHOS VAZIOS (EFB) DA PALMA OLEAGINOSA (*ELAEIS GUINEENSIS*) 39
1 INTRODUÇÃO 41
2 MATERIAIS E MÉTODOS 42
2.1 MATERIAL 42
2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS 43
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS 43
2.3.1 Determinação do teor de umidade (Método 1) 43
2.3.2 Determinação do teor percentual de cinzas (Método 2) 44

2.3.3 Determinação do teor de extrativos (Método 3) 44
2.3.4 Determinação do teor lipídios (Método 4) 45
2.3.5 Método de Klason (Método 5) 45
2.3.5.1 Determinação do teor de lignina (Método 5a) 45
2.3.5.2 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose (Método 5b) 46
2.3.6 Método Van Soest (Método 6) 47
2.3.7 Método de Holocelulose (Método 7) 48
2.3.7.1 Determinação do teor de holocelulose (Método 7a) 48
2.3.7.2 Determinação do teor α- celulose (Método 7b) 49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E CACHOS VAZIOS (EFB) DE PALMA 50
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIGNOCELULÓSICA 52
3.2.1 Avaliação de Metodologias 52
3.3 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E LIGNOCELULÓSICA DAS FRAÇÕES DA FOLHA (FOLÍOLO E PECÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA 55
4 CONCLUSÃO 58
CAPÍTULO III: HIDRÓLISE ÁCIDA EM CONDIÇÕES BRANDAS PARA PARTES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E CACHOS VAZIOS (EFB) DA PALMA OLEAGINOSA (*ELAEIS GUINEENSIS*) 59
1 INTRODUÇÃO 61
2 MATERIAIS E MÉTODOS 63
2.1 MATERIAL 63
2.2 PROCESSO DE HIDRÓLISE 63
2.2.1 Avaliação das variáveis que influenciam o processo 65
2.2.2 Determinação do Coeficiente de Severidade Combinado (CSC) 65
2.3 ESTIMATIVA DOS CUSTOS DE PRÉ-TRATAMENTO 66
2.3.1 Estimativa do Custo com Catalisador (ECc) 66
2.3.2 Estimativa do Custo com Energia(ECE) 66
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES 67
3.1 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO 67

3.1.1 Pré-tratamento dos Cachos Vazios da palma (EFB) 68
3.1.1.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento de EFB com ácido clorídrico 72
3.1.1.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento de EFB com ácido sulfúrico 75
3.1.2 Pré-tratamento da fração da folha – Pecíolo 79
3.1.2.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré-tratamento da fração da folha (Pecíolo) com ácido clorídrico 83
3.1.2.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (ºC) e concentração do ácido, no pré-tratamento da fração da folha (Pecíolo) com ácido sulfúrico 86
3.1.3 Pré-tratamento da fração da folha – Folíolo 89
3.1.3.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (ºC) e concentração do ácido, no pré tratamento com ácido clorídrico para a fração da folha (Folíolo) 92
3.1.3.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento com ácido sulfúrico para fração da folha (Folíolo) 95
3.2 ESTIMATIVA DOS CUSTOS DE PRÉ-TRATAMENTO 97
3.2.1 Estimativa dos custos para os planejamento com a fração de EFB 98
3.2.2 Estimativa dos custos para os planejamento com a fração de Pecíolo 99
3.2.3 Estimativa dos custos para os planejamento com a fração do Folíolo 100
3.3 COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISES ÁCIDAS PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA 101
4 CONCLUSÃO 102
5 SUGESTÕES 104
CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSES 105
1 INTRODUÇÃO 107
2 MATERIAIS E MÉTODOS 108
2.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE FONTES NATURAIS .. 108
2.1.1 Coleta de Amostras 108
2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS 109
2.2.1 Isolamento 109

2.2.2 Purificação e Conservação das colônias isoladas 109
2.3 HABILIDADE EM ASSIMILAR E FERMENTAR PENTOSES 110
2.3.1 Preparo do pré-inóculo 110
2.3.2 Preparo dos meios de fermentação 110
2.3.2.1 Meio sintético 110
2.3.2.2 Meio com Hidrolisados de EFB 110
2.3.3 Avaliação da habilidade de crescer e fermentar a xilose 111
2.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ETANOL 111
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 111
3.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS 111
3.2 HABILIDADE EM ASSIMILAR E FERMENTAR FONTES DE CARBONO. 114
3.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ETANOL 116
4 CONCLUSÃO 117
5 SUGESTÕES 117
CAPÍTULO V: FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB 118
1 INTRODUÇÃO 120
2 MATERIAIS E MÉTODOS 121
2.1 PREPARO DOS HIDROLISADOS ÁCIDOS 121
2.2 MICROORGANISMO 121
2.3 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HIDROLISADO NA PREPARAÇÃO DE INÓCULOS 122
2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB COM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES 123
2.5 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO VM/VF NA PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO. 124
2.6 ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB 125

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 127
3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *PICHIA STIPITIS* Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB 127
3.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB COM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES 129
3.3 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO VM/VF NA PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO. 132
3.4 ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *PICHIA STIPTIS* NRRL Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB 135
4 CONCLUSÃO 138
REFERÊNCIAS 139

1 INTRODUÇÃO

A iminente crise energética e os crescentes preços do petróleo bruto estão forçando a indústria química encontrar matérias-primas alternativas para a fabricação de produtos químicos básicos. Neste contexto o reaproveitamento de resíduos de processos industriais tem mostrado um grande potencial, como alternativa para a geração de produtos que originalmente eram derivados de petróleo. Estes resíduos são formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina os quais por processos de tratamentos adequados podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado.

Através de pré-tratamentos adequados esses resíduos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol, como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial por combustíveis.

No processo de pré-tratamento, além de açúcares, são formados produtos de degradação de açúcares, tais como: como furano, ácidos fracos, além de compostos fenólicos derivados da degradação da lignina, e todos estes compostos em maior ou menor quantidade são considerados inibidores em processos fermentativos. Nesse sentido, um dos principais gargalos que envolvem a produção de etanol de resíduo lignocelulósico é desestruturar a parede da célula vegetal liberando os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis com baixa carga de compostos inibidores de forma eficiente e economicamente viável. O uso de microrganismos que fermentem os açúcares da fração hemicelulósica e que suportem a carga de compostos tóxicos no hidrolisado é a chave do sucesso para eficiente produção de etanol.

A levedura *Pichia stipitis*, vem sendo largamente utilizada para a fermentação de pentoses, entretanto é muito sensível aos compostos formados nos hidrolisados. Diferentes estratégias para superar o efeito de inibição dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados vêm sendo avaliados, principalmente a utilização de métodos de destoxificação e estratégias de adaptação do microrganismo aos meios hidrolisados, tornando-os mais resistentes e tolerantes aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado.

O isolamento de microrganismos de diferentes biomas também vem sendo estudado na tentativa de se isolar microrganismos que tenham habilidade de fermentar e assimilar os açúcares dos hidrolisados, assim como ser tolerante a carga de inibidores presente.

Dentro desse contexto, resíduos da produção do óleo de dendê da palma (*Elaeis guineensis*) tem se destacado como fonte energética. No Brasil, a maior produção de óleo de dendê se concentra no Pará, gerando grandes volumes de resíduos sólidos, como tronco, caule e cachos vazios de palma (EFB), os quais apresentam grande potencial para produção de etanol celulósico.

Com a perspectiva de um aumento da produção de óleo de palma de dendê e consequentemente um aumento no volume do resíduo, a divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR em parceria com a Empresa Vale S.A., desenvolveu um projeto para o aproveitamento de resíduos da palma, agregando valor aos subprodutos formados durante o seu processamento.

Este projeto, intitulado "BIOPAL – Biorefinarias Integradas ao Processamento Sustentável da Palma - Subprojeto Rota Biológica", visa o reaproveitamento dos resíduos do processamento da palma em um processo integrado com a aplicação do conceito de biorrefinaria.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a composição lignocelulósica dos resíduos da palma (folha e EFB) para o maior reaproveitamento da fração hemicelulósica, através da otimização das condições brandas de temperatura, tempo e concentração de catalisador ácido no pré-tratamento do resíduo, visando à produção de etanol, através do uso de leveduras isoladas de diferentes biomas brasileiros e de *Pichia stipitis* adaptada aos meios hidrolisados de EFB.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi avaliar as condições de pré-tratamento ácido-térmico das frações do resíduo do processamento da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*) (folha e cachos vazios (EFB)) para recuperação dos açucares da fração hemicelulósica e posterior fermentação destes açúcares para a produção de etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar as frações do resíduo do processamento da palma de dendê (folha e cachos vazios (EFB)) cedidas pela empresa Biopalma/Vale do estado do Pará, para avaliar a fração com maior potencial para a produção de biocombustível de segunda geração;
b) Determinar a melhor condição do processo de pré-tratamento térmico com ácido clorídrico e sulfúrico, para as frações do resíduo do processamento da palma, utilizando condições brandas de temperatura, tempo e concentração de ácido (%v/v).
c) Adaptar a levedura *Pichia stipitis* nos hidrolisados ácidos de EFB;
d) Isolar leveduras fermentadoras de pentose, mais especificamente fermentadora dos hidrolisados hemicelulósicos de EFB;
e) Avaliar as melhores condições para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de EFB com a levedura *Pichia stipitis*.

CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Material lignocelulósico é um termo genérico para descrever os principais constituintes na maioria dos vegetais, representando a fração mais expressiva da biomassa vegetal. São constituídos por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que juntos, perfazem mais de 50% da massa seca total, com o restante constituído praticamente de cinza e extrativo (BALAT, 2011).

Devido a sua constituição rica em carboidratos, o material lignocelulósico é reconhecido como a maior fonte de energia renovável disponível em todo o mundo (ZHANG et al., 2012). A partir de material lignocelulósico, é possível produzir biocombustíveis por via de tecnologias bioquímicas e/ ou termoquímicos, tornando se cada vez mais um importante complemento aos combustíveis à base de petróleo devido aos seus benefícios econômicos e ambientais (LU et al., 2010).

As maiores fontes de biomassa são os resíduos agroindustriais, que anualmente, são gerados mais de 40 milhões de toneladas, provocando considerável prejuízo às atividades econômicas do setor agroindustrial e ao meio ambiente (LIMAYEM; RICKE, 2012). A total utilização destes resíduos, esbarram na recalcitrância deste material para a utilização eficiente de todas as frações das matérias-primas, especialmente, a celulose, hemicelulose e lignina.

2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

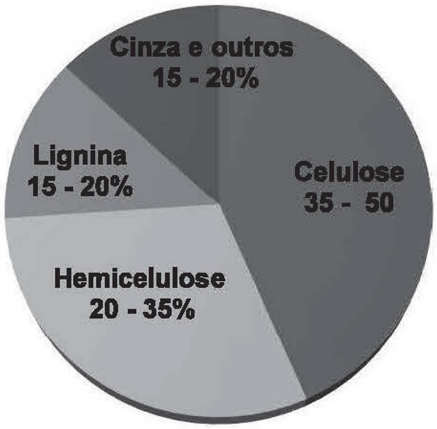
A estrutura lignocelulósica é encontrada na parede celular dos vegetais, a qual é composta por fibras de carboidratos (celulose e hemicelulose) ligadas por uma estrutura fenólica complexa denominada lignina, formando a microfibrila celulósica.

De modo geral, as três frações orgânicas mais representativas na biomassa lignocelulósica, em base de porcentagem de peso seco são: 35% a 50% de celulose, 20% a 35% de hemicelulose e 15% a 20% de lignina, que correspondem em média a 90% da matéria (Figura 1).

Além dos três principais componentes, a parede celular da biomassa apresenta outros constituintes, em menor proporção que podem ser classificados como extrativos (ácido graxos, resinas, taninos, etc) e não extativos (sílica,

oxalatos, carbonatos, etc) que variam suas composições de acordo com cada tipo de material (PENG et al., 2012). A composição química dos materiais lignocelulósicos é um dos primeiros fatores a serem avaliados, pois afeta diretamente a eficiência da produção de biocombustíveis, durante processos de conversão (BALAT, 2011).

FIGURA 1 - COMPOSIÇÃO GERAL DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

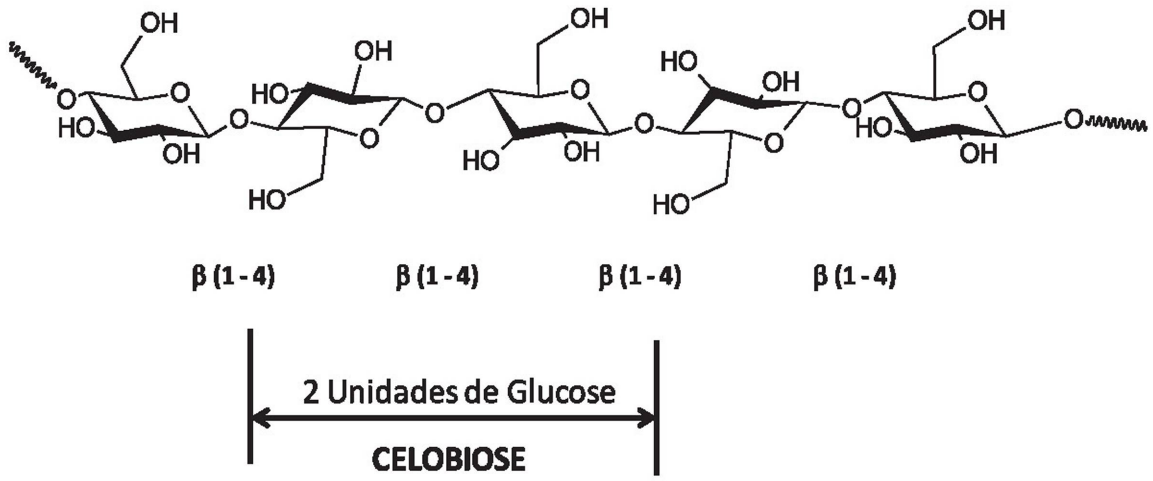


FONTE: Adaptado de HAGHIGHI MOOD et al (2013)

2.1 CELULOSE

A celulose, é o constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glucose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1→4), apresentando um grau de polimerização de até 10.000 (Figura 2). Ao contrário do amido, cuja função biológica é de armazenamento de energia facilmente recuperável, a celulose possui uma função estrutural e sua principal característica biológica é a resistência à degradação.

FIGURA 2- ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DA CELULOSE



FONTE: Adaptado de FENGEL; WEGENER (1984).

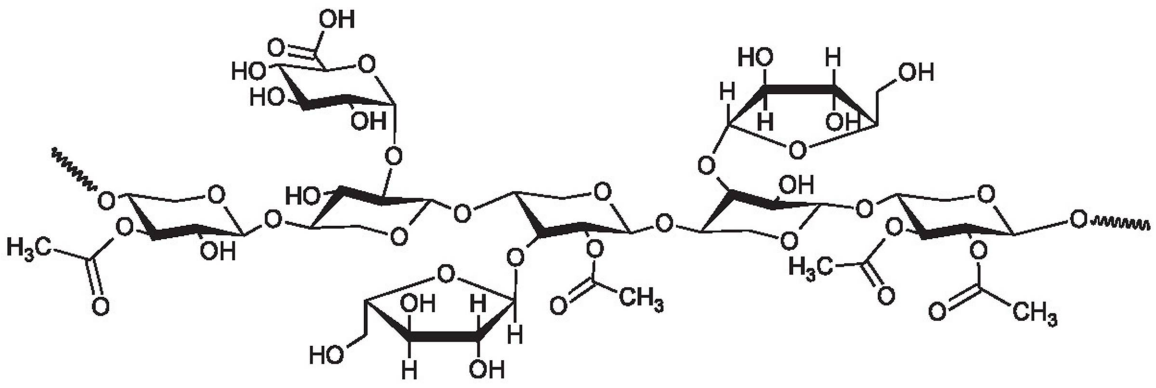
2.2 HEMICELULOSE

As hemiceluloses são heteropolíssacarídeos formados, por uma estrutura complexa, constituída principalmente de pentoses (β-D-xilose, α-L-arabinose), hexoses (β-D-manose, β-D-glucose e α-D-galactose), ácidos urônicos e desoxi açúcares parcialmente acetilados (Figura 3), a porcentagem destes açúcares dependem da origem da hemicelulose. A presença de α-L-ramnose e α-L-fucose também podem estar presentes em menores quantidades (GÍRIO et al., 2010).

As hemiceluloses são normalmente ligadas a outros componentes da parede celular tais como celulose, proteína, lignina e compostos fenólicos por ligações covalentes, ligações de hidrogênio, e por interações iônicas e hidrofóbicas (PENG et al., 2012).

Diferentes estruturas de hemicelulose podem ser encontradas, dependendo da espécie e da origem biológica da biomassa (OTIENO; AHRING, 2012). As hemiceluloses mais relevantes e de maior representatividade são as xilanas (BIAN et al., 2012).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA PARCIAL DA HEMICELULOSE – XILANA



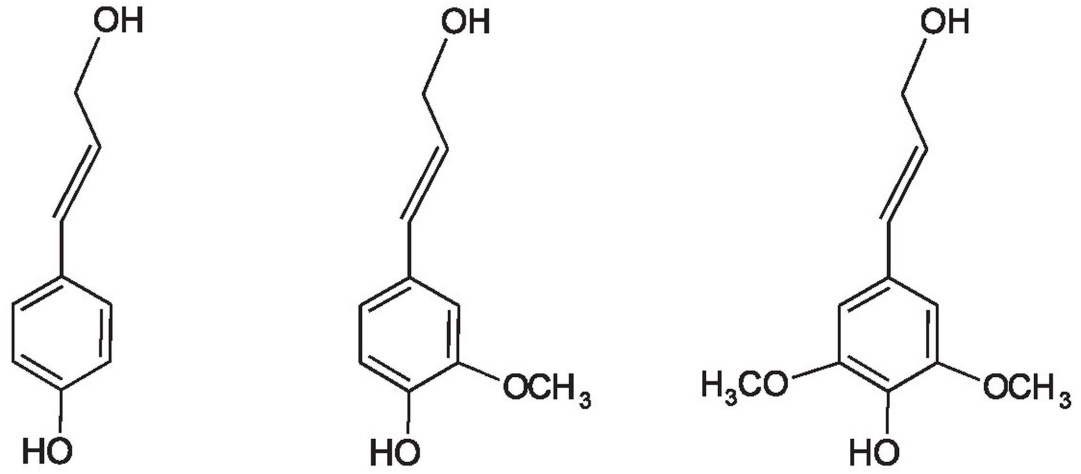
FONTE: Adaptado de FENGEL; WEGENER (1984)

2.3 LIGNINA

A lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (Figura 4). Constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (SÁNCHEZ, 2009; SANTOS et al., 2013).

Dependendo da proporção dos alcoóis na formação da lignina, elas são consideradas: p-hidroxifenila (H) com maior porcentagem de álcool cumarílico, guaiacila (G) com maior porcentagem de álcool coniferílico ou siringila (S) com maior porcentagem de álcool sinapílico. A composição estrutural da lignina, em particular o teor de unidades de siringil (S), guaiacil (L) e p-hidroxifenil (H), é uma característica importante para a utilização de biomassa lignocelulósica (TIMILSENA et al., 2013).

FIGURA 4 - ESTRUTURAS PRECURSORES DA LIGNINA



Álcool p- cumarílico (H) | Álcool coniferílico (G) | Álcool Sinapílico (S)

FONTE: O autor (2016)

3 PALMA OLEAGINOSA

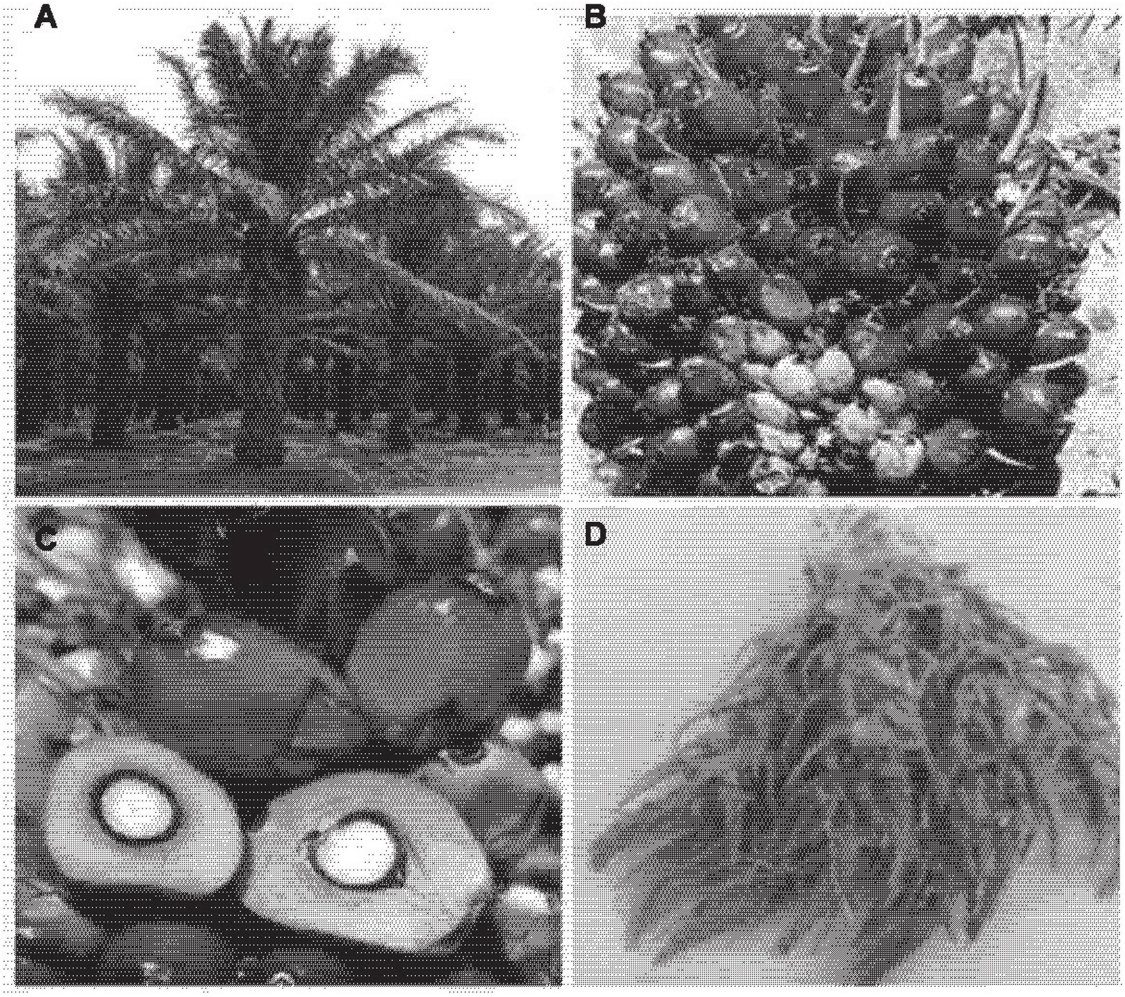
A palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*) é uma palmeira originária da África e conhecida no Brasil como dendezeiro. A palma é uma planta perene, de grande porte, adaptada a regiões tropicais (clima quente e úmido), sendo cultivada em mais de 15 milhões de hectares ao redor do mundo. Dentre os países mais produtores estão à Indonésia e a Malásia (SILALERTRUKSA; BONNET; GHEEWALA, 2012; SULAIMAN et al., 2011). No Brasil, a palma é produzida principalmente na região Norte e Nordeste, por apresentar as condições ideais para o seu crescimento, sendo o estado do Pará um dos maiores produtores. Com as práticas adotadas no seu cultivo, constitui-se em um sistema de produção agroindustrial, com aceitável estabilidade ecológica e de baixos impactos ao meio ambiente (NG et al., 2012).

A plantação de palma de dendê é uma das culturas mais eficientes em termos de utilização da terra e produtividade. A palma produz em média de 3,68 toneladas de óleo/ha/ano (SUMATHI; CHAI; MOHAMED, 2008), sendo que um único hectare produz até 10 vezes mais óleo do que outras oleaginosas, como soja, semente de girassol, canola (colza).

Em geral, a palma começa a frutificar após 2,5 anos de plantada e a sua produtividade torna-se menor após 20 e 25 anos, sendo necessário o replantio de novas mudas para manutenção da produtividade de óleo (JUNG et al., 2011).

As palmeiras são cultivadas principalmente para a extração do óleo comestível dos frutos, o qual é amplamente utilizado na indústria alimentar em todo o mundo (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). A figura 5, apresenta a palma e suas diversas formas.

FIGURA 5 - PALMA OLEAGINOSA.



FONTE: CAMPIONI, (2014)
NOTA: A- Plantação De Palma Oleaginosa; B - Cachos De Palma Oleaginosa Contendo Os Frutos; C -Frutos; D - Cachos Vazios Após Extração Dos Fruto.

Durante os processos de poda, colheita e manutenção da plantação são geradas grandes quantidades de resíduos da folha, do tronco, além dos cachos vazios (EFBs). Os EFBs são provenientes do processo de beneficiamento dos frutos para a extração do óleo de palma, do inglês *Empty Fruit Bunches*.

Essas biomassas apresentam um elevado potencial para transformar-se em energia renovável. Cada tonelada de cacho processada gera em média 14% de fibras, 7% cascas, e 23% EFBs (KIM et al., 2012a). Estes resíduos apresentam alto potencial para a produção de bioetanol, pois são constituídos de 50% a 70% de celulose e hemicelulose, respectivamente (GOH; TAN; LEE, 2012; JUNG et al., 2011; RAMAN; GNANSOUNOU, 2014).

Atualmente os subprodutos do processo de obtenção do óleo de palma ainda não possuem um destino eficiente. Estes resíduos são considerados de baixo valor comercial e como são gerados em grandes quantidades acaba sendo um problema para as indústrias do beneficiamento de palma. Convencionalmente, a maior parte destes resíduos são queimados, disposto em aterros sanitários ou usados em compostagem para produção de adubo orgânico.

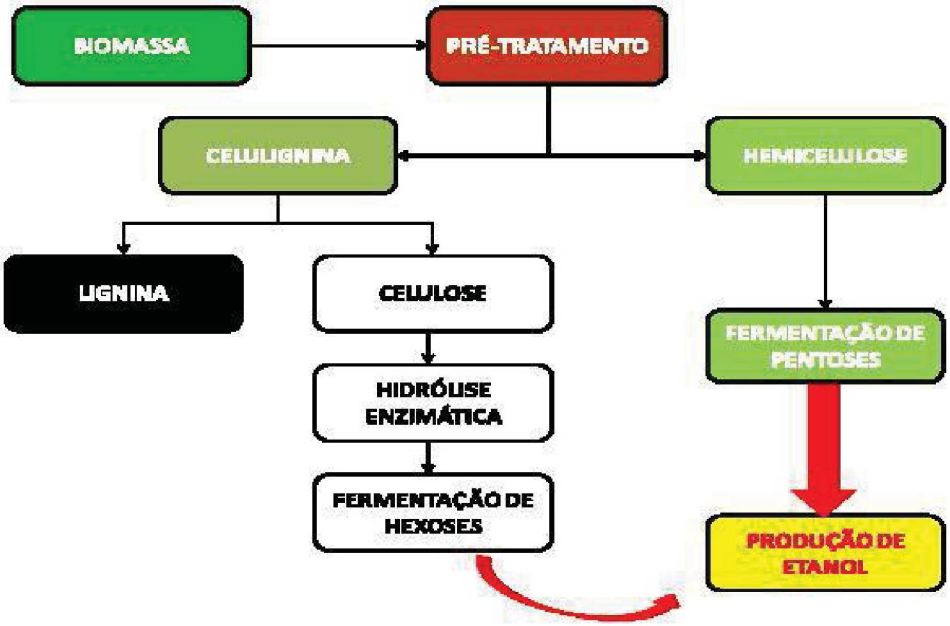
Portanto, novas metodologias para o uso sustentável desta biomassa lignocelulósica, incluindo a bioconversão em produto com valor agregado é de grande interesse (SUMATHI; CHAI; MOHAMED, 2008).

4 TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO

A recuperação de todas as partes da estrutura lignocelulósica é de grande importância para o estabelecimento de rotas de biorrefinaria, tornando o uso de destes resíduos uma atividade economicamente viável. Devido à estrutura recalcitrante do resíduo lignocelulósico, que impossibilita seu uso direto, é necessária a aplicação de pré-tratamentos, que modifiquem a estrutura (WANG et al., 2010), sendo o pré-tratamento uma etapa importante para superar a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (AYENI et al., 2013).

Desta forma, processos bioquímicos de produção de etanol de resíduos lignocelulósicos incluem várias etapas: (1) um pré-tratamento que melhora a acessibilidade à celulose, remove a lignina e libera pentoses e hexoses de hemicelulose, (2) um tratamento enzimático (ou ácido), que transforma a celulose em monômeros de glucose e (3) conversão dos açúcares (pentoses e hexoses), pelo processo de fermentação em etanol (BANERJEE et al., 2009; LIN et al., 2012) (Figura 6).

FIGURA 6 - PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA



FONTE: O autor (2016)

A eficiência dos pré-tratamentos deve ser avaliado do ponto de vista energético e químico. Segundo BINOD et al (2012), um processo de pré-tratamento adequado envolve basicamente várias etapas: melhorar a extração de açúcares; preservar os açúcares da hemicelulose; permitir alta digestibilidade da celulose, no caso de uma posterior hidrólise; produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que são considerados inibidores no processo fermentativo; ter uma baixa demanda energética; ter um baixo custo de capital e operacional.

A Figura 7 apresenta uma representação do que ocorre na estrutura do material lignocelulósico após o pré tratamento.

FIGURA 7 - ESQUEMA DE PRÉ TRATAMENTO DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO

FONTE: Adaptado de HAGHIGHI MOOD et al.(2013)

Um dos grandes desafios, para a conversão de resíduo lignocelulósico em etanol, é o alto custo do processo de pré-tratamento. Estima-se que de 20 - 30% do custo total previsto para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é proveniente do pré-tratamento (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Segundo BIAN et al. (2012) e LIMAYEM; RICKE (2012), o investimento mínimo de capital, empregado nos pré-tratamentos é um dos principais obstáculos, que impedem que biocombustível de resíduos lignocelulósico seja uma tecnologia promissora.

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Os principais métodos são baseados em processos físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes.

4.1 PRÉ- TRATAMENTO FÍSICO

Os pré-tratamentos físicos estão relacionados mais diretamente a secagem e a redução do tamanho das partículas através da moagem. A moagem tem um papel importante, uma vez que aumenta a área superficial e a acessibilidade do substrato aos processos de hidrólise (ALVIRA et al., 2010; KRISTIANI et al., 2013). Estes processos não são considerados atraentes devido ao seu alto custo energético (BEHERA et al., 2014; CHANDRA et al., 2007; LASER et al., 2002).

4.2 PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO

Os pré-tratamentos químicos são os mais utilizados, os principais métodos utilizam-se de agentes catalisadores, principalmente ácidos, alcalis e solventes orgânicos, combinados a temperatura e pressão, desestruturam as frações lignocelulósicas (PALAMAE et al., 2014). O tipo e as condições do pré-tratamento dependem da composição química e da espécie da biomassa, não sendo possível a pratica de um pré-tratamento único para qualquer tipo de biomassa (YUNUS et al., 2010). De acordo com GOH et al. (2011), independentemente do tipo de tratamento, três parâmetros principais tem efeitos

significativos, sendo: a temperatura de reação, o tempo de residência e a quantidade do agente catalítico.

A hidrólise ácida é um dos pré-tratamentos mais promissores e extensivamente estudados e empregados. Neste processo, as hemiceluloses são solubilizadas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos de pré-tratamento ácido contém principalmente pentoses na forma de xilose e arabinose. A eficiência da obtenção de xilose a partir da hidrólise da hemicelulose pode oscilar entre 75-90%, sendo este o principal monossacarídeo obtido; outros açúcares como glucose e arabinose são obtidos em menores quantidades (TAN et al., 2013). A quantidade de açúcar liberado durante a hidrólise, depende do tipo de condições do pré tratamento e do resíduo lignocelulósico (KIM et al., 2012b). Além dos açúcares, outros produtos secundários podem ser formados como, ácido acético, ácido fórmico e levulínico, derivados de furano como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos. Sendo estes compostos considerados inibidores nos processos de fermentação (CHANDEL et al., 2007; PANAGIOTOPOULOS et al., 2011).

O pré-tratamento com ácido pode ser realizado em meio diluído ou concentrado. Industrialmente, o uso de ácido diluído é mais atrativo uma vez hidrolisa parte da hemicelulose gerando menor quantidade de inibidores. Os principais ácido utilizados são H_2SO_4, HCl, HNO_3, H_3PO_4. Sendo o ácido sulfúrico um dos mais utilizados (CHEN; TU; SHEEN, 2011; PANAGIOTOPOULOS et al., 2011; RAHMAN et al., 2007; SAHA et al., 2005; ZHANG et al., 2012).

Processos alcalinos também podem ser utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, e sua principal vantagem está na remoção e desestruturação da lignina (FERNANDES et al., 2009). O tratamento alcalino, pode ser realizados utilizando Hidróxido de sódio (NaOH), Hidróxido de potássio (KOH), Hidróxido de cálcio ($Ca(OH_2)$ ou amônia. Estes agentes promovem o inchamento nas fibras, diminuindo a cristalinidade da celulose, consequentemente aumentando a porosidade da biomassa (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008; HAGHIGHI MOOD et al., 2013). As principais desvantagens de se utilizar pré-tratamento alcalino, está na desacetilação da hemicelulose, nos altos tempos de residência e no processo de neutralização do hidrolisado (KIM et al., 2012b). O uso de agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em pré-tratamento alcalino

geralmente aumenta o rendimento de remoção da lignina (CARVALHEIRO et al., 2005; GÍRIO et al., 2010).

Em muitos estudos o pré-tratamento alcalino é combinado com outro processo, como exemplo, pré-tratamento ácido. Neste caso, primeiramente a biomassa é tratada com ácido a qual remove a hemicelulose e em seguida a lignina é removida pelo tratamento básico (BENSAH; MENSAH, 2013; KIM; KIM, 2013). A combinação de métodos de pré-tratamento, tem sido promissor para aumentar a eficiência na produção de açúcares e consequentemente o rendimento de bioetanol, pela diminuição na formação de inibidores e no tempo de fermentação, os quais são fatores limitantes nos pré-tratamentos, tornando o processo mais econômico (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Vários métodos têm sido avaliados na literatura como: Líquidos iônicos (LI et al., 2010; SIDIK; NGADI; AMIN, 2013), Organosolv (BENSAH; MENSAH, 2013; HUSSIN et al., 2013; MESA et al., 2011), Amônia líquida (AFEX) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; LEE; JAMEEL; VENDITTI, 2010), Água quente (GOH; TAN; LEE, 2012; KIM et al., 2012a; LASER et al., 2002), Organosolv e explosão a vapor (MEDINA et al., 2015; ZHANG; FU; CHEN, 2012). A escolha do pré-tratamento depende muito da fração lignocelulósica de interesse.

Várias pesquisas (CAMPIONI, 2014; CHANDRA et al., 2007; KRISTENSEN et al., 2007) vêm sendo desenvolvidas visando melhorar as condições do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para uma eficiente conversão a etanol

5 COMPOSTOS INIBIDORES LIBERADOS DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO

No processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, ocorre a desorganização da estrutura cristalina das fibras destes materiais, expondo as cadeias de celulose e hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A maioria destes processos promovem a formação de produtos secundários, seja da desacetilação da hemicelulose, com formação de ácido acético ou da degradação dos açúcares formados, pentoses e hexoses, formando Furfural, 5-Hidroximetilfurfural, respectivamente, além de produtos da degradação da lignina

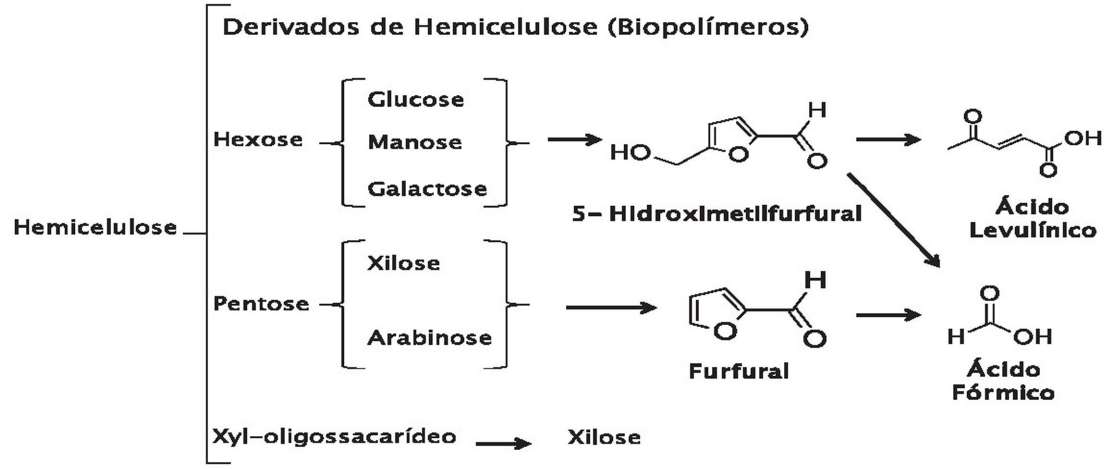
e dos próprios produto formados. (HEREDIA-OLEA; PÉREZ-CARRILLO; SERNA-SALDÍVAR, 2012).

De modo geral as quantidades e os tipos de produtos secundários formados no pré-tratamento variam conforme a matéria-prima e as condições de hidrólise utilizadas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TOQUERO; BOLADO, 2014).

Muitos trabalhos relatam que a formação de compostoso secundários, especialmente furfural e hidroximetilfurfural por desidratação das pentoses e hexoses, durante o processo de pré-tratamento, inibe a ação dos microrganismos fermentativos, principalmente em processos que utilizam ácido mineral diluído (LIU et al., 2013). Estes compostos são considerados inibidores, pois podem interferir no metabolismo microbiano, reduzindo ou até mesmo impedindo o crescimento celular, o consumo de substrato e a formação de produto (TOQUERO; BOLADO, 2014).

Os compostos inibidores gerados a partir da degradação da hemicelulose, durante o pré-tratamento apresentam diferentes origens, sendo principalmente gerados da degradação de açúcares, como os furanos, e estes decompostos em ácidos (fórmico e levulínico), da degradação da lignina como os compostos fenólicos além dos liberados durante o pré-tratamento como o ácido acético, extrativos e íons (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). A Figura 8, apresenta os principais produtos formados da hemicelulose no processo de pré-tratamento.

FIGURA 8 - PRINCIPAIS PRODUTOS GERADOS DURANTE O PROCESSO DE FRACIONAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS



FONTE: Adaptado de PENG et al. (2012).

Os efeitos de inibição destes compostos são atribuídos a dois diferentes mecanismos. O primeiro mecanismo está ligado à interferência no balanço redox

de cofatores devido à alta demanda de NADH necessária para que o microrganismo possa reduzir os furanos a suas formas alcoólicas, as quais apresentam menor efeito inibidor (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O segundo mecanismo é atribuído a inibição direta de algumas enzimas, levando a reduções na atividade, resultando em um efeito de inibição do bioprocesso (SINGLA et al., 2012). A presença de furanos pode interferir no crescimento celular, resultando em longas fases de latência, prejudicando a produtividade dos processos de bioconversão (PANAGIOTOPOULOS et al., 2011).

Os ácidos carboxílicos são outro grupo de compostos resultantes do fracionamento dos materiais lignocelulósicos que podem prejudicar processos de bioconversão (SILVA et al., 2004). A formação de ácido acético está diretamente relacionada à liberação dos grupos acetil da hemicelulose durante a etapa de pré-tratamento, enquanto que a formação de ácido fórmico e ácido levulínico resultam da degradação de furanos como HMF.

Os compostos fenólicos têm sua origem na solubilização e na clivagem hidrolítica ou oxidativa da estrutura da lignina (TRAVAINI et al., 2013). Outros compostos resultantes da fração de extrativos como resinas ácidas, ácidos tanínicos e terpenos, além de íons metálicos resultantes da corrosão do próprio equipamento de hidrólise, também estão presentes em hidrolisados, podendo muitos destes compostos atuar como agentes inibidores do metabolismo microbiano (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

De acordo com SUN; CHENG (2002) o pré-tratamento deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de subprodutos inibidores para posterior hidrólise e fermentação.

5.1 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA DETOXIFICAR OS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS

Um dos principais obstáculos na fermentação dos hidrolisado de hemicelulose, está relacionado à presença de inibidores (LIN et al., 2012). Os compostos inibidores formados durante o fracionamento dos materiais lignocelulósicos interferem negativamente sobre os processos fermentativos devido aos seus efeitos de inibição sobre o metabolismo microbiano, limitando o

crescimento celular e consequentemente reduzindo a produção de etanol. (GUPTA; MEHTA; CHANDER KUHAD, 2012)

Vários tratamentos físico-químicos de destoxificação têm sido utilizados com o objetivo de minimizar o efeito tóxico dos hidrolisados sobre a fermentação tanto pela transformação dos inibidores em compostos inativos quanto pela sua remoção (CAVKA; JÖNSSON, 2013). Dentre os diversos tratamentos utilizados para minimizar a concentração dos inibidores, a neutralização, a adsorção com carvão ativo e o uso de resinas de troca iônica são os mais empregados (YE et al., 2014). A concentração do hidrolisado por processo de evaporação a vácuo à baixa pressão, reduz as concentrações de compostos tóxicos voláteis como ácido acético e furfural (FERRER et al., 2013). Infelizmente, estas abordagens aumentam consideravelmente os custos do processo.

O processo de destoxificação pode ser evitado, selecionando uma estirpe microbiana que seja resistente à alta concentração de inibidores, simplificando o processo e reduzindo o custo de produção (HUANG et al., 2009). A obtenção de cepas de microrganismos resistentes aos compostos tóxicos em hidrolisados hemicelulósicos pode ser obtida pela adaptação da cepa em estudo, em cultivos sucessivos em concentrações crescentes do meio. Atualmente, vem demonstrando ser um método eficaz para aumentar a tolerância aos inibidores de uma vasta gama de leveduras em hidrolisados lignocelulósicos (ZHANG; FU; CHEN, 2012).

Portanto, a destoxificação do hidrolisado lignocelulósico ou a utilização de um microorganismo tolerante ao inibidor é geralmente necessária para o sucesso do processo de fermentação do hidrolisado (BELLIDO et al., 2011; HUANG et al., 2009; PALMQVIST; HÄHN-HÄGERDAL, 2000).

6 PRODUÇÃO DE ETANOL DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA

As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses que por hidrólise liberam pentoses, principalmente xilose, como principal açúcar. Entretanto, os carboidratos oriundos das pentoses (xilose e arabinose) não são diretamente fermentescíveis por leveduras industriais como a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a biotransformação destas pentoses a etanol um dos desafios

mais importantes a ser resolvido no âmbito científico e tecnológico (SILVA et al., 2012).

Para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, o microrganismo ideal deve ser capaz de metabolizar pentoses e hexoses (SUN; CHENG, 2002).

Diversos microrganismos podem ser utilizados para fermentar pentoses, sendo as leveduras as mais capacitadas. Dentre as principais espécies de leveduras que fermentam xilose, pode-se citar a *Pichia stipitis* (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; DUBEY et al., 2012); *Candida shehatae* (CHANDEL et al., 2007; GUAN et al., 2013); *Pachysolen tannophilus* (SHUPE; LIU, 2012; TOIVOLA; YARROW; VAN DEN BOSCH, 1984); *Kluyveromyces marxianus, Candida guilliermondii,* entre outras citadas na literatura (SILVA et al., 2012; SINGLA et al., 2012; SKOOG et al., 1988).

Dentre as bactérias a *Zymomona mobilis* é a mais utilizada para a produção de etanol por pentoses, embora apresentem baixos rendimentos (HUANG et al., 2009; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Entre as leveduras fermentadoras de pentose, *Pichia stipitis* é considerada o microrganismo mais promissor para a fermentação de hidrolisados de hemicelulose, uma vez que é capaz de fermentar xilose e hexoses a etanol com elevados rendimentos (LIN et al., 2012), porém o desempenho é muito limitado. O metabolismo das pentoses exige a presença de níveis mínimos de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado e apresenta baixa tolerância ao etanol e aos ácidos alifáticos (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996)

Alguns fatores são extremamente importantes para a eficiente fermentação da fração hemicelulósica por leveduras em especial *Pichia stipitis*, e devem ser avaliados em um processo fermentativo. Entre os principais fatores podemos considerar: (1) **Concentração do substrato**, dependendo das concentrações iniciais de xilose, pode favorecer a formação de outros compostos secundários ou inibir o crescimento das leveduras (SINGLA et al., 2012). (2) **Baixa tolerância a etanol**, que está condicionada a diferentes tipos de leveduras, sendo também influenciada pelas condições de cultivo. Sob condições anaeróbicas, a levedura *Pichia stipitis* é extremamente sensível a concentrações de etanol (JEFFRIES; JIN, 2000). (3) **Concentração de glucose**, uma vez que é um substrato preferencial sobre xilose, quando da presença de ambos os açúcares

no mesmo meio, é consumida mais rapidamente. Quando utilizada, em concentrações limitadas no inicio da fermentação, melhora a produtividade de etanol (AGBOGBO et al., 2006; SINGLA et al., 2012). Na literatura, a maioria dos estudos tem conduzido fermentações com uma taxa glucose/xilose, 1:5 ou 1:6. (4) **Composição nutricional do meio**, pode afetar fortemente a eficiência de conversão de xilose a etanol por *Pichia stipitis,* visto que estes componentes estão diretamente relacionados com a eficiência de biossíntese, preservação e manutenção celular, e balanço redox de cofatores (CARNEIRO, 2011; SLININGER et al., 2006). De acordo com SILVA et al. (2012), na ausência de determinadas fontes a levedura pode consumir a fonte de carbono apenas para o crescimento. (5) **Aeração** é relatada como um dos fatores primordiais na conversão de xilose a etanol, pois diferentemente de outras fermentações, as leveduras fermentadoras de xilose necessitam de aeração controlada para manter a viabilidade celular e o balanço de NADH (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SILVA et al., 2012).

Segundo AGBOGBO et al. (2006) e DU PREEZ; BOSCH; PRIOR. (1986) outros fatores como pH, temperatura e agitação também devem ser avaliados para maior eficiência do processo.

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DA FOLHA E CACHOS VAZIOS (EFB) DA PALMA OLEAGINOSA (*Elaeis guineensis*)

RESUMO

A caracterização das diferentes partes da Palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*) provenientes da produção do óleo de dendê no Pará (Brasil) foi conduzida, com o intuito de se determinar as características dos resíduos com potencial para a produção de biocombustível de segunda geração. A caracterização é importante, pois a composição da biomassa pode variar devido a diversos fatores como tipo, idade, condições climáticas de desenvolvimento da planta, assim como o tempo após extração e das condições de armazenamento. Neste capítulo, folha (separada em folíolo e pecíolo) e cachos vazios da palma (EFB) foram analisados quanto à umidade, cinzas, extraíveis, lipídios e a fração dos compostos lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina). Os resíduos primeiramente passaram por processos físicos como secagem e moagem, para classificação das partículas com granulometria entre 0,35 e 0,85mm. Observou-se que há grandes variações na composição das três partes (folíolo, pecíolo e EFB), sendo a maior diferença observada pela fração do folíolo que possui alta porcentagem de lignina (40,55%), mas baixa porcentagem de hemicelulose (12,55%) e celulose (19,6%), quando comparada as demais frações da palma oleaginosa. As frações do Pecíolo e EFB apresentaram composições mais semelhantes, com porcentagem de celulose em torno de 35% e hemicelulose em torno de 25%. Com os resultados da caracterização verifica-se que os resíduos possuem diferentes potenciais para serem utilizados como resíduos em processos de biorrefinaria, sendo a fração do Peciolo e EFB mais direcionados a produção bioetanol de segunda geração pois apresentam alto percentual (60 - 63%) de celulose e hemicelulose, sendo a fração do folíolo mais indicada para o reaproveitamento de lignina.

Palavras-chave: Palma (*Elaeis guineensis*). Composição lignocelulósica. Bioetanol.

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para o crescimento econômico mundial, é viabilizar a utilização de recursos alternativos, como os resíduos lignocelulósicos, para a produção biocombustíveis, diminuindo os impactos ambientais causados pela grande geração destes resíduos em processamento agro-industrial.

Nesta busca, biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma das maiores fontes de energia renovável disponível em todo o mundo (WIJAYA et al., 2014). Uma das biomassas que tem sido foco de grande pesquisa é o resíduo da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*), gerada no processo de extração de óleo de palma (óleo de dendê). Estima-se que anualmente, aproximadamente 50 milhões de tonelada de resíduos lignocelulósicos são gerados na Indonésia e Malásia pelas indústrias de processamento da palma (RAHMAN et al., 2007; TAN et al., 2013). Estes resíduos da palma constituem uma enorme fonte de biomassa que requer eficiente valorização. Este resíduo, tradicionalmente é incinerado para a produção de energia nos processos industriais e as cinzas obtidas utilizadas como fertilizantes. Estas práticas causam problemas de poluição ambiental, principalmente com emissão de gases poluentes (BAHARUDDIN et al., 2009; MOHAMMED et al., 2012).

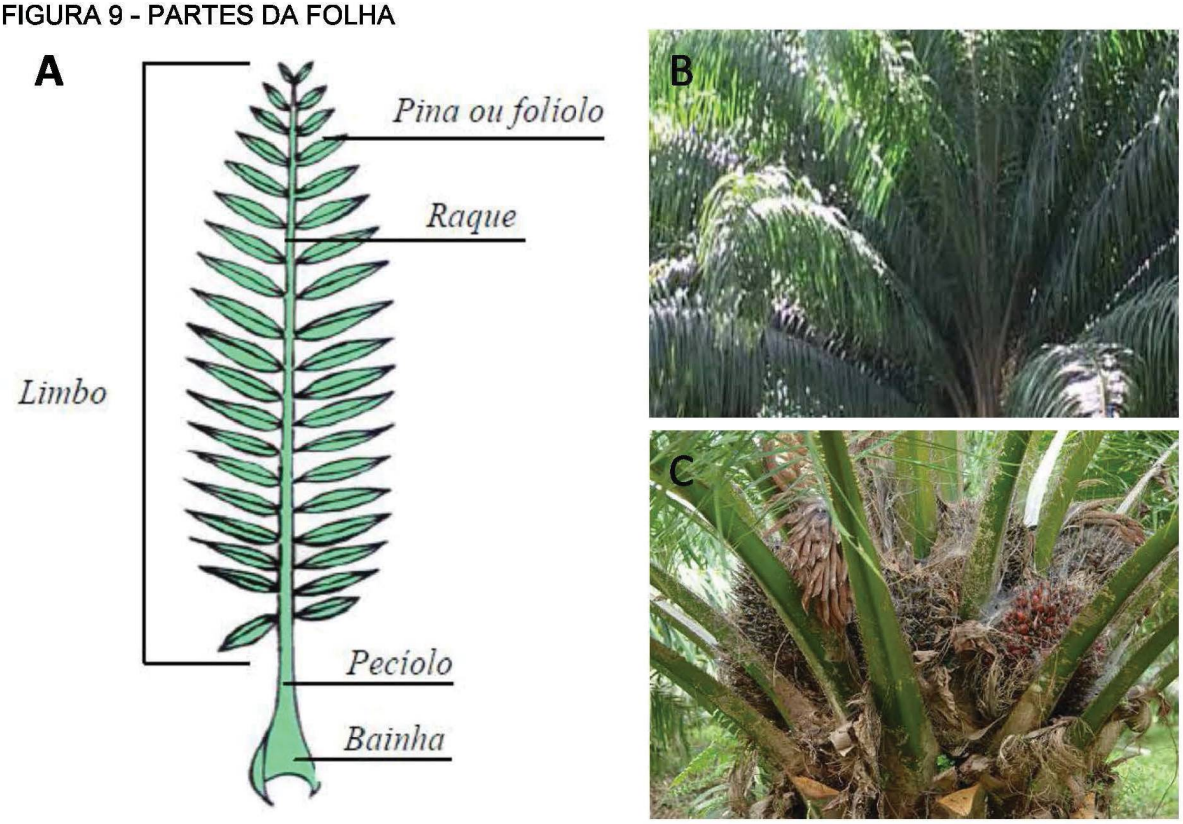
No Brasil, a produção de palma oleaginosa é concentrada na região Norte, mais especificamente no Pará, onde a produção até 2010 era de 112,5 mil hectares plantados, estimando-se a elevar esta produção para 31,8 milhões de hectares com o Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB).

Da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*), fibras lignocelulósicas podem ser extraídas do tronco, da folha e dos cachos vazios (EFB). Para o reaproveitamento de todas as partes da planta, é necessário o conhecimento da composição química de cada parte. A composição do resíduo lignocelulósico depende não apenas do tipo de vegetal, mas também da parte da planta escolhida, das condições de crescimento e da idade de colheita (OGEDA, 2010).

A distribuição da celulose, hemiceluloses e lignina bem como os conteúdos dos diferentes açúcares da hemicelulose e precursores da lignina variam significantemente entre as diferentes biomassas (KRISTENSEN et al., 2007), e entre as partes que constituem a biomassa como caule, galhos, raízes, cascas e frutos (PENG et al., 2012).

No caso das folhas, estas podem ser separadas em duas partes o folíolo,e pecíolo (Figura 9). O folíolo compreende as subdivisões das folhas da palma, e o pecíolo é a haste que prende a folha ao caule e ao ramo. A parte mais dilatada do pecíolo é chamada de bainha por onde a folha se prende no caule.

FIGURA 9 - PARTES DA FOLHA



FONTE: Adaptado de VIDAL; VIDAL (2000)
Nota: A - Desenho Esquemático Das Partes Que Compõem As Folhas; B- Folhas Da Palma (Folíolos); C- Base Da Folha Da Palma (Pecíolo E Bainha).

O total reaproveitamento de todas as partes da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*), a torna uma biomassa de alto potencial para a bioconversão desse resíduos no conceito de biorefinaria.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os resíduos lignocelulósicos da palma oleaginosa utilizados neste trabalho foram fornecidos pela empresa Biopalma/Vale do estado do Pará. Os resíduos de

folha e cacho vazio de palma (EFB) são provenientes do processamento de extração do óleo de palma.

2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de folha e cachos vazios (EFB) da palma (*Elaeis guineensis*) com umidades iniciais entre 50 e 60% foram inicialmente secas a temperatura ambiente e após em estufas de circulação de ar a 45°C *overnight*. Antes da secagem as folhas foram separadas em duas frações: folíolo e pecíolo.

Os resíduos secos foram processados em moinhos de faca, em peneira de 2mm, e por análise granulométrica separados as frações de 0,35 a 0,85mm (42-20 mesh, respectivamente) e acondicionadas em sacos hermeticamente fechados para serem utilizadas nas análises.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os produtos químicos utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico. Para a caracterização das amostras da folha (folíolos e pecíolos) e cachos vazios (EFB) da palma foram utilizados protocolos propostos por National Renewable Energy Laboratory (NREL) (HAMES et al., 2008; SLUITER et al., 2008a, 2008b, 2010), e normas apresentadas em Procedimentos para Análise Lignocelulósica da Embrapa (SARAIVA MORAIS; DE FREITAS ROSA; MARCONCINI, 2010). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados apresentados correspondem à média dos valores obtidos juntamente com o desvio padrão.

2.3.1 **Determinação do teor de umidade (Método 1)**

A umidade foi determinada de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008c). Uma determinada quantidade (2,0 g) de cada material, na granulometria de 0,35 a 0,85mm foram colocadas em cadinhos previamente tarados.

O material foi colocado em estufa a 105 ± 3 ^{0}C por 4 h. Logo após o material foi resfriado em dessecador por 15 min e determinado a massa. A determinação da umidade das partes da folha e EFB da palma foram estimadas pela diferença de massa obtida antes e após o aquecimento em relação à massa úmida (Equação 1).

$$\% \text{ Umidade} = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{úmida}}} \times 100 \qquad \text{Equação 1}$$

onde:

$m_{\text{úmida}}$ = massa úmida da amostra (g);
m_{seca} = massa da amostra após secagem (g).

2.3.2 **Determinação do teor percentual de cinzas (Método 2)**

Para determinação do teor percentual de cinzas, 1,0 g das amostras secas foram transferidas para cadinhos de porcelana, previamente calcinados e tarados, e mantidos em mufla à 575ºC durante 2 horas, segundo a norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER et al., 2008). Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. O teor percentual de cinzas foi obtido pela diferença de massa (g) das amostras, antes e após a calcinação (Equação 2).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{seca}}} \times 100 \qquad \text{Equação 2}$$

onde:

m_{cinzas} = (massa da amostra calcinada – massa do cadinho) (g);
m_{seca} = massa da amostra seca (g).

2.3.3 **Determinação do teor de extrativos (Método 3)**

Uma amostra de 5g de cada amostra foi submetida a um processo de extração em aparelho Soxhlet, de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42619 (SLUITER et al., 2008b), com algumas modificações em relação ao tempos de extração. No estudo, cada extração foi realizada por 8h, com uma extração inicial com éter etílico, como sugerido no protocolo para resíduos com presença de lipídio.

As extrações foram conduzidas primeiramente com éter etílico, após etanol 95% e água. Após cada etapa de extração, o solvente foi evaporado e o resíduo foi

seco, em balão previamente tarado. Por diferença de massa foi determinado o percentual de cada extrato em relação à massa seca do resíduo (Equação 3).

$$\% \text{ Extrativos} = \frac{m_{(\text{frasco + extrativo})} - m_{(\text{frasco})}}{m_{\text{seca inicial}}} \text{ x100} \qquad \text{Equação 3}$$

onde:

$m_{(\text{frasco + extrativo})}$ = massa do frasco de extração mais o resíduo extraído (g);
m_{frasco} = massa do frasco de extração (g);
$m_{\text{seca inicial}}$ = massa seca da amostra a ser analisada (g).

2.3.4 **Determinação do teor lipídios (Método 4)**

O teor de lipídio foi determinado pelo processo de extração em aparelho Soxhlet com éter etílico, correspondeu à primeira etapa do processo extração (item 2.3.3), por um período de 8h. Após a extração, o solvente foi removido e o resíduo seco em balão previamente tarado. Por diferença de massa foi determinado o percentual de lipídio (Equação 4).

$$\% \text{ Lipídio} = \frac{m_{(\text{frasco + lipídio})} - m_{(\text{frasco})}}{m_{\text{seca inicial}}} \text{ x100} \qquad \text{Equação 4}$$

onde:

$m_{(\text{frasco + lipídio})}$ = massa do frasco de extração mais o resíduo extraído (g);
m_{frasco} = massa do frasco de extração (g);
$m_{\text{seca inicial}}$ = massa seca da amostra a ser analisada (g).

2.3.5 **Método de Klason (Método 5)**

A composição dos carboidratos e de lignina solúvel e insolúvel foi determinada usando o processo de hidrólise ácida em duas fases de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2010).

2.3.5.1 Determinação do teor de lignina (Método 5a)

Uma amostra de 0,3g de cada resíduo seco, livre de extraíveis (Método 3), foi tratada com ácido sulfúrico 72% a 30 ± 3ºC por um período de 1h sob agitação constante. Após a mistura foi diluída até a concentração de 4% em ácido sulfúrico

e a suspensão aquecida em autoclave (1 atm/ 121°C) por 1h para promover a hidrólise total de oligo e polissacarídeos.

O material foi resfriado e filtrado sob vácuo, em papel de filtro 0,45mm, previamente tarado. O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para a determinação da composição dos carboidratos por HPLC (Método 5b). O resíduo sólido foi lavado sequencialmente, com quatro lavagens de 500mL de água deionizada, seco em estufa até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel em ácido (lignina de Klason), foi determinada pela equação 7. A determinação da lignina solúvel, foi determinada pela equação 8, pela medida de absorbância em espectrofotômetro (UV-VIS), com comprimento de onda de 280nm.

$$\% \text{ Lignina Insolúvel} = \frac{m_{lignina} - m_{cinzas\ lignina}}{m_{amostra\ seca}} x100 \qquad \text{Equação 7}$$

$$\% \text{ Lignina Solúvel} = \frac{\text{UVabs x V filtrado x D}}{\varepsilon \text{ x m amostra seca}} \; x100 \qquad \text{Equação 8}$$

onde:

$m_{lignina}$ = massa de lignina determinada após o material seco
$m_{cinzas\ lignina}$ = massa de lignina após calcinação (g);
m_{frasco} = massa do frasco de extração (g);
$m_{seca\ inicial}$ = massa seca da amostra a ser analisada (g).
UVabs = medida de absorbância da amostra a 280nm;
Vfiltrado = Volume do filtrado após hidrólise (L);
D = Diluição da amostra
ε = Absortividade específica da biomassa L/g.cm; Neste caso utilizado 25 L/g.cm.

2.3.5.2 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose (Método 5b)

A composição de carboidratos e produtos de degradação do açúcar foi determinada em HPLC, em um sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL 10 A, desgaseificador de fase móvel DGU 14ª, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10 A e detectores modelo RID 10 A para índice de refração. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, e eluída com fase móvel H_2SO_4 6mM a uma vazão de 0,6mL/min. A quantificação foi realizada por padronização com curvas de calibração construídas para cada componente monitorado. A quantificação foi realizada para celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido acético, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 min) e filtradas utilizando filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm.

Para a determinação da porcentagem de celulose e hemicelulose, cada componente determinado foi convertido ao seu respectivo derivado anidro, considerando os seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores foram de 0,95 para celobiose, 0,90 para glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético.

Os resultados obtidos para celulose correspondem aos valores determinados de glucose e celobiose. Os resultados para hemicelulose correspondem aos resultados de xilose e arabinose. Todas as porcentagens foram expressas em relação ao peso seco do material original.

Os teores de celulose, hemicelulose e grupo acetil foram calculados de acordo com as equações 9, 10 e 11.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{(m_{glicose}+m_{celobiose})F_c}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \qquad \text{Equação 9}$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(m_{xilose}+m_{arabinose})F_c}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \qquad \text{Equação 10}$$

$$\% \text{ Grupo acetil} = \frac{(m_{ácido\ acético})F_c}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \qquad \text{Equação 11}$$

onde:

$m_{glucose}$ = concentração de glucose (g/L) x 0,1L;
$m_{celobiose}$ = concentração de celobiose (g/L) x 0,1L;
m_{xilose} = concentração de xilose (g/L) x 0,1L;
$m_{arabinose}$ = concentração de arabinose (g/L) x 0,1L;
F_C = fator de conversão de hidrólise ácida – específico de cada componente (0,95 para celobiose, 0,90 para glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para ácido acético).
$m_{amostra\ seca}$ = massa seca da amostra a ser analisada (g).

2.3.6 **Método Van Soest (Método 6)**

Neste método são dosados os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina pelas metodologias de Van Soest (VAN SOEST, 1967) e Van Soest e Wine (VAN SOEST, WINE, 1968). O teor de fibras foi determinado no equipamento Fiber Analyzer-Ankom220 (Ankom2000). Uma amostra de 0,5 ± 0,2g foi acondicionada em bolsa filtro, previamente taradas, e após lacradas a quente foram dispostas em bandejas dentro do sistema digestor, com o reagente específico e aquecidas a 100 ± 5°C por 1h. Após o tempo estimado, o material foi lavado três vezes com água destilada, e por último lavado com

acetona e seco em estufa a 105 ± 5ºC até massa constante. Após a secagem, as massas das bolsas foram determinadas para cálculo dos teores de FDN, e FDA.

Na primeira etapa (determinação de FDN) foi utilizado detergente neutro, composto por 30g/L de dodecilsulfato de sódio ($C_{12}H_{25}SO_4Na$); 18,61 g/L de ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico dihidratado (EDTA); 6,81 g/L borato de sódio ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$); 4,56 g/L de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4). Para a segunda etapa (determinação de FDA), o detergente ácido foi preparado com 20g de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em 1L de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1N.

Os teores de FDA e FDN permitem calcular a quantidade de celulose e hemicelulose nas amostras segundo as Equações 12 e 13. A lignina é determinada com a digestão das amostras em ácido sulfúrico como no método 5a.

$$\% \text{ Celulose} = \%\text{FDA} - \%\text{Lignina} \qquad \text{Equação 12}$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \%\text{FDN} - \%\text{Lignina} - \%\text{Celulose} \qquad \text{Equação 13}$$

onde

% FDA = % de fibra após tratamento com detergente ácido;
% FDN = % de fibra após tratamento com detergente neutro;
% Lignina = determinada pela equação 2.7.

2.3.7 **Método de Holocelulose (Método 7)**

A determinação de holocelulose e celulose foram realizadas segundo metodologia descrita nos Procedimentos para Análise Lignocelulósica da Embrapa - Norma TAPPI 19m-54 (SARAIVA MORAIS; DE FREITAS ROSA; MARCONCINI, 2010).

Por holocelulose compreende o material deslignificado constituído apenas por celulose e hemicelulose.

2.3.7.1 Determinação do teor de holocelulose (Método 7a)

Em um erlenmeyer de 250mL, foram adicionadas cerca de 3,0g ± 0,1 da amostra (seca e sem extrativo), 120mL de água deionizada, 1mL de ácido acético glacial e 2,5g de clorito de sódio ($NaClO_2$). O Erlenmeyer foi tampado com outro Erlenmeyer invertido e o conjunto colocado em um banho termostatizado à 70 ± 2 ºC. A adição de ácido acético e clorito de sódio foram repetidas mais duas vezes,

a cada 1hora. Após a última adição manteve-se o sistema em aquecimento por mais três horas.

Após, transcorrido às 5h de aquecimento, a amostra foi resfriada em um banho de água gelada por 30 min e filtrado em funil de vidro sinterizado previamente tarado. O resíduo sólido (holocelulose) foi lavado com água deionizada até o filtrado sair incolor com pH próximo de 7. Com o resíduo em pH perto da neutralidade, realizou-se mais uma lavagem de 20mL com acetona e novamente uma lavagem com 100mL de água deionizada. Em seguida, o resíduo foi seco em estufa a 105 ± 2 ºC até massa constante. Após a secagem determinou-se a massa do funil com a amostra. A porcentagem de holocelulose, corrigida para o teor de cinzas, foi obtida pela equação 14.

$$\% \text{ Holocelulose} = \frac{m_{(holocelulose+funil)} - m_{funil}}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \qquad \text{Equação 14}$$

onde:

$m_{(holocelulose+funil)}$ = massa da amostra de holocelulose e funil;
$m_{(funil)}$ = massa do funil seco;
$m_{amostra\ seca}$ = massa seca da amostra analisada (g).

2.3.7.2 Determinação do teor α- celulose (Método 7b)

Uma amostra de 1,0 g de holocelulose (obtida pelo método 7a), foi colocada em um almofariz e adicionado 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 17,5%, a temperatura ambiente.

Após a adição aguardou-se 2 minutos para o contato entre a solução e a celulose, sendo o material triturado por 8 minutos. Após, adicionou-se 40 mL de água destilada ao almofariz, e a solução final, filtrada em funil de vidro sinterizado, previamente tarado.

O resíduo sólido foi lavado com água destilada até pH próximo da neutralidade e seco em estufa a 105 ± 2 ºC até massa constante. Após a secagem determinou-se a massa do funil com a amostra. A porcentagem de α- celulose foi obtida pela equação 15.

$$\% \ \alpha\text{-Celulose} = \frac{m_{(\alpha-celulose+funil)} - m_{funil}}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \qquad \text{Equação 15}$$

onde:

$m_{(amostra+funil)}$ = massa da amostra de holocelulose e funil;

$m_{(funil)}$ = massa do funil seco;
$m_{amostra\ seca}$ = massa seca da amostra analisada (g).

Os valores de holocelulose e α-celulose devem ser corrigidos, pela substração da porcentagem de extraíveis da amostra. Desta forma, o valor da hemicelulose é determina pela diferença de valores de holocelulose e α-celulose corrigidos.

A porcentagem de lignina foi determinada pela diferença entre os valores da porcentagem de holocelulose, porcentagem de extraíveis e porcentagem de cinzas, determinados previamente pelos métodos 7a, 3 e 2, respectivamente. .

$$\%Lignina = 100\% - \%Holocelulose - \%Extraiveis - \%Cinzas` \quad \text{Equação 16}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E CACHOS VAZIOS (EFB) DE PALMA

A primeira etapa de secagem, moagem e análise granulométrica, embora de procedimentos simples, envolve uma etapa importante, considerada pré-tratamento físico.

Este pré-tratamento físico inicial é necessário para o sucesso das demais análises. A correta secagem do material impede que ocorra a degradação do resíduo com consequentes perdas em sua composição. Processos de moagem e análise granulométrica são importantes para a diminuição do tamanho de partículas, aumentando a acessibilidade dos reagentes. De acordo com CHANDRA et al.(2007) e HENDRIKS; ZEEMAN (2009), a moagem é necessária para a obtenção de um material com características mais uniformes, sendo de grande relevância, uma vez que o tamanho e a forma das partículas que compõem o substrato estão intrinsecamente relacionados com a área superficial do substrato, viável ao processo de hidrólise.

Após a secagem, moagem e separação, as amostras foram caracterizadas em relação a sua composição química por meio das metodologias citadas no item 2.3. Os resultados da composição química do EFB e das partes da folha (folíolo e pecíolo) são apresentados na Tabela 1. Os teores de umidade, cinzas, extraíveis e lipídios, foram realizados com o material in natura seco.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA PALMA OLEAGINOSA

	Percentual (%)		
Componente	**Pecíolo**	**Folíolo**	**EFB**
Umidade	7,66 ± 0,08	4,60 ± 0,15	5,24 ± 0,08
Cinzas	4,53 ± 0,07	6,39 ± 0,02	3,35 ± 0,05
Extraíveis			
Éter Etílico	0,18 ± 0,20	1,33 ± 0,01	2,23 ± 0,08
Etanol (95%)	10,46 ± 0,20	7,81 ± 0,07	3,10 ± 0,08
Água	5,31 ± 0,20	11,46 ± 0,64	4,79 ± 0,20

FONTE: O autor (2016).

A determinação da umidade nas amostras estudadas foi um parâmetro importante a ser determinado, para que todos os resultados das análises subsequentes pudessem ser expressos em base seca. As amostras do folíolo, pecíolo e EFB apresentaram umidade na faixa de 5 a 8%, estes valores de umidade corroboram com os relatados na literatura.

O teor de cinza apresentou um valor bem superior na amostra de folíolo (6,39%) em comparação ao EFB (3,35%) e ao pecíolo (4,53%). Valores altos no teor de cinzas para a folha também foram observados em estudos de GOH; LEE; BHATIA (2010) e GOH; TAN; LEE (2012), os quais determinaram 11,36% no teor de cinzas. Altas porcentagens de cinza (10%) também foram relatas por OFORI-BOATENG e colaboradores (2014), os quais associaram a presença de sílica no resíduo. Estas diferenças na composição estão relacionadas principalmente às diferenças entre as partes da planta e as etapas de processamento em que foram envolvidas.

O teor de cinzas obtido para o pecíolo e EFB da palma é considerado baixo quando comparado com outras biomassas, tais como bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo (SAHA et al., 2005; SÁNCHEZ, 2009; SINDHU et al., 2013). Desta forma, os resíduos de pecíolo e EFB da palma oferecem uma vantagem frente aos outros resíduos, uma vez que em processos de hidrólise ácida, exercem uma menir capacidade tamponante (PITARELO, 2013).

O processo de retirada de extraíveis é uma etapa importante para as análises da composição de carboidratos, uma vez que com as várias etapas de extração é possível remover compostos não estruturais, isto é, que não estão ligados diretamente à parede celular, os quais podem interferir na quantificação dos

carboidratos e da lignina que constituem a parede celular. O total de extraíveis do pecíolo, folíolo e EFB foram de 15,95%, 20,60% e 10,12%, respectivamente.

As amostras foram primeiramente extraídas com éter etílico, a fim de remover a fração lipídica, e após com etanol 95% e água. A fração de EFB apresentou maior extração em éter etílico (2,23%) em relação às demais frações, devido ao resíduo lipídico do processo de extração do óleo de dendê. De acordo com SIDIK e colaboradores (2013) as fibras de palma oleaginosa, especialmente EFB, podem conter até 4,5% de óleo residual, dependendo do processo de extração.

Na extração com etanol 95%, a fração do pecíolo apresentou uma maior porcentagem de extraíveis (10,46%), estes extraíveis estão relacionados com a extração de compostos como ácidos fenólicos, lignanas e outros compostos oxigenados (e.g., flavonóides).

O folíolo apresentou maior porcentagem de extraíveis em água (11,46%) estes valores eram esperados uma vez que na folha concentra-se grande concentração de pigmento como a clorofila, além de pectina, carboidratos, proteínas, sais inorgânicos e resíduos dos solventes.

De acordo com SARAIVA e colaboradores (2010), a distinção entre os componentes extraíveis, derivados de etapas individuais de extração, não é precisa em nenhum caso.

Avaliando a composição química das três biomassas, pecíolo, folíolo e EFB da palma, as principais diferenças foram observadas no teor de cinzas e porcentagem de extraíveis.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO LIGNOCELULÓSICA

3.2.1 **Avaliação de Metodologias**

Para avaliar a composição de hemicelulose, celulose e lignina, foram avaliadas três metodologias usualmente utilizadas na literatura. A composição destas frações celulósicas foi determinada por Van Soest, Lignina de Klason e a técnica de Holocelulose. Nesta etapa somente a fração de EFB foi utilizada, uma vez que este resíduo foi obtido em maior quantidade.

As três técnicas trabalham com a mesma concepção, ou seja, fazer tratamentos sucessivos no material para que as diversas frações de carboidratos sejam removidas.

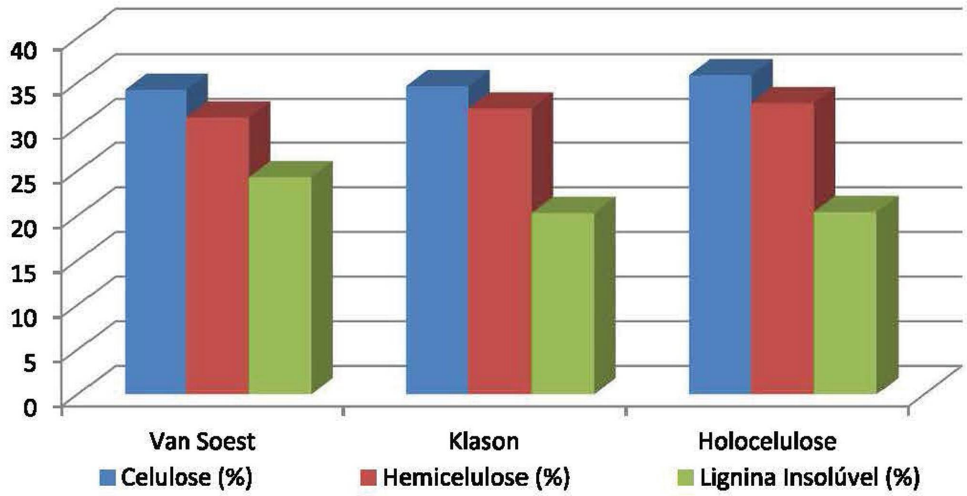
No processo de determinação pela metodologia de Van Soest (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), determina-se os teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e de lignina. Na primeira etapa, o uso de detergente neutro, promove à solubilização do conteúdo celular da amostra, sendo o resíduo remanescente constituído de celulose, hemicelulose e lignina, nesta etapa determina-se a Fibra detergente neutra (FDN). Na segunda etapa, com uso do detergente ácido, o que se determina é a fibra em detergente ácido (FDA), a qual solubiliza a hemicelulose, portanto, o restante é formado por celulose e lignina. Enfim, a lignina é determinada com a digestão das amostras em ácido sulfúrico 72%. Neste processo o uso de detergente neutro faz o papel da extração nas demais metodologias.

Na determinação da holocelulose (resíduo constituído de celulose e hemicelulose), o material sem extraíveis é deslignificado com clorito de sódio ($NaClO_2$) em meio ácido, através da ação oxidativa do dióxido de clorito. Este método é mais seletivo na remoção da lignina com baixa dissolução da hemicelulose (NADIA et al., 2013). Sendo posteriormente degradada a hemicelulose pela ação alcalina de NaOH, obtendo desta forma a celulose. Entre as desvantagens deste método está na formação de gás cloro, considerado tóxico e na solubilização parcial da celulose (WANG et al., 2013).

Na determinação da constituição através do método de Lignina de Klason, o material livre de extraíveis é hidrolisado com ácido sulfúrico 72%. No processo de hidrólise o polissacarídeo é decomposto em sua composição monossacarídica. A determinação da composição monossacarídica compõe novamente as principais estruturas.

Os valores de celulose, hemicelulose e lignina determinado pelos diferentes métodos avaliados (Van Soest, Lignina de Klason e Holocelulose) são apresentados no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA.



FONTE: O autor (2016).

Avaliando o Gráfico 1 observa-se que a composição de celulose, hemicelulose para as três metodologias avaliadas, apresentaram pequenas diferenças entre elas (1% a 3%), as maiores diferenças foram apresentadas na determinação de lignina. A porcentagem de lignina na Metodologia de Van Soest foi superior (24,30%) as determinadas pelas demais metodologias, as quais passaram pelo processo de extração. Embora ocorra uma extração pelo detergente neutro (FDN), e o isolamento da celulose, hemicelulose e lignina, há sempre alguma contaminação por proteína e pectina. De acordo com o protocolo NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2010), a não remoção de materiais extraíveis podem resultar num erro nos valores dos açúcares estruturais e em valores falsamente elevados de lignina quando os carboidratos não hidrolisados condensam com a lignina insolúvel.

Na pratica as três metodologias se mostraram eficientes na determinação da estrutura lignocelulósica, uma vez que os valores determinados se encontram-em uma faixa observada na literatura.

No caso da metodologia de Van Soest, esta é mais utilizada para determinação de fibra dietética, que compõe alimentos, além de ser um método totalmente gravimétrico. Uma das principais desvantagens da metodologia de Van Soest é não ser eficiente para materiais, particularmente, ricos em amido e subprodutos agroindustriais ricos em pectinas, taninos, complexos taninos-proteína e produtos da reação de Maillard (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991).

A metodologia de Holocelulose, embora eficiente, para o isolamento da α-celulose e determinação da hemicelulose o valor da lignina é obtida por gravimetria,

tornando-a mais incerta, e o tempo de análise é longo. Além do clorito de sódio solubilizar parcialmente a celulose e liberar vapores de Cl_2, que são tóxicos.

A metodologia de Lignina de Klason é uma metodologia que vem ganhando espaço nos últimos anos, especialmente após estudos do NREL, sendo atualmente uma técnica constantemente utilizada para avaliar a composição da estrutura lignocelulósica (LASER et al., 2002; RAMAN; GNANSOUNOU, 2014; TIMILSENA et al., 2013; ZHANG et al., 2012; ZU et al., 2014). Sua principal vantagem é a possibilidade de se determinar todos os constituintes em um único processo, além de ser possível a determinação da composição monossacarídica.

Com estes resultados, optou-se pela utilização da metodologia de Lignina de Klason, para determinação da composição lignocelulósica, nos processos subsequentes.

3.3 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E LIGNOCELULÓSICA DAS FRAÇÕES DA FOLHA (FOLÍOLO E PECÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA

Para avaliar a composição lignocelulósica das frações da palma (folíolo, pecíolo e EFB) foi utilizada a metodologia proposta por SLUITER et al. (2010), de determinação da estrutura de carboidratos e lignina, a qual segue a metodologia de Lignina de Klason. Por essa metodologia é possível determinar a quantidade de lignina total da amostra livre de extraíveis, bem como quantificar os principais monômeros constituintes dos polissacarídeos por análise cromatográfica.

A composição química e lignocelulósica do pecíolo, do folíolo e do EFB da palma oeagenosa *in natura*, é apresentada na Tabela 2. Os teores de anidroglucose, anidroxilose, anidroarabinose, do grupo acetila e da lignina (solúvel e insolúvel) foram expressos em relação à massa inicial seca da amostra, livre de extraíveis.

Observa-se da Tabela 2, que há diferenças entre a composição lignocelulósica das diferentes partes da palma, as maiores diferenças foram observadas para a fração do folíolo.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA TOTAL DO PECÍOLO, FOLÍOLO E EFB DE PALMA OLEAGINOSA

	Percentual (%)		
Componente	**Pecíolo**	**Folíolo**	**EFB**

Umidade	7,66 ± 0,08	4,60 ± 0,01	5,24 ± 0,08
Cinzas	4,53 ± 0,07	6,39 ± 0,06	3,35 ± 0,05
Extraíveis	15,95 ± 0,2	20,60 ± 0,06	10,12 ± 0,20
Anidroglucose(1)	36,78 ± 0,60	19,60 ± 0,70	34,90 ± 0,9
Anidroxilose(2)	20,96 ± 0,05	10,40 ± 0,09	25,31 ± 0,5
Anidroarabinose(2)	2,39 ± 0,01	2,15 ± 0,10	2,83 ± 0,01
Grupo acetila(2)	6,8 ± 0,28	2,71 ± 0,07	7,60 ± 0,27
Lignina Total			
Lignina Insolúvel	13,87 ± 0,47	39,60± 0,17	19,64 ± 0,13
Lignina Solúvel	0,92 ± 0,05	0,95 ± 0,20	1,10 ± 0,13
Celulose	36,78	19,60	34,90
Hemicelulose	23,35	12,55	28,14
Lignina	14,79	40,55	20,74

FONTE: O autor (2016)

NOTA: [1]AnGlu: anidroglucose presente como componente de β- (1-4) -D-glucan (celulose).
[2]AnXil: anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componente da heteroxilanas (hemicelulose).

O folíolo apresentou baixa concentração de celulose e hemicelulose, 19,6% e 12,55%, respectivamente. A fração da folha (Pecíolo) e EFB apresentaram composições semelhantes, as quais apresentam alta porcentagem de celulose 36,78% e 34,90%, e alta porcentagem de hemicelulose 23,35% e 28,14% respectivamente, em relação à fração do folíolo. A porcentagem de lignina total diferiu de 40 a 60% em relação às frações da palma, tendo o folíolo apresentado 40,55%, o EFB 20,74% e o pecíolo 14,79%.

A tabela 3 apresenta uma comparação entre os valores determinados na caracterização com a literatura.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DAS FRAÇÕES DA PALMA OLEAGINOSA NA LITERATURA

	Celulose (% m/m)	Hemicelulose (% m/m)	Lignina (% m/m)	Literatura
	36,8	23,4	14,8	**Estudo**
Pecíolo	38,7	32,5	19,4	JUNG et al. (2011)
	49,1	*19,0*	*23,6*	*PRAWITWONG et al. (2012)*
	19,6	12,6	40,6	**Estudo**
Folíolo	32,7	22,5	15,2	ZAKARIA et al. (2015)
	30,2	24,3	12,9	GOH et al. (2012)
	34,9	28,1	20,7	**Estudo**
EFB	34,3	21,8	21,5	ZHANG et al.(2012)
	33,5	28,8	21,2	RAMAN et al.(2014)

FONTE: O autor (2016)

Observa-se da tabela 3, que em geral ocorrem diferenças na composição química das plantas e até mesmo dos mesmos resíduos quando avaliados por diferentes autores. Segundo CHIESA; GNANSOUNOU (2014); PALAMAE et al. (2014) e YU et al.(2010) as principais diferenças estão relacionadas com as técnicas utilizadas para caracterização, na diferença da maturidade, no tempo de coleta, no clima e solo nas diferentes regiões geográficas onde foi cultivado. YAMADA e colaboradores (2010), observaram grandes diferenças no percentual de açúcares em diferentes partes do tronco da palma, sendo a região mediana do tronco a que apresentou a maior composição em termos de açúcar total (117,2 mg/mL), seguida da região mais próxima das raízes (101,2 mg/mL). A região mais alta do tronco (perto das folhas), apresentou apenas 85,2 mg/mL de açúcar total. SRIMACHAI et al. (2015), também observou diferenças significativas na porcentagem de açúcares em folhas de palma de diferentes idades. Folhas de árvores mais jovens (menos de 10 anos) apresentaram o dobro de açúcares em relação às árvores com mais de 10 anos de produção.

Em todos os resíduos de palma avaliados, a porção de hemicelulose é composta basicamente de arabinoxilose, com maior porcentagem de xilose que arabinose. A arabinose para as frações de pecíolo e EFB corresponde em torno de 10% da hemicelulose, e 17% para a fração do folíolo.

O percentual de grupo acetil presente nas hemiceluloses, apresentou valores mais elevados para o pecíolo e EFB, 6,8% e 7,6% (respectivamente), que o apresentado para a fração do folíolo (2,7%). A porcentagem de grupos acetil ligados a hemicelulose das frações do pecíolo e de EFB da palma, são bem superiores as apresentadas por outros resíduos como: bagaço de cana, 3,1% (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2014), palha de arroz, 4,8% (SINDHU et al., 2013) e bagaço de sorgo, 0,05% (HEREDIA-OLEA; PÉREZ-CARRILLO; SERNA-SALDÍVAR, 2012).

De acordo com ALVIRA et al.(2010), o grau de acetilação na hemicelulose é um fator importante porque lignina e grupos acetil estão ligados a matriz de hemicelulose e podem dificultar a ruptura polissacárideo. Alguns trabalhos mostram que à medida que se desacetila as xilanas das hemiceluloses nas madeiras duras e herbáceas, a fração de celulose e hemicelulose se torna três vezes mais hidrolisável (SINDHU et al., 2013)

Estes resultados demonstram que 60,1% e 63,0% da composição química do pecíolo e de EFB, respectivamente é constituída por carboidratos, mais especificamente celulose e hemicelulose. A porcentagem de carboidratos nestes resíduos torna-os uma matéria prima atrativa para serem convertidos em açúcares fermentescíveis para processos de bioconversões. A fração do folíolo por apresentar baixa composição de celulose e hemicelulose (32,3%), mas alta porcentagem de lignina (40,6%) pode ser usada como biomassa alternativa para produção de compostos derivados da lignina.

A composição lignocelulósica foi utilizada para determinar os rendimentos de recuperação dos principais componentes

4 CONCLUSÃO

De acordo com as análises de caracterização das frações da palma oleaginosa, observa-se que há diferenças na composição e na estrutura da folha (folíolo e pecíolo) e do EFB, sendo estas relacionadas diretamente com a composição de celulose, hemicelulose e lignina.

As frações da palma, Pecíolo e EFB, apresentam potencial como matéria prima para a produção de bioetanol, entretanto o folíolo apresenta baixa composição lignocelulósica, sendo mais indicado para a recuperação de lignina.

CAPÍTULO III: HIDRÓLISE ÁCIDA EM CONDIÇÕES BRANDAS PARA PARTES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E CACHOS VAZIOS (EFB) DA PALMA OLEAGINOSA (*Elaeis guineensis*)

RESUMO

Resíduos do processamento da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*), planta usada na produção de óleo de dendê, tem se destacado em todo mundo pela característica de ter na sua composição mais de 60% em matéria lignocelulósica, a qual por processo de pré-tratamento adequados podem gerar monossacarídeos e serem biotransformados em diversos produtos, especialmente em etanol. O maior foco de pesquisadores no mundo é a recuperação da celulose, mas para um maior reaproveitamento de todo o resíduo, a recuperação da hemicelulose na forma de pentoses, é um desafio para processo de biorrefinaria. Neste capítulo, diferentes resíduos da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*), folha e cachos vazios (EFB) foram tratados com catalisadores ácidos (ácido clorídrico e ácido sulfúrico) em condições brandas de temperatura, tempo e concentração de ácido, com o objetivo de recuperar as pentoses da fração hemicelulósica com baixa formação de compostos secundários, como Furfural, HMF e ácido acético, considerados potenciais inibidores em processos fermentativos. Diferenças nas hidrólises com relação as frações da folha (pecíolo e folíolo) e EFB e dos ácidos utilizados foram observadas. Através da análise estatística e econômica, avaliou-se que as melhores condições para maior recuperação de xilose, com baixa formação de ácido acético, furfural e HMF ocorre com o uso de temperaturas mais elevadas, com níveis mais baixos da concentração do catalisador e do tempo de pré-tratamento, sendo a condição mais indicada o uso de temperaturas em 130ºC, concentrações do catalisador em torno 1,5 (%v/v), por 15 minutos, esta condição, também apresentou menor custo do processo para todos os resíduos. Nas condições avaliadas nos planejamentos foi possível recuperar de 80-90% de xilose nos pré-tratamentos com EFB e 80-85% nos pré-tratamentos com Pecíolo, com baixas concentrações de ácido acético, furfural e HMF. Para a frações do Folíolo, nas melhores condições do pré-tratamento, a recuperação máxima de xilose foi de 72-79%, com rendimentos de menores que as outras frações. A fração de EFB hidrolisada com ácido sulfúrico apresentou maior potencial para o reaproveitamento da fração hemicelulósica, apresentado maiores rendimentos de xilose.

Palavras-chave: Palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*). Pré-tratamento em condições brandas. Hidrólise ácida.

1 INTRODUÇÃO

O uso de resíduos lignocelulósicos provenientes de processos agroindustriais como bagaço de cana, milho, soja, aveia e da palma, têm sido foco de pesquisas para o reaproveitamento destas frações para a obtenção de açúcares livres da celulose e da hemicelulose para uso na produção de diferentes produtos de interesse comercial. Embora o maior foco seja para a produção de etanol, através de tratamentos adequados estes podem ser convertidos em vários produtos de química fina, como por exemplo sorbitol, 5-HMF, ácido levulínico (LA), e y-valerolactone (GVL), butanodiol, xilitol, entre outros (CHIN et al., 2015).

Uma das principais vantagens em se utilizar resíduos agroindustriais está no fato de fazer uso de um resíduo, que muitas vezes seriam descartados no meio ambiente ou teriam alto custo para serem tratados, e que através de um conjunto integrado de processos podem ser transformados em produtos de alto valor agregado.

O maior obstáculo para o uso destes resíduos está relacionado à sua estrutura recalcitrante (WANG et al., 2010). Os materiais lignocelulósicos são formados por três estruturas básicas: celulose, hemicelulose e lignina, que unidas e estabilizadas por ligações covalentes e ligações de hidrogênio, conferem a estes uma estrutura altamente robusta e resistente (LIMAYEM; RICKE, 2012). Esta estrutura impede que estes resíduos sejam utilizados diretamente, necessitando de tratamentos que preservem sua composição durante a estocagem assim como de pré-tratamentos que assegurem que as moléculas estejam acessíveis à transformação química ou bioquímica (GÍRIO et al., 2010). Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm características físico-químicas diferentes, é necessário adotar tecnologias de pré-tratamentos apropriadas a cada matéria prima (ALVIRA et al., 2010).

Os pré-tratamentos são considerados uma das etapas mais importante na transformação da biomassa. A escolha do pré-tratamento certamente tem um grande impacto em todas as etapas subseqüentes no sistema de conversão, em termos rendimento de monossacarídeos, geração de compostos tóxicos, assim como, na demanda de energia no processo e no *downstream* (GALBE; ZACCHI, 2012). A etapa de pré-tratamento constitui um dos fatores limitantes aos processos para produção de bioetanol, devido ao alto custo energético, que em alguns casos pode contribuir com 30% do custo total (AYENI et al., 2013; BANERJEE et al., 2009; JUN; YU-PING, 2008).

Vários métodos de pré-tratamento são descritos na literatura, para superar a recalcitrância da fração lignocelulósica e melhorar o rendimento de açúcares monoméricos, usando princípios químicos, físicos, biológicos ou a combinação deles (LI et al., 2014). Entre os principais pré-tratamentos incluem ácido diluído ((KUMAR et al., 2015; LARSSON et al., 1999; RAHMAN; CHOUDHURY; AHMAD, 2006), alcalino (ALVAREZ-VASCO; ZHANG, 2013; KAAR; HOLTZAPPLE, 2000; WANG et al., 2010), líquido iônico (GAO et al., 2013; TAN; LEE, 2012), solvente orgânico (PARK et al., 2010; SUN; CHEN, 2008), água quente (GOH; LEE; BHATIA, 2010; LASER et al., 2002; LI et al., 2014), amônia liquida (AFEX) (LEE; JAMEEL; VENDITTI, 2010; YOO et al., 2011).

Dentre essas técnicas o pré-tratamento com ácido diluído, representa a tecnologia mais amplamente pesquisada em diferentes tipos de matérias-primas (ZHENG et al., 2014). Na hidrólise ácida, utilizando ácido diluído, o resíduo é tratado sob condições adequadas com ácidos inorgânicos que promovem a desestruturação do composto lignocelulósico e hidrólise da hemicelulose, a qual é convertida a açúcares redutores como xilose, glucose, celobiose, arabinose, através da quebra das ligações glicosídicas que a formam. O hidrolisado rico em açúcares, principalmente pentoses, pode ser utilizado para a produção de etanol e outros produtos.

No entanto, dependendo das condições do pré-tratamento (tempo, temperatura e concentração do ácido), alguns compostos da degradação dos açúcares e degradação da lignina, como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos aromáticos são formados, os quais afetam diretamente o metabolismo de microrganismos na etapa de fermentação (SAHA et al., 2005). Na maioria dos estudos, o uso de condições mais severas, impacta na formação de compostos secundários. A severidade do processo pode ser avaliada pela determinação do Coeficiente de severidade combinado (CSC).

A determinação do CSC permite classificar as diferentes condições de pré-tratamento, avaliando principalmente formação de compostos secundários nos processos de hidrólise com ácido diluído. De maneira geral, para a recuperação dos açúcares da hemicelulose, pré-tratamentos efetuados com CSC inferiores a 1,0 produzem pequenas modificações estruturais, e consequentemente, baixo rendimento de açúcares monoméricos. Pré-tratamentos com CSC entre 1,0 e 2,0 , são considerados ideais, pois atuam modificando a estrutura da parede celular, liberando os açúcares monoméricos com baixa formação de compostos inibidores (dependendo

da composição da biomassa). Pré-tratamentos realizados com CSC acima de 2,0, apresentam baixo rendimento de recuperação dos açúcares, e maior produção de compostos secundários considerados inibidores no processo subsequente de fermentação, não sendo adequados para recuperar açúcares da hemicelulose.

O uso de condições mais brandas principalmente em relação ao tempo e concentrações de ácido, com coeficientes de severidade combinado (CSC) menores que 2,0, é uma das alternativas para a redução da formação de produtos secundários, sem prejudicar os rendimentos da recuperação de pentoses (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2014; GÁMEZ et al., 2006).

Neste estudo, resíduos da folha e de cachos vazios de palma (EFB), foram submetidos à hidrólise ácida, com ácido clorídrico e sulfúrico como catalisadores, em condições brandas de temperatura, tempo e concentração de ácido com o objetivo principal de determinar condições para melhor recuperação dos açúcares da hemicelulose, com baixa formação de compostos inibidores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os resíduos lignocelulósicos utilizados neste trabalho foram fornecidos pela empresa Biopalma/Vale do estado do Pará. Os resíduos: Folhas e Cacho vazio de palma (EFB) são provenientes do beneficiamento do óleo de palma.

As frações da folha (pecíolo e folíolo) e cachos vazios da palma foram secas e moídas de acordo com o item 2.2 (Capítulo 2).

2.2 PROCESSO DE HIDRÓLISE

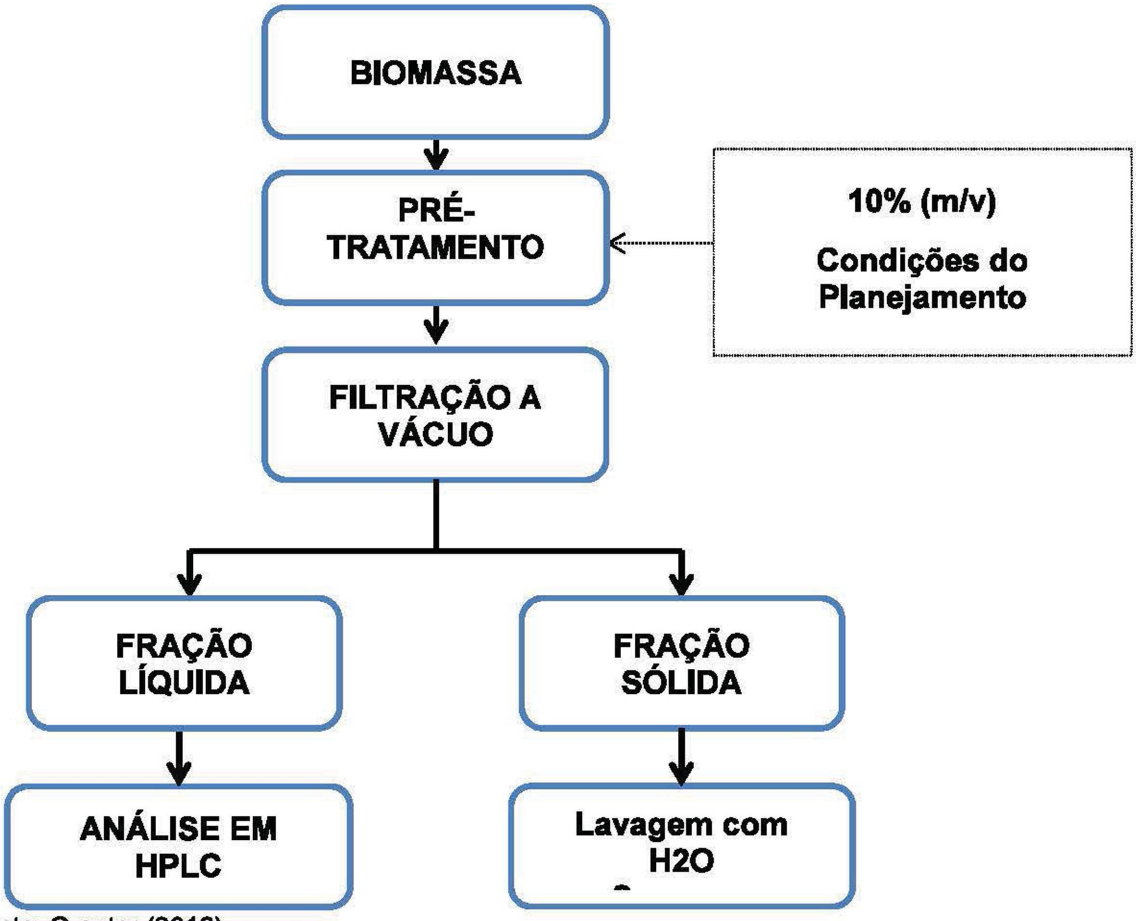
As frações (Folha e EFB) da palma foram submetidas à hidrólise ácida, para desestruturação do complexo lignocelulósico e obtenção de pentoses da fração hemicelulósica, utilizando como catalisadores: ácido clorídrico e ácido sulfúrico, em condições estabelecidas de temperatura, tempo e concentração do ácido (% v/v).

As hidrólises foram realizadas em autoclave, com uma razão massa/volume de 1:10, sendo colocado 5g de resíduo seco e 50mL da solução de ácido em erlenmeyer de 250mL, de acordo com metodologia de WOICIECHOWSKI et al (2004).

Após o tempo de reação de cada tratamento, o material foi resfriado e separado da fração líquida por filtração a vácuo. A fração sólida foi lavada com água destilada até pH 7,0 e seca em estufa a 45ºC. A composição do hidrolisado (fração líquida) foi determinada por análise em HPLC, como referido no capitulo 2 (item 2.3.5.2).

As etapas que constituem o processo de hidrólise ácida são apresentadas na Figura 10.

FIGURA 10 – ETAPAS DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ÁCIDA.



Fonte: O autor (2016)

2.2.1 **Avaliação das variáveis que influenciam o processo**

Para avaliar a influência dos fatores: concentração de ácido, tempo e temperatura, os resíduos foram avaliados por um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, para determinação da variância do sistema.

Os valores limites para as variáveis estudadas foram estabelecidos em estudos prévios, visando obter um maior rendimento na obtenção de pentoses, especialmente xilose, com baixa formação de compostos como, Furfural, Hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético.

Os níveis codificados e as condições utilizadas para o pré-tratamento das frações do pecíolo, folíolo e EFB, são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 4 - NÍVEIS E VALORES REAIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 PARA OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS, TEMPO, CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO E TEMPERATURA PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (FOLÍOLO E PECÍOLO) E EFB.

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**1**
Tempo (min)	15	45	75
Concentração do ácido (% v/v)	1,5	2,5	3,5
Temperatura (°C)	110	120	130

FONTE: O autor (2016)

2.2.2 **Determinação do Coeficiente de Severidade Combinado (CSC)**

Os pré-tratamentos utilizando como catalisadores ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram avaliados pelo coeficiente de severidade combinado (CSC), o qual avalia a severidade do processo como uma função do tempo de residência (min), temperatura da reação (°C) e do pH da solução ácida (CHUM et al., 1990; OVEREND; CHORNET; GASCOIGNE, 1987), como apresentado nas equações 3.1 e 3.2.

$$CSC = log\, R_0 - pH \qquad \text{Equation 3.1}$$

$$R_0 = t.e^{(T_r - T_0/\omega)} \qquad \text{Equation 3.2}$$

onde:

pH = pH da solução ácida inicial;
Tr = Temperatura do pré-tratamento (°C);
t = tempo do pré-tratamento (min)
R_0 = grau de severidade.
T_0 e ϖ são constantes, com valores de 100°C e 14,75, respectivamente.

2.3 ESTIMATIVA DOS CUSTOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Um dos fatores que mais impacta nos custos de etanol de 2º geração são os custos com o pré-tratamento. Segundo AYENI et al.(2013) e HAGHIGHI MOOD et al. (2013), os custos com pré-tratamento variam de 20 - 30% de todo o processo, sendo um desafio determinar condições que otimize o processo, do ponto de vista técnico e econômico.

Para os planejamentos do EFB, Pecíolo e Folíolo foi estimatimado os custos para cada condição do pré-tratamento. Na estimativa considerou apenas os três fatores avaliados: Concentração do ácido (custo do catalisador), o Tempo e a Temperatura do processo (custo energia).

Os custos foram estimados considerando uma sistema de reator com volume útil de $1m^3$. Os calores envolvidos na reação e a perda de calor nas paredes do reator foram desconsideradas.

Os dados referentes a entalpia específica do vapor, e dados propriedades específicas das soluções ácidas, da água e dos materiais foram determinadas em tabelas específicas (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2007; INCROPERA; DEWITT, 1999).

2.3.1 **Estimativa do Custo com Catalisador (ECc)**

$$EC_c = \rho_{solução}\ x\ V_{solução} x\ \%C\ x\ C_c \qquad \text{Equação 17}$$

onde:

ECc = Estimativa do custo com catalisador (R$)
$\rho_{solução}$ = densidade da solução (Kg/L)
$V_{solução}$ = Volume da solução (L)
% C= Porcentagem do catalisador
C_c = Custo do catalisador (R$/Kg)

2.3.2 **Estimativa do Custo com Energia(ECE)**

$$EC_E = \frac{Q_T}{\Delta H_V}\ x\ C_v \qquad \text{Equação 18}$$

onde:

EC_E = Estimativa do custo da energia (R$)
Q_T = Calor total necessário para aquecimento e manutenção da temperatura (Kcal);
ΔHv = Entalpia específica do vapor (Kcal/Kg); determinada para cada temperatura do processo
Cv = Custo do vapor (R$/Kg)

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

Os resultados do planejamento fatorial 2^3, do pré-tratamento térmoquímico de EFB e das partes da folha (Pecíolo e Folíolo), utilizando como catalisadores ácido clorídrico e ácido sulfúrico diluídos, foram avaliados em relação à formação dos açúcares redutores celobiose, glucose, xilose e arabinose, assim como da formação dos compostos de desidratação, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de açúcares, pentose e hexose, respectivamente e ácido acético, produto da hidrólise e desacetilação da hemicelulose. O coeficiente de severidade combinado (CSC) também foi avaliado.

As variáveis respostas, formação de xilose, ácido acético, furfural e HMF foram avaliados pelo Software Statistica 7.0, por meio da análise de variância (ANOVA). A influência das variáveis: tempo, temperatura e concentração do ácido foram avaliadas através do Diagrama de Pareto e pela determinação do coeficiente de correlação (R^2) do modelo.

Para todos os planejamentos, observou-se uma maior formação de pentoses, particularmente xilose e arabinose em relação à glucose. A observação de maior formação de xilose, frente aos outros açúcares, principalmente a glucose, está relacionada à estrutura amorfa da hemicelulose, sendo mais suscetível ao pré-tratamento que a celulose que possui uma estrutura mais recalcitrante (ALVIRA et al., 2010).

De acordo com JUNG et al. (2013), os açúcares formados nos pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, são geralmente liberados da hidrólise total ou parcial da hemicelulose, podendo também ser formado pela hidrólise parcial da celulose, dependendo das condições de pré-tratamento. Os tratamentos com ácido diluído solubilizam mais especificamente os componentes hemicelulósicos, enquanto as porções celulósicas e a lignina, mais resistentes, são geralmente menos afetadas (CHIESA; GNANSOUNOU, 2014). A baixa formação de glucose indica que a estrutura celulósica não foi afetada, sendo de interesse para o processo posterior de sacarificação.

A formação de compostos secundários, como o ácido acético, furfural e HMF, foi mais significativa em condições de maior CSC. Subprodutos como ácido fórmico e

ácido levulínico formados da degradação de furfural e HMF, respectivamente, não foram observados a níveis de detecção cromatográfica.

Do estudo dos planejamentos dos pré-tratamentos utilizando ácido diluído como catalisador, observa-se que há grandes diferenças com relação ao ácido utilizado, assim como da característica do material.

3.1.1 **Pré-tratamento dos Cachos Vazios da palma (EFB)**

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados para a hidrólise do EFB da palma oleaginosa conduzida com ácido clorídrico e ácido sulfúrico, respectivamente.

Observa-se que os valores dos Coeficientes de Severidade Combinado apresentaram valores entre 0,48 e 2,21, os quais podem ser classificados em pré-tratamentos brandos e médios, como proposto neste estudo.

Os tratamentos com maior CSC corresponderam aos maiores níveis de temperatura (130ºC), concentração do ácido (3,5%v/v) e tempo (75min), ensaio 8, que são considerados os níveis mais severos do tratamento, neste planejamento. Embora nestas condições a recuperação de xilose tenha sido de 89,81 e 79,53%, para ácido clorídrico e ácido sulfúrico, respectivamente, observou se uma maior formação dos compostos secundários como ácido acético, furfural e HMF. Estes resultados demonstram que ocorreram altos índices de hidrólise e subsequente reação de desidratação dos carboidratos presentes no EFB. Nestas condições, a formação de ácido acético, furfural e HMF, foram máximas, obtendo respectivamente 7,11; 1,81; 0,03 g/100g palma, para hidrólise utilizando ácido clorídrico e 7,08; 2,06; 0,03 g/100g de palma para hidrólise utilizando ácido sulfúrico.

Estes resultados corroboram com estudos conduzidos por PEDERSEN; MEYER (2010) e HEREDIA-OLEA et al (2012), o qual relacionam o aumento na formação de produtos secundários como ácido acético, Furfural e HMF ao aumento do coeficiente de severidade quando se utiliza temperaturas mais elevadas.

As maiores diferenças entre as hidrólises, no ensaio 8, estão relacionada com a recuperação de xilose e formação de furfural. Observa-se que o aumento de 14% na formação furfural está diretamente relacionado com a desidratação da xilose, a qual reduziu sua formação em 13% quando utilizado ácido sulfúrico como catalisador. Nas hidrólises com ácido clorídrico não é observado grandes variações com relação

à recuperação de xilose para temperaturas de 120ºC e 130 ºC, indicando que neste pré-tratamento ocorre menor degradação da xilose.

Dos resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6, observa-se que alta recuperação de xilose está diretamente relacionada com a formação de compostos secundários, como HMF, furfural e ácido acético. Desta forma a determinação das melhores condições de pré-tratamento com cada ácido foi determinada avaliando-se as condições em que se obtinha altas recuperações de xilose, mas com baixa formação de compostos inibidores, especialmente ácido acético e furfural e pela avaliação de custos.

Devido as diferentes características químicas dos ácidos, a otimização de cada planejamento foi realizado individualmente.

TABELA 5 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA EFB NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g EFB)							Total	
Ensaio	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g EFB)	Recuperação de Xilose (%)
1	1,5	15	110	0,54	0,00	0,00	9,41	1,40	3,90	0,00	0,01	10,81	37,19
2	3,5	15	110	0,92	0,63	0,17	19,27	1,77	5,53	0,00	0,10	21,84	76,16
3	1,5	75	110	1,24	0,00	0,00	12,84	1,61	4,07	0,00	0,02	14,44	50,74
4	3,5	75	110	1,62	1,27	0,37	22,68	1,67	5,61	0,01	0,30	25,99	89,63
5	1,5	15	130	1,13	0,92	0,43	20,28	1,14	5,33	0,01	0,27	22,76	80,14
6	3,5	15	130	1,51	0,83	0,91	20,78	1,44	5,73	0,02	0,86	23,96	82,13
7	1,5	75	130	1,83	1,61	0,44	22,79	1,81	5,98	0,01	0,33	26,65	90,08
8	3,5	75	130	2,21	0,69	1,32	22,72	1,34	7,11	0,03	1,81	26,07	89,81
9	2,5	45	120	1,58	1,24	0,52	22,60	1,83	5,87	0,01	0,45	26,19	89,35
10	2,5	45	120	1,58	1,28	0,53	22,86	1,80	5,81	0,01	0,39	26,46	90,35
11	2,5	45	120	1,58	1,29	0,50	22,19	1,86	5,77	0,01	0,38	25,85	87,70

Fonte: O autor (2016)

TABELA 6 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA EFB NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g EFB)							Total	
Ensaio	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g EFB)	Recuperação de Xilose (%)
1	1,5	15	110	0,54	0,00	0,00	14,49	1,12	4,33	0,00	0,04	15,61	57,25
2	3,5	15	110	0,92	0,90	0,00	20,61	1,91	6,14	0,00	0,17	23,42	81,42
3	1,5	75	110	1,24	0,72	0,00	18,14	1,57	5,04	0,00	0,12	20,44	71,69
4	3,5	75	110	1,62	1,36	0,31	20,33	1,81	6,51	0,01	0,47	23,81	80,31
5	1,5	15	130	1,13	1,04	0,63	22,08	1,80	5,43	0,01	0,49	25,54	87,22
6	3,5	15	130	1,51	0,55	1,06	19,07	1,47	5,35	0,02	1,11	22,16	75,36
7	1,5	75	130	1,83	1,09	1,13	24,21	1,94	6,55	0,02	0,96	28,37	95,64
8	3,5	75	130	2,21	0,27	1,72	20,13	1,39	7,08	0,03	2,06	23,51	79,53
9	2,5	45	120	1,58	1,00	0,72	22,23	1,69	6,22	0,01	0,73	25,64	87,84
10	2,5	45	120	1,58	1,02	0,78	22,51	1,78	6,33	0,01	0,76	26,09	88,92
11	2,5	45	120	1,58	1,05	0,71	22,79	1,75	6,20	0,01	0,71	26,30	90,03

FONTE: O autor (2016).

3.1.1.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento de EFB com ácido clorídrico

Nas condições estudadas para o pré tratamento com ácido clorídrico, os maiores rendimentos, em torno de 90% foram apresentados em diferentes condições de temperatura a 110ºC, 130ºC e 120 ºC, especialmente os ensaios 4, 7, 8 e ponto central (9,10 e 11), respectivamente, em diferentes condições de concentração do ácido e tempo.

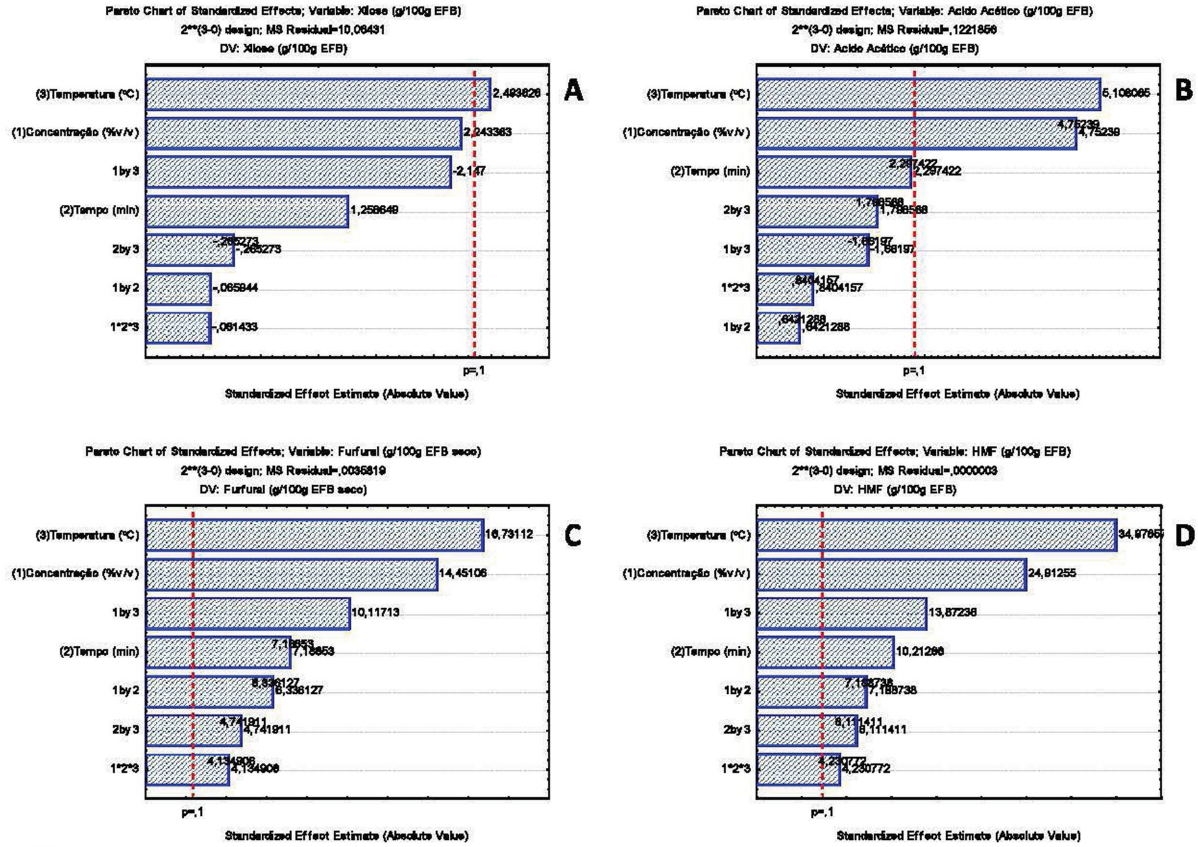
De acordo com os Diagramas de Pareto (Figura 11), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D), a um nível de 90% de confiança, o fator mais significativo para todas as variáveis respostas é a Temperatura, seguida da concentração do ácido, para as variáveis respostas ácido acético, furfural e HMF. Para a formação de furfural e HMF, o tempo apresenta ser significativo, assim como todas as interações entre as variáveis.

Todos os fatores apresentaram efeito positivo, ou seja, o aumento em qualquer uma das variáveis aumenta a formação dos compostos. Desta forma, em condições em que se obtêm maiores recuperações de xilose, com certeza terá a formação de compostos secundários.

Avaliando os dados da Tabela 5, observa-se que em temperaturas mais baixas (110ºC), o aumento da concentração do ácido clorídrico, aumenta a formação de xilose e ácido acético. Mas em temperaturas mais elevadas (130ºC) este comportamento não é observado. Verifica-se nos ensaios conduzidos nesta temperatura, principalmente no tempo de 75min (ensaios 7 e 8) que variações nas concentações do ácido clorídrico, não alteram as recuperações de xilose. Nesta condições observa-se apenas redução na recuperação de arabinose e maior formação de Furfural.

Estas observações demonstram que o sistema entrou em equilíbrio, e que variações na concentração e tempo favorecem as reações secundárias de decomposição, principalmente da arabinose, sendo esta pentose mais suscetível a desidratação em pré-tratamento com ácido diluído.

FIGURA 11 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA EFB



FONTE: O autor (2016).

NOTA: A - Formação de Xilose (R^2= 0,85); B - Formação de Ácido acético (R^2= 0,95), C - Formação de Furfural (R^2= 0,99); D - Formação de HMF (R^2= 0,99);

Este comportamento de maior desidratação de arabinose em relação a xilose também foi observda por PITARELO (2013), quando do estudo de pré-tratamento com explosão a vapor de bagaço de cana de açúcar. A maior suscetibilidade da arabinose de se degradar em relação a xilose, refere-se tanto a sua posição na estrutura da hemicelulose, quanto da conformação do anel destes açúcares, sendo a xilose mais estável que a arabinose. Desta forma a desidratação da arabinose ocorre mais facilmente.

A formação de HMF foi mais significativa com o aumento das três variáveis, concentração do ácido clorídrico, do tempo e da temperatura.

Dos dados do planejamento com ácido clorídrico (Tabela 5), as recuperações de xilose em tono de 90%, foram apresentadas pelos ensaio 4 a 110 ºC; ensaios,7 e 8 a 130ºC; e ensaios 9,10 e 11 a 120ºC (ponto central). Destes ensaios, o ensaio 8, embora apresente alta recuperação de xilose, apresenta alta formação de furfural

(1,18g/100g EFB), que representa concentrações acima de 1g/L, considerada inibidora em processos subsequente de fermentação.

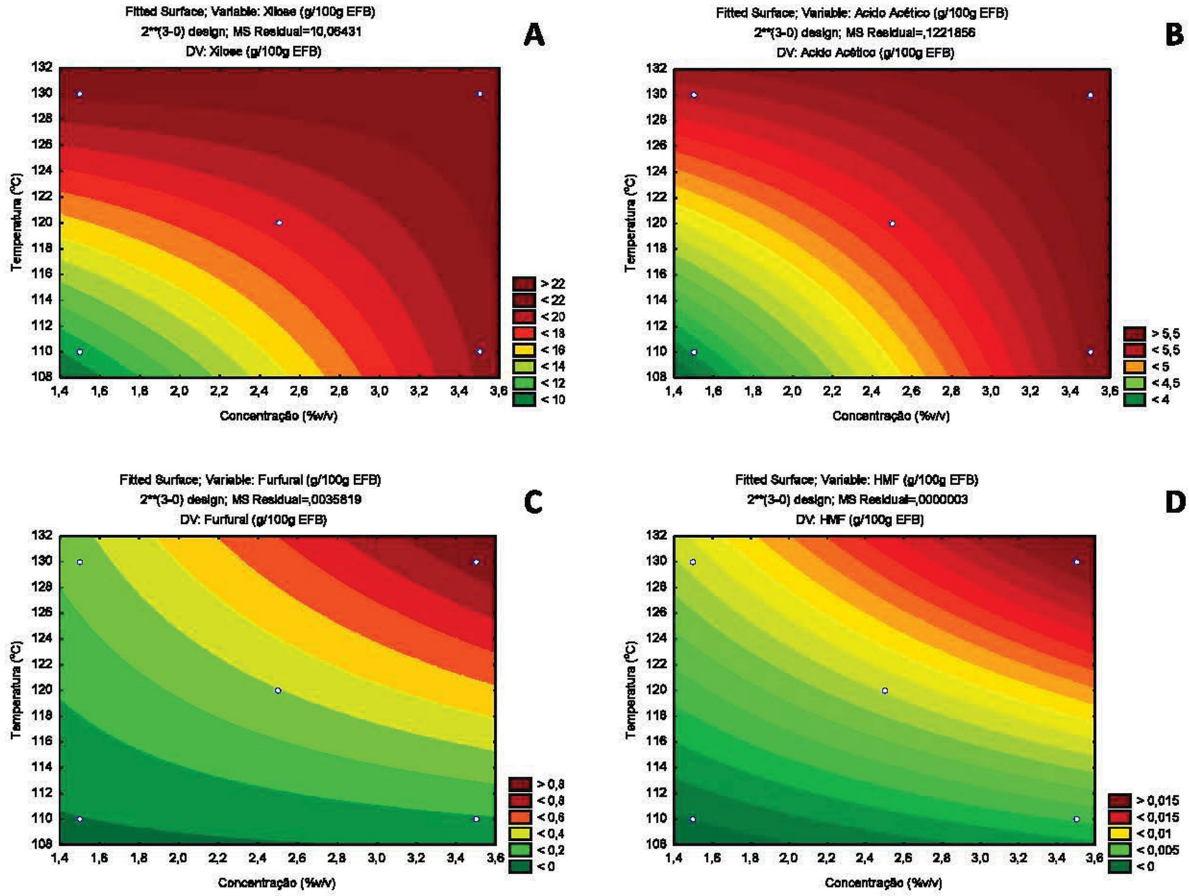
A determinação das melhores condições pode ser avaliada pela análise da superfície de contorno considerando os dois principais fatores, Temperatura e Concentração, mantendo o tempo fixo de 15 min. O tempo foi mantido em 15 min, pois de acordo com as análises anteriores, um maior tempo de exposição dos açúcares, leva a maior formação de furfural e HMF. A Figura 12 apresenta a superfície de contorno, para as variáveis respostas Recuperação de Xilose, Formação de ácido acético, Formação de Furfural e HMF.

Nas superfícies de contorno Figura 12, a formação de xilose a baixas temperaturas (110°C) só é favorecida por altas concentrações do ácido clorídrico, que neste caso também favorece a formação de ácido acético. Na temperatura de 130°C ocorre alta formação de xilose independente da concentração, podendo utilizar concentrações de ácido clorídrico até menores que 1,5%, reduzindo consideravelmente a formação de Furfural e HMF. Na temperatura de 120°C, a formação de xilose é favorecida pelo aumento da concentração acima de 2,5%. Nas temperaturas avaliadas a formação de ácido acético ocorre em valores intermediários (< 5,5g/100g de EFB), e a formação de Furfural e HMF são consideradas baixas.

Na literatura há poucos estudos de pré-tratamento de EFB com ácido clorídrico, nas condições estudadas para efeito de comparação. Mas similares pré-tratamentos a 120°C, com ácido clorídrico 2,5% (v/v) e tempos de 40 a 60min, foram reportados para outras biomassas como bagaço de sorgo (HEREDIA-OLEA; PÉREZ-CARRILLO; SERNA-SALDÍVAR, 2012), palha de milho (ZU et al., 2014) e palha de trigo (TOQUERO; BOLADO, 2014), com recuperações de xilose de 60-90% em relação ao material seco.

Pela análise estatística e avaliação dos resultados, melhores recuperações de xilose, com menor formação de furfural e HMF ocorrem a temperaturas mais altas, com baixa concentração de ácido e tempo. Neste caso, as superfícies de resposta, mostram uma tendência que as melhores recuperações são alcançadas em temperaturas entre 120 a 130°C, com concentração do ácido ≤ 2,5%, otimizando o tempo em torno de 15 min, para redução de custos.

FIGURA 12 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA:



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de EFB com Ácido Clorídrico.

Embora deva ser considerado os melhores rendimentos em termos de pentoses, uma estimativa de custo com relação às variáveis avaliadas (concentração de ácido, tempo e temperatura) é necessária para determinação das condições ótimas.

3.1.1.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento de EFB com ácido sulfúrico

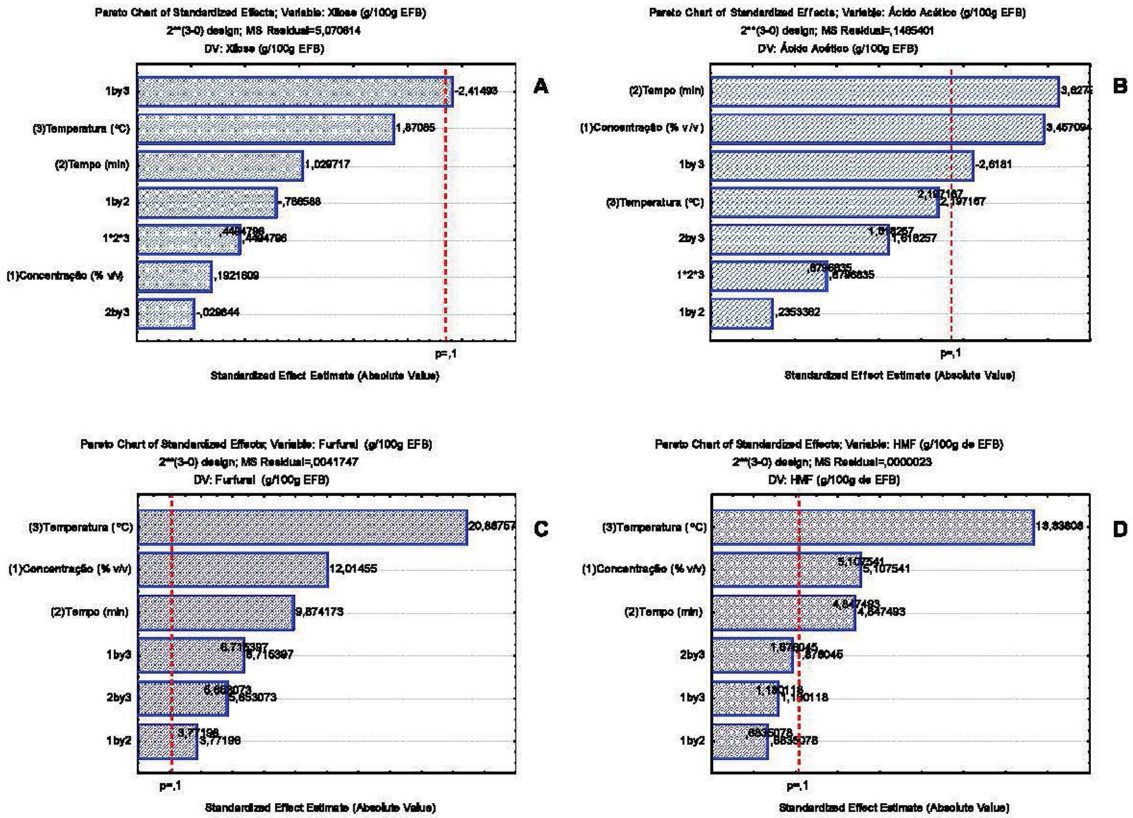
O pré-tratamento de EFB com ácido sulfúrico, apresentou comportamento semelhante ao pré-tratamento com ácido clorídrico a baixas temperaturas (110ºC), onde o aumento da concentração de ácido, favorece a recuperação de xilose (ensaios 2 e 4). A principal diferença observada está na recuperação da xilose em temperaturas elevadas.

Da tabela 6, observa-se que a 130°C o aumento da concentração do ácido provoca uma redução de 15% a 20% na recuperação de xilose e de 20 a 40% na recuperação de arabinose, dobrando a formação de furfural. Estes resultados demostram que embora a arabinose seja mais suscetível à desidratação, no pré-tratamento com ácido sulfúrico nas condições de maior severidade tanto a xilose como a arabinose sofrem reações de desidratação.

O aumento das reações de degradação das pentoses está relacionado com alto poder desidratante do ácido sulfúrico que combinado com alta temperatura provoca uma maior desidratação destes açúcares. De acordo com RIANSA-NGAWONG and PRASERTSAN, (2011), a elevação da temperatura acelera as velocidades das reações de desidratação, sendo a quantidade de produtos formados dependente do tempo de exposição.

Estes resultados são confirmados pela análise dos Diagramas de Pareto (Figura 13), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D), a um nível de 90% de confiança, nos quais confirmam que o aumento de todas as variáveis do pré-tratamento promovem uma maior formação de furfural e HMF. Para a formação de ácido acético, o tempo é o fator mais significativo, assim como a concentração e a interação entre a Concentração e a Temperatura. Para a variável resposta Recuperação de xilose, somente a interação Temperatura e Concentração apresentou ser significativa, sendo que as maiores recuperações de xilose são obtidas quando utiliza baixa concentração de ácido e temperatura elevada, ou a condição inversa.

FIGURA 13 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA EFB



FONTE: O autor (2016)

Nota: A - Formação de Xilose (R^2= 0,78); B - Formação de Ácido acético (R^2= 0,91); C - Formação de Furfural (R^2= 0,99); D - Formação de HMF (R^2= 0,98);

Avaliando os resultados do pré tratamento com ácido sulfúrico (Tabela 6) o melhor rendimento, 24,21g de xilose/100g de EFB, correspondeu a uma recuperação de 95,64%, apresentada nas condições do ensaio 7, o qual corresponde ao tratamento com 1,5% (v/v) de ácido sulfúrico por 75 min a 130ºC, com CSC de 1,83. Nesta condição a formação de ácido acético e furfural foram de 6,55 g e 0,96g em 100g de EFB, respectivamente, apresentando a formação de apenas 0,02g/100g de EFB de HMF.

A influência da concentração e do tempo pode ser avaliada pelos valores de ácido acético apresentado nos ensaios 1 e 4, e nos ensaios 5 e 8 (Tabela 6). Nestes ensaios, um aumento da concentração do ácido de 1,5% para 3,5%, e no tempo de 15 min para 75min, mantendo a temperatura constante ocorreu um aumento de 30-50% na formação do ácido acético.

Estudos conduzidos com ácido sulfúrico para pré-tratamento da biomassa de EFB, tem reportado significativa formação de ácido acético. JUNG et al. (2013) obteve

6,20 g/L de ácido acético, em pré-tratamentos conduzidos a 190°C, 1% de ácido por 3min; HERRERA-RUALES; ARIAS-ZABALA (2014), obteve 7,91g/L de ácido acético a 121°C, utilizando 2% de ácido sulfúrico por 30min. A formação de ácido acético está diretamente relacionada com a desacetilação da hemicelulose quando da hidrólise ácida, onde a quantidade liberada depende da porcentagem dos grupamentos acetil ligados à estrutura dos monossacarídeos na hemicelulose e as condições de hidrólise, principalmente quando ocorre o aumento de concentração de ácido e tempo.

Recuperações de xilose acima de 80%, foram observadas nos ensaios 2 (81,42%), ensaio 5 (87,22%) e ponto central (88,90% em média), nas quais apresentam baixa formação de furfural (≤ 0,76g/100g de EFB) e HMF (0,01g/100g de EFB), sendo que na condição do ensaio 2, não há formação de HMF e Furfural apresenta apenas 0,17g/100g EFB.

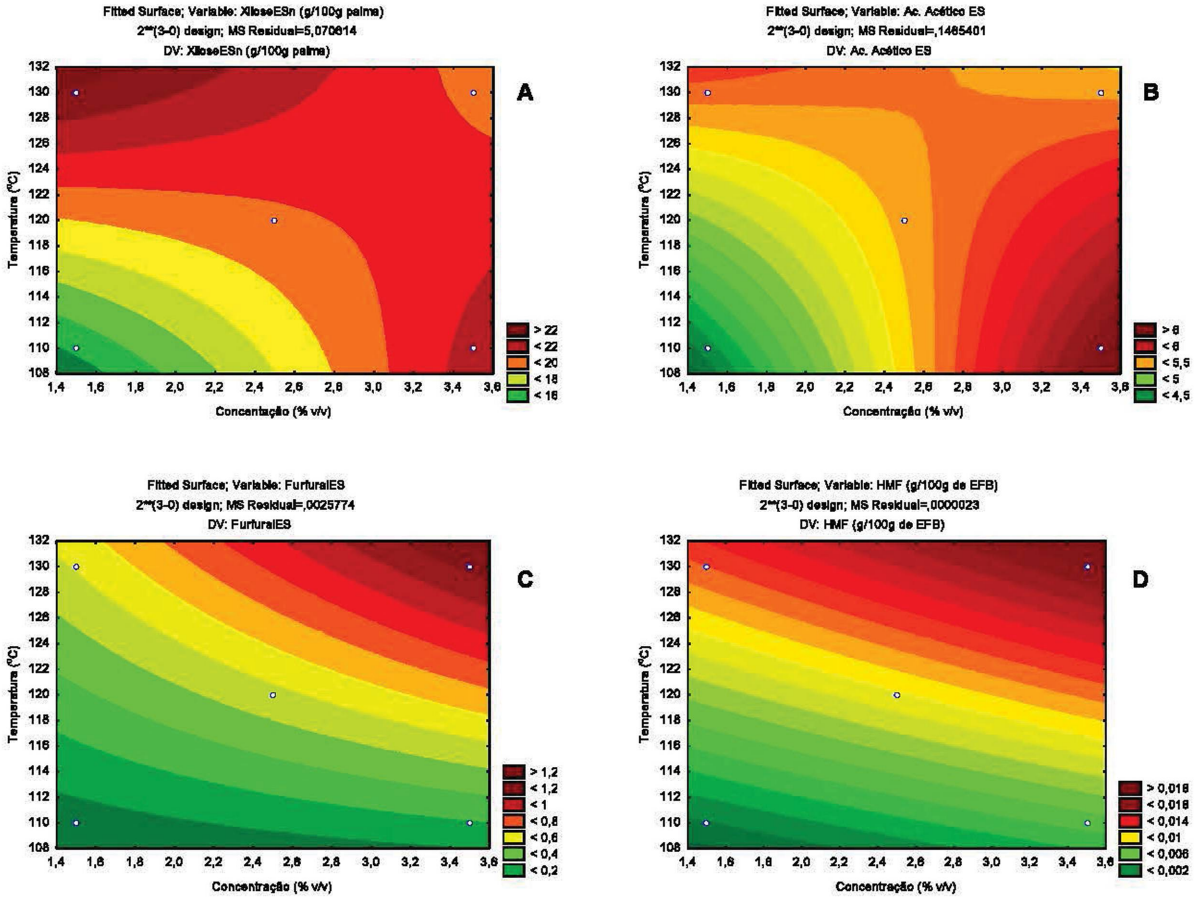
Para a determinação das melhores condições para pré-tratamento de EFB com ácido sulfúrico, foi avaliado a superfície de contorno (Figura 14) na qual foram plotados para as variáveis mais significativas do pré-tratamento: Temperatura e Concentração, mantendo o tempo fixo em 15min.

Na superfície de contorno da Figura 14A, observa-se que as maiores recuperações de xilose ocorrem tanto a altas temperaturas e baixa concentração (> 24g/10g EFB seco), ou uso de baixas temperaturas e altas concentrações do ácido. Nos dois casos ocorre baixa formação de Furfural e HMF, mas a concentração de ácido acético é maior na condição de alta concentração de ácido sulfúrico.

Neste caso, determinou-se que as melhores condições para pré-tratamento de EFB com ácido sulfúrico são: concentração de ácido de 1,5% (v/v), 15min a 130°C ou conduzir os pré-tratamentos nas condições de ponto central (2,5% (v/v), 45min a 120°C), que embora apresente na Figura 14A, menor formação de xilose, nestas condições ocorre significativa redução de ácido acético. Nesta condição CSC é de 1,13 e 1,6, respectivamente o que corresponde a tratamentos brandos, como proposto no estudo.

Desta forma, pré-tratamentos em temperaturas mais altas, utilizando menores concentrações de ácido sulfúrico e tempo, são importante para redução da formação de compostos secundários.

FIGURA 14 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de EFB com Ácido Sulfúrico.

3.1.2 **Pré-tratamento da fração da folha – Pecíolo**

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados para a hidrólise na fração da folha (Pecíolo) conduzida com ácido clorídrico e ácido sulfúrico, respectivamente. Da avaliação dos resultados, observa-se que as hidrólises do pecíolo, apresentaram os mesmos comportamentos em relação à formação de açúcares e produtos secundários dos pré-tratamentos realizados com EFB, ou seja, no pré-tratamento com ácido clorídrico, a recuperação de xilose a altas temperaturas não depende do tempo e da concentração do catalisador. Entretanto, em pré-tratamentos com ácido sulfúrico a altas temperaturas (130°C), o aumento na concentração do catalisador reduz a recuperação de xilose. Este comportamento já era esperado uma vez que na caracterização destes resíduos (Capítulo II), eles apresentaram pequenas diferenças na composição lignocelulósica.

Em todos os pré-tratamentos a maior formação de compostos secundários como ácido acético, furfural e HMF foram observadas nas condições de maior severidade do planejamento (ensaio 8) onde se utiliza 3,5% de ácido, 75 min a 130°C. Embora se observe uma menor formação de furfural que os hidrolisados ácidos de EFB, os hidrolisados do pecíolo apresentam maiores formações de HMF. Essas diferenças estão relacionadas com a composição lignocelulósica das frações, uma vez que o pecíolo possui 2% a mais de celulose e 5% a menos de hemicelulose.

Essas diferenças também foram observadas em relação à formação de glucose, o qual foi observado uma maior concentração deste açúcar nos hidrolisados do pecíolo. Estas concentrações de glucose são bem superiores (30 a 50%) a máxima determinada nos hidrolisados de EFB.

De acordo com PENG et al. (2012), há uma grande variação da composição dos monômeros que constituem a hemicelulose tanto para as diferentes biomassas, como para as partes que a constituem, como, galhos, caule, raízes, casca. Basicamente as hemiceluloses são compostas de xilanas β (1-4), principalmente D-xilose (90%) e L-arabinose (10%), e mínimas frações de β-D- Glucose, e ramificações de ácidos urônicos e grupos acetil que variam dependendo da natureza dos resíduos (GÍRIO et al., 2010; LIMAYEM; RICKE, 2012).

TABELA 7 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA A FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Ensaio	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g Pecíolo)							Total	
	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g EFB)	Recuperação de Xilose (%)
1	1,5	15	110	0,54	0,00	2,58	5,06	1,81	2,26	0,07	0,01	9,45	24,14
2	3,5	15	110	0,92	0,56	2,27	10,79	1,62	3,55	0,13	0,05	15,24	51,49
3	1,5	75	110	1,24	0,00	1,77	4,97	1,35	2,55	0,06	0,01	8,09	23,71
4	3,5	75	110	1,62	1,59	2,54	15,58	2,06	5,23	0,21	0,18	21,77	74,32
5	1,5	15	130	1,13	1,60	2,89	17,86	2,24	5,48	0,28	0,21	24,59	85,20
6	3,5	15	130	1,51	1,15	3,65	17,82	2,10	5,82	0,16	0,77	24,71	85,01
7	1,5	75	130	1,83	1,54	2,85	17,38	2,26	5,70	0,27	0,22	24,03	82,93
8	3,5	75	130	2,21	0,43	3,70	17,98	1,74	6,72	0,33	1,70	23,85	85,76
9	2,5	45	120	1,58	1,69	2,85	17,50	2,22	5,67	0,25	0,34	24,27	83,51
10	2,5	45	120	1,58	1,65	2,82	17,52	2,13	5,49	0,25	0,34	24,13	83,59
11	2,5	45	120	1,58	1,68	2,90	17,60	2,31	5,48	0,25	0,34	24,49	83,99

FONTE: O autor (2016).

TABELA 8 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA A FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g Pecíolo)							Total	
Ensaio	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g EFB)	Recuperação de Xilose (%)
1	1,5	15	110	0,54	0,19	2,16	9,60	1,56	2,74	0,08	0,02	13,51	45,80
2	3,5	15	110	0,92	1,06	2,26	14,45	1,88	4,34	0,16	0,11	19,66	68,94
3	1,5	75	110	1,24	0,91	2,60	13,31	1,98	5,16	0,17	0,08	18,81	63,50
4	3,5	75	110	1,62	1,44	2,65	14,64	1,89	4,97	0,15	0,27	20,61	69,85
5	1,5	15	130	1,13	1,65	2,45	17,26	2,18	5,02	0,21	0,34	23,55	82,35
6	3,5	15	130	1,51	0,61	3,37	15,07	1,79	4,91	0,07	0,77	20,84	71,89
7	1,5	75	130	1,83	1,10	3,59	17,76	2,12	5,35	0,14	0,61	24,57	84,74
8	3,5	75	130	2,21	0,65	4,07	16,79	1,90	5,75	0,09	1,09	23,41	80,10
9	2,5	45	120	1,58	1,26	3,34	16,81	2,14	5,44	0,15	0,49	23,54	80,19
10	2,5	45	120	1,58	1,29	3,28	16,38	2,22	5,38	0,15	0,47	23,17	78,13
11	2,5	45	120	1,58	1,23	3,36	16,77	2,09	5,49	0,15	0,49	23,45	80,00

FONTE: O autor (2016)

3.1.2.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré-tratamento da fração da folha (Pecíolo) com ácido clorídrico

Nas condições estudadas para o pré tratamento com ácido clorídrico para a fração do Pecíolo, os melhores rendimentos foram de 83 a 86%, que correspondem aos pré-tratamentos a 120ºC e 130 ºC.

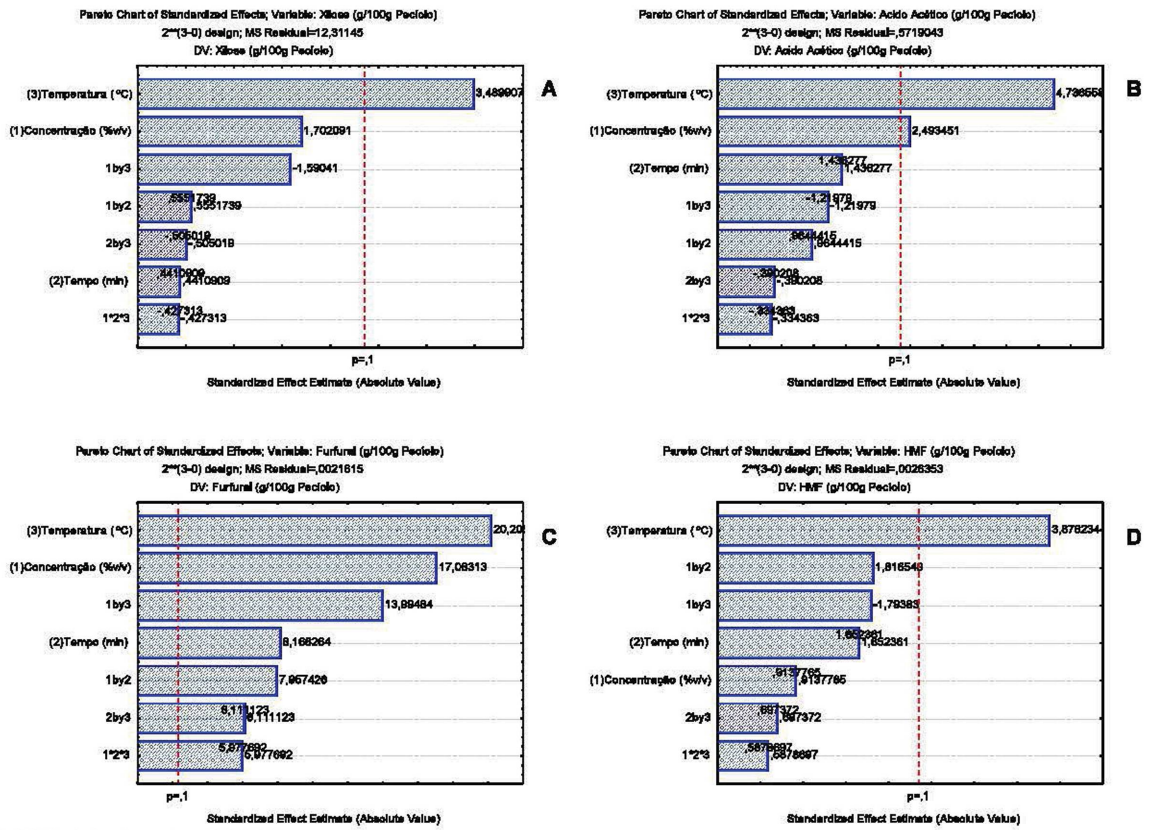
Em temperaturas mais baixas 110ºC a melhor recuperação foi 74,32% que corresponde ao pré-tratamento com 3,5% de ácido clorídrico por 75min (ensaio 4).

De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 15), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D) a um nível de 90% de confiança, para os pré-tratamento do pecíolo com ácido clorídrico, a variável mais significativa para todas as variáveis respostas foi à temperatura ($p<0,01$). No caso da formação de ácido acético a concentração do catalisador também se mostra significativa, sendo a formação de furfural influenciada por todas as variáveis e interações entre elas.

Ou seja, um aumento da temperatura e na concentração do pré-tratamento, promove uma maior hidrólise, consequentemente uma desacetilação da hemicelulose e degradação de parte dos açúcares formados.

Estes dados são confirmados avaliando os resultados da Tabela 7, onde os pré-tratamentos na temperatura de 130ºC obtiveram as maiores recuperações de xilose (85,76%) com 3,5% de ácido com maiores tempos de reação (75min), mas também apresentaram as maiores formações de ácido acético, furfural e HMF. Destes três compostos, o furfural foi o que apresentou uma maior variação quando do aumento de concentração de ácido e tempo (ensaios 5 e 8). Para o ácido acético e HMF estas variações foram menores em torno de 20%.

FIGURA 15 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA PECÍOLO



FONTE: O autor (2016).

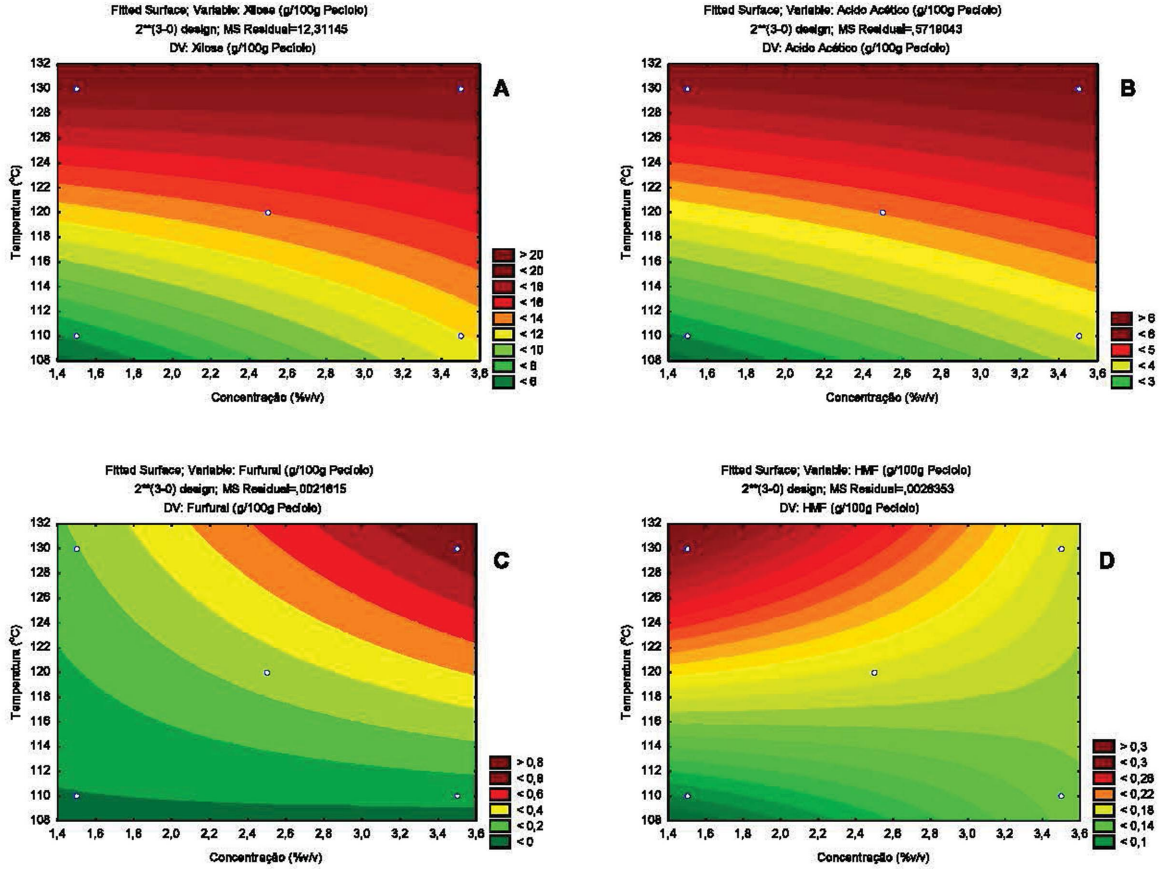
NOTA: A - Formação de Xilose (R^2= 0,85); B - Formação de Ácido acético (R^2= 0,91), C - Formação de Furfural (R^2= 0,96); D - Formação de HMF (R^2= 0,88).

Pela análise da superfície de contorno para pré-tratamento de Pecíolo com ácido clorídrico (Figura 16), é possível avaliar as melhores condições para o pré-tratamento. As superfícies foram plotadas para as variáveis mais significativas do pré-tratamento: Temperatura e Concentração, mantendo o tempo fixo em 15min.

Da Figura 16A observa-se que para pré-tratamento do Pecíolo com ácido clorídrico em tempos reduzidos de 15 min, é possível trabalhar com uma ampla faixa de concentrações de ácido, em temperaturas acima de 120°C, embora nesta região também se obtenha altas concentrações de ácido acético (Figura 15B).

A presença de ácido acético será sempre observada nos hidrolisados, sendo o grupo acetil um constituinte da estrutura hemicelulósica. A concentração de ácido acético nos hidrolisados deve ser minimizada para reduzir o efeito inibitório nos processos subsequentes de fermentação. De acordo com OLIVA et al. (2003), concentrações de ácido acético abaixo de 10g/L não tem efeito inibidor em processos de fermentação. A formação de compostos inibidores deve ser visto com ressalvas, e sempre que possível estabelecer condições que minimizem sua formação.

FIGURA 16 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA:



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de Pecíolo com Ácido Clorídrico.

Avaliando as Figuras 16C e D, para formação de Furfural e HMF, respectivamente, observa-se que nas hidrólises conduzidas em altas temperaturas e concentrações do catalisador aumenta a formação de furfural e diminui a formação de HMF, em contrapartida ao trabalhar com altas temperaturas e baixas concentrações do ácido há uma maior formação de HMF, (<0,33g/100g de Pecíolo), mas nestas concentrações não são consideradas inibidoras.

Desta forma, as melhores condições em relação aos ensaios realizados seria trabalhar a 130^{0}C, em tempos e concentrações de catalisador reduzidos, ou a 120^{0}C com concentrações de 2,5% e tempos de 45min, podendo neste caso otimizar a concentração do catalisador e do tempo nesta temperatura para redução de custos. A avaliação de custos deve ser realizada para a determinação das melhores condições.

3.1.2.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (ºC) e concentração do ácido, no pré-tratamento da fração da folha (Pecíolo) com ácido sulfúrico

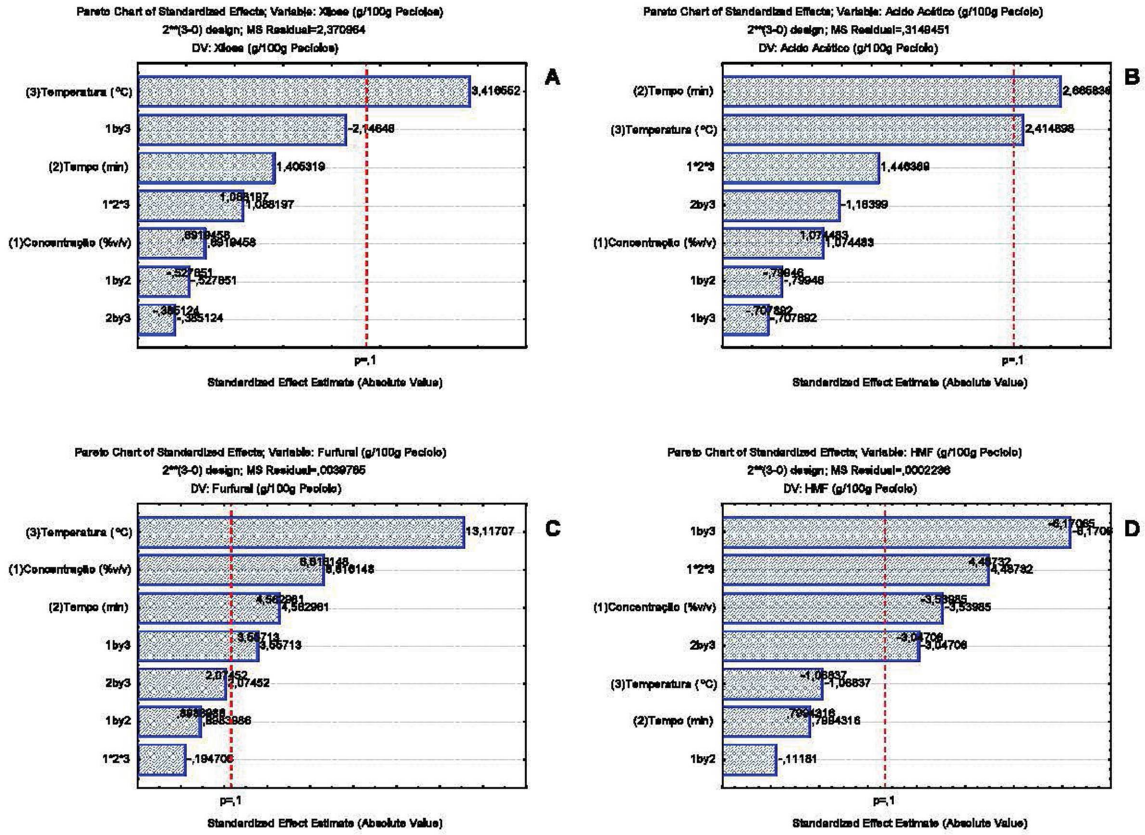
Pela análise da Tabela 8, observa-se que os rendimentos em termos de xilose pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico para o pecíolo, foram próximos aos observados para ácido clorídrico, com recuperações de 80 a 85%.

Assim como observado para a hidrólise de EFB com ácido sulfúrico, o aumento da concentração do ácido nos ensaios a 130ºC (ensaios 6 e 8) reduziram a recuperação de xilose, assim como o de arabinose, aumentando a formação de furfural. Sendo este aumento de furfural mais expressivo com o aumento do tempo de hidrólise de 15 para 75 min.

De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 17), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D) a um nível de 90% de confiança, para os pré-tratamento do Pecíolo com ácido sulfúrico, a variável mais significativa para a hidrólise da hemicelulose é a temperatura ($p<0,01$), seguida do tempo para o ácido acético e furfural. A interação entre a concentração do catalisador e a temperatura é mais significativa na formação de Furfural e HMF.

Ou seja, embora hidrólises à temperatura mais alta aumente a hidrólise da hemicelulose, altas temperaturas em conjunto com o aumento da concentração e do tempo provocam a desidratação dos açúcares e consequentemente o aumento na formação de furfural e HMF.

FIGURA 17 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA DA FRAÇÃO DA FOLHA (PECÍOLO).



FONTE: O autor (2016).
Nota: A - Formação de Xilose (R^2= 0,86); B - Formação de Ácido acético (R^2= 0,92), C - Formação de Furfural (R^2= 0,98) e D - Formação de HMF (R^2= 0,96).

Esta observação, é relatada por LARSSON et al. (1999), quando da hidrólise com ácido sulfúrico para "*softwood*", o qual observou que um aumento no CSC, devido o aumento na temperatura, provoca uma diminuição no rendimento dos monossacarídeos que coincide com um aumento na concentração de furfural e HMF. O aumento na concentração de furfural e HMF está diretamente relacionado com a degradação das pentoses e hexoses, respectivamente (BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS, 2014).

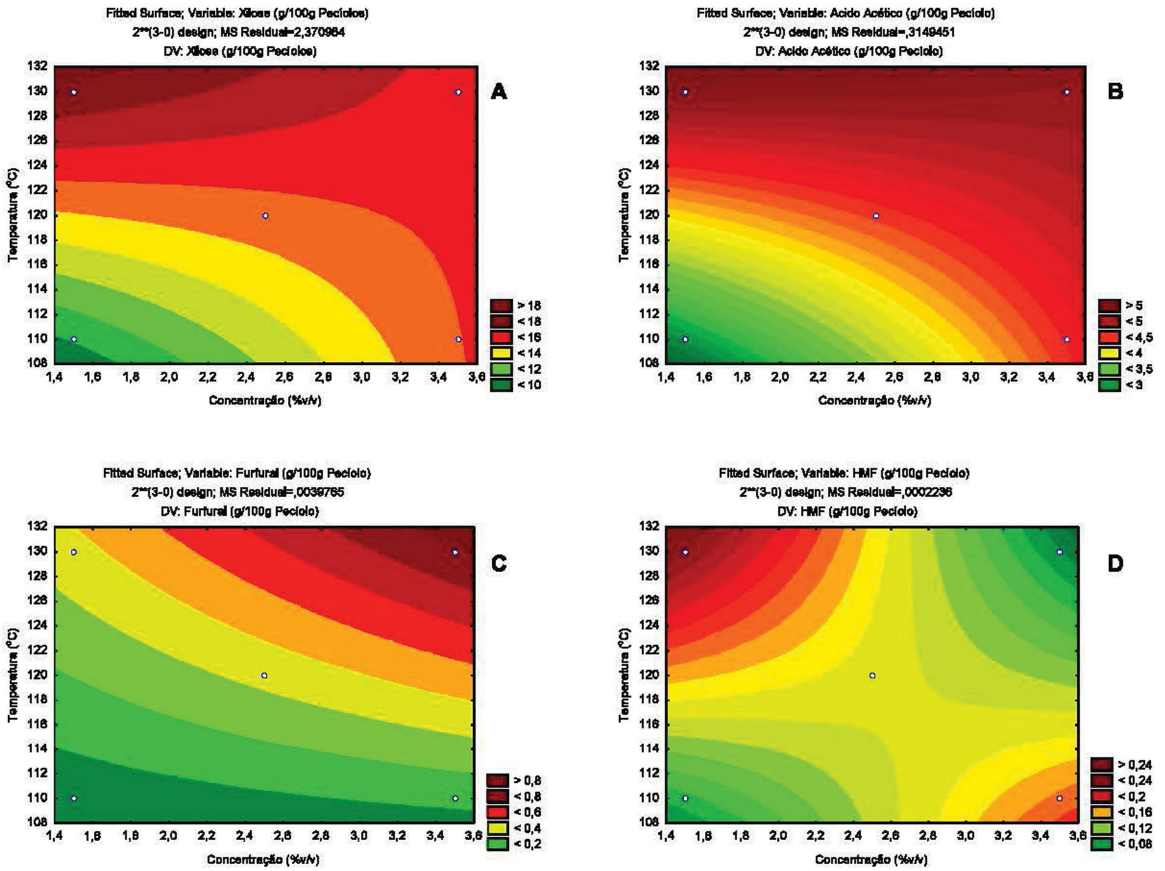
FERRER e colaboradores (2013), também relatam que condições mais brandas, principalmente com relação a tempo, são mais eficientes na recuperação de xilose quando da hidrólise de EFB com ácido sulfúrico. Eles também concluíram que há uma forte influência da temperatura e sua interação com o tempo na recuperação da xilose.

Da Figura 18, superfície de contorno para pré-tratamento de Pecíolo com ácido sulfúrico, avalia-se que as condições em que seja possível obter maior rendimento de xilose utilizando baixos tempos de reação, seria trabalhar a 130°C

com baixas concentrações de catalisador, mas nestas condições ocorre a formação de ácido acético e HMF. Embora nestas condições estas concentrações não sejam consideradas inibidoras, uma outra condição seria trabalhar nas condições do ponto central.

Ao trabalhar na temperatura em torno de 120ºC (ponto central), em tempos reduzidos (15min) é possível trabalhar com concentrações em torno de 2,5% de ácido sulfúrico, obtendo rendimentos de xilose em torno 16g/100g Pecíolo, o qual representam uma redução de apenas 10% na formação de xilose e de ácido acético, mas de 40% na formação de HMF.

FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA.



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de Pecíolo com Ácido Sulfúrico.

Uma avaliação dos custos dos pré-tratamentos nas condições avaliadas, assim como uma otimização do tempo e da concentração do catalisador nas hidrólises conduzidas nas temperaturas de 120ºC e 130ºC é necessário para a determinação das melhores condições.

3.1.3 **Pré-tratamento da fração da folha – Folíolo**

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados para a hidrólise do Folíolo conduzida com ácido clorídrico e ácido sulfúrico, respectivamente.

As maiores recuperações de xilose da fração hemicelulósica do folíolo foi em torno de 71 a 79%, uma redução em média de 12% em relação às máximas recuperações obtidas pelas outras frações. Esta redução, provavelmente está relacionada com o alto teor de cinzas (6,39%) apresentado pela fração dos folíolos, em relação aos outros resíduos, que quando em solução provoca um efeito tampão do meio, reduzindo as reações de hidrólise; Uma segunda hipótese está associada a porcentagem de lignina, o folíolo apresenta em sua composição uma maior porcentagem deste composto (40,55%), que EFB (20,74%) e Pecíolo (14,79%), o que dificultaria a acessibilidade do ácido a estrutura hemicelulósica.

A formação de ácido acético foi baixa quando comparada aos outros resíduos da palma (pecíolo e EFB), este resultado já era esperado, devido à baixa porcentagem do grupamento acetil apresentado na caracterização do resíduo (Capítulo II). Uma maior formação de arabinose foi observada mesmo a temperatura mais baixa de 110ºC, devido a sua maior facilidade em hidrolisar na estrutura hemicelulósica.

Para ensaios conduzido na temperatura de 130ºC, o aumento da concentração do catalisador favorece a formação de compostos secundários, sendo este aumento mais pronunciado no ensaio de maior CSC do planejamento (ensaio 8), em que também se observa maior formação de furfural, como observado para as frações do pecíolo e do EFB.

As maiores recuperações de xilose (74-79%) foram observadas para os ensaios conduzidos com ácido sulfúrico como catalisador, sendo as máximas recuperações observadas nas temperaturas de 120 ºC e 130 ºC

TABELA 9 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO (HCl) PARA FRAÇÃO DA FOLHA (FOLÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g folíolo)							Total	
Ensaio	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g folíolo)	Recuperação de Xilose (%)
1	2	15	80	0,19	0,00	0,00	0,05	0,08	0,11	0,00	0,00	0,13	0,38
2	4	15	80	0,52	0,01	0,05	0,06	0,99	0,28	0,00	0,00	1,12	0,44
3	2	75	80	0,89	0,00	0,05	0,05	1,08	0,22	0,00	0,00	1,18	0,38
4	4	75	80	1,22	0,00	0,09	0,18	1,74	0,73	0,01	0,01	2,00	1,25
5	2	15	120	0,78	0,11	0,59	3,98	1,81	1,38	0,01	0,01	6,49	28,37
6	4	15	120	1,11	0,62	1,13	6,87	1,63	2,30	0,03	0,07	10,25	49,03
7	2	75	120	1,48	0,47	0,96	4,57	1,62	2,04	0,03	0,06	7,62	32,57
8	4	75	120	1,81	0,04	1,33	6,71	1,37	2,32	0,04	0,24	9,46	47,89
9	3	45	110	1,24	0,17	0,61	4,37	1,63	1,67	0,01	0,01	6,78	31,14
10	3	45	110	1,24	0,17	0,62	4,37	1,66	1,66	0,01	0,01	6,82	31,16
11	3	45	110	1,24	0,17	0,62	4,35	1,56	1,65	0,01	0,01	6,70	31,01

FONTE: O autor (2016).

TABELA 10 - RENDIMENTO DOS AÇÚCARES E PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO OBTIDOS NO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) PARA FRAÇÃO DA FOLHA (FOLÍOLO) NAS CONDIÇÕES DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

Ensaio	Condições				Rendimento dos hidrolisados (g/100g folíolo)							Total	
	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (ºC)	CSC	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural	Açúcar Redutor (g/100g folíolo)	Recuperação de Xilose (%)
1	2	15	80	0,25	0,01	0,04	0,03	0,60	0,15	0,00	0,00	0,68	0,25
2	4	15	80	0,63	0,01	0,06	0,08	1,21	0,31	0,00	0,00	1,36	0,54
3	2	75	80	0,95	0,01	0,06	0,11	1,39	0,36	0,00	0,00	1,56	0,79
4	4	75	80	1,33	0,00	0,15	0,59	1,94	0,88	0,01	0,01	2,69	4,18
5	2	15	120	0,84	0,35	0,74	5,19	1,48	1,37	0,02	0,03	7,76	37,03
6	4	15	120	1,22	0,49	1,24	6,92	1,42	2,36	0,04	0,13	10,06	49,35
7	2	75	120	1,54	0,52	1,20	6,78	1,55	2,41	0,04	0,14	10,06	48,39
8	4	75	120	1,92	0,26	1,53	6,84	0,84	2,52	0,04	0,40	9,46	48,76
9	3	45	110	1,29	0,43	1,06	5,76	1,66	2,19	0,01	0,03	8,91	41,10
10	3	45	110	1,29	0,43	1,06	5,79	1,66	2,17	0,02	0,03	8,95	41,32
11	3	45	110	1,29	0,46	1,12	5,72	1,69	2,10	0,01	0,03	8,98	40,80

FONTE: O autor (2016).

3.1.3.1 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (ºC) e concentração do ácido, no pré tratamento com ácido clorídrico para a fração da folha (Folíolo)

Nas condições estudadas para o pré tratamento com ácido clorídrico do Folíolo, a maior recuperação de xilose (79,41%) foi apresentada na condição do ensaio 4, onde se utilizou a temperatura de 110ºC com 3,5% (v/v) de ácido, por 75min. Nesta condição (ensaio 4), também foi observado maior rendimento de glicose e formação de ácido acético.

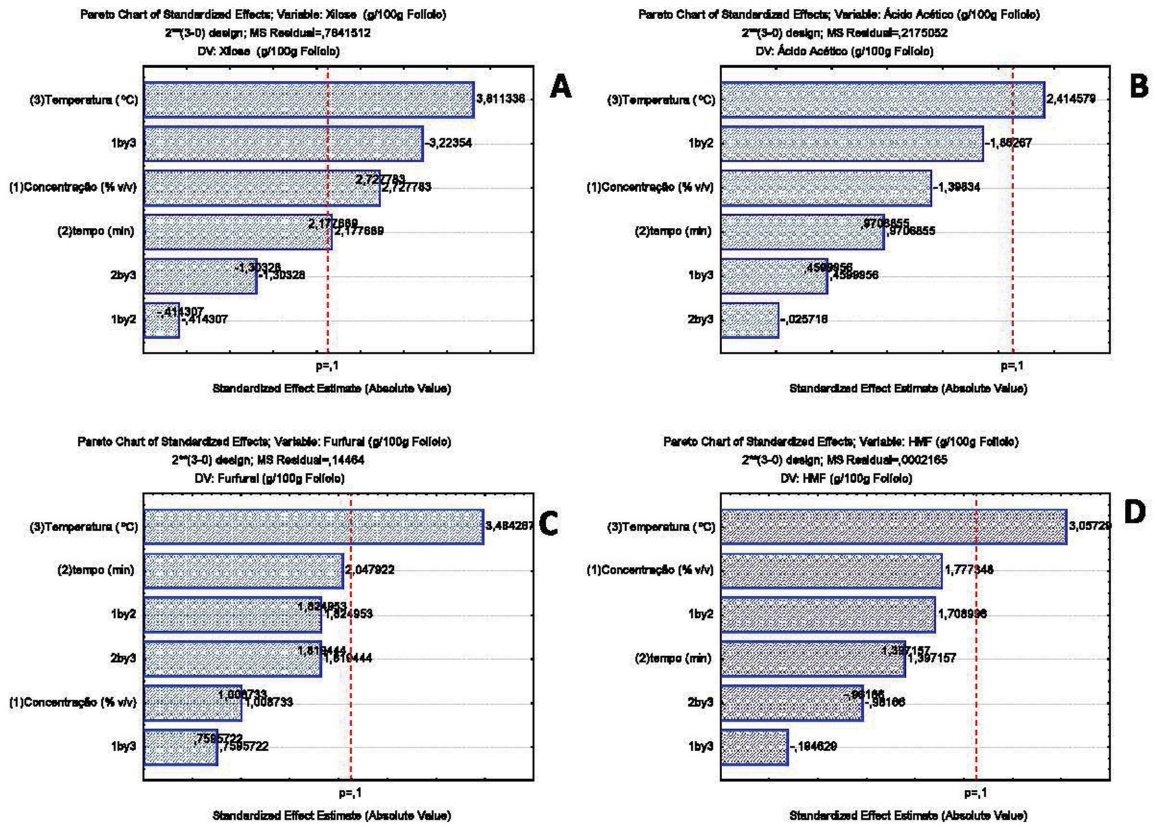
De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 19), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D) a um nível de 90% de confiança, a temperatura apresentou ser a variável mais significativa ($p<0,01$) para todas as variáveis resposta. Sendo a única variável a influenciar na formação dos compostos secundários.

A formação de xilose apresentou ser influenciada pelas variáveis: temperatura, concentração, tempo e a interação entre a temperatura e a concentração, sendo a temperatura a variável mais significativa.

A interação temperatura e concentração, apresentou ter efeito negativo, principalmente para temperatura mais baixa do planejamento (110ºC), ou seja, para uma maior recuperação de xilose utiliza-se de temperaturas mais baixas e altas concentrações ou o inverso. Para temperaturas mais elevadas (130ºC), este efeito não foi tão proncunciado.

Como observado para as demais frações (pecíolo e EFB), ensaios conduzidos com ácido clorídrico como catalisador, nas temperatura de 120 ºC e 130ºC não apresentam diferenças significativas com relação a recuperação de xilose, quando da variação do tempo e da concentração do ácido (Tabela 9). As principais diferenças são observadas na formação dos compostos secundários, especialmente para o ácido acético e o furfural.

FIGURA 19 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO CLORÍDRICO PARA O FOLÍOLO DA PALMA.



FONTE: O autor (2016).
Nota: A - Formação de Xilose (R^2= 0,90); B -Formação de Ácido acético (R^2= 0,75), C - Formação de Furfural (R^2= 0,86); D - Formação de HMF (R^2= 0,86);

Estas condições podem ser avaliadas com as superfícies de contorno (Figura 20) para pré-tratamento de Folíolo com ácido clorídrico. Na Figura 20 A, a recuperação de xilose em hidrólises conduzidas em 15 minutos, é favorecida com uso de temperatura em torno de 130ºC em uma ampla faixa da concentrações do ácido clorídrico. O mesmo comportamento é observado para a formação de Furfural e HMF (Figura 20 C e 20 D, respectivamente), embora nesta condição as concentrações destes compostos sejam baixas e de acordo com a literatura não promovem efeito inibitório.

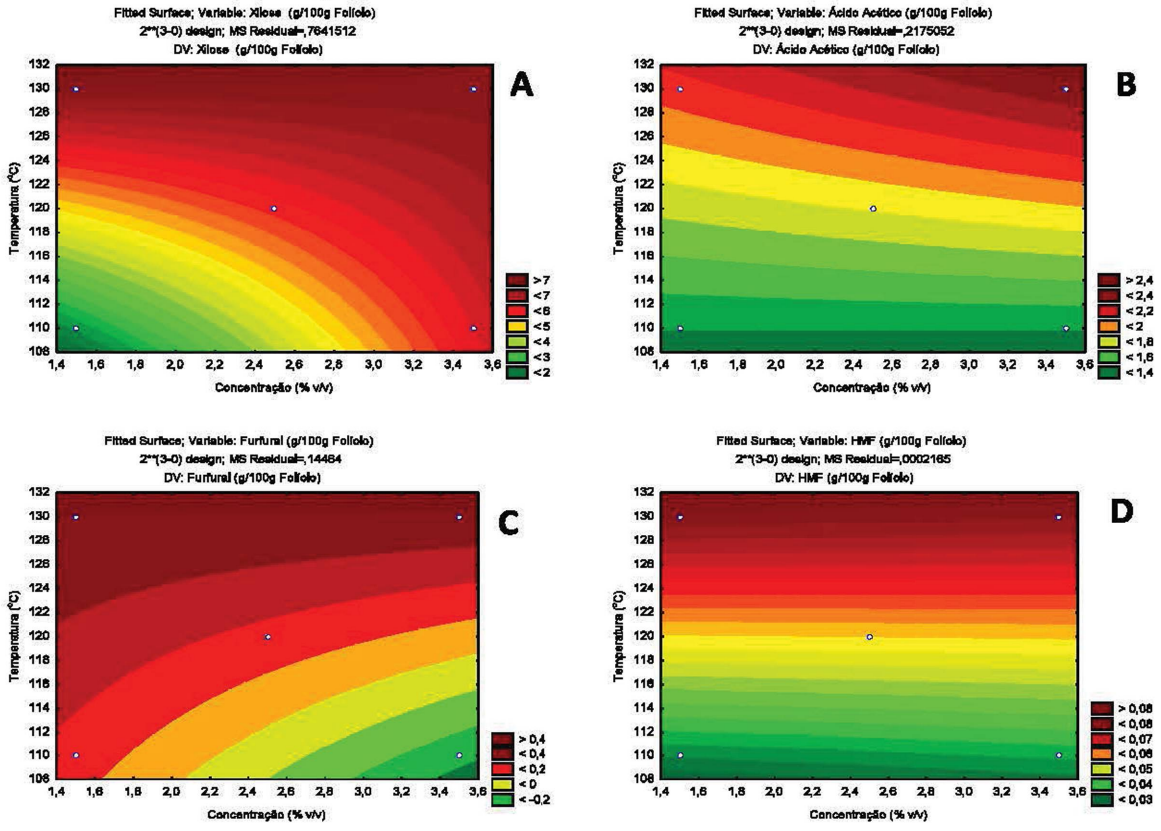
Na temperatura de 130ºC a formação de ácido acético (Figura 20 B) é reduzida quando do uso de concentrações reduzidas de ácido clorídrico.

Dos resultados obtidos, verifica-se que embora a hidrólise conduzida na condição 4 tenha apresentado uma maior recuperação de xilose (79,41%), a análise estatística indica que hidrólises conduzidas a 130ºC, em tempos reduzidos de 15

minutos e baixa concentração de ácido clorídrico, em torno de 1,5% de ácido, é possível aumentar a recuperação da xilose, reduzindo a formação de compostos secundários como ácido acético, furfural e HMF, como apresentado pelo ensaio 5 (130ºC com 1,5% (v/v) de ácido, por 15min). Na condição do ensaio 5 (Tabela 9) embora ocorra uma redução de 10% na formação de xilose, reduz em torno de 60% a formação de ácido acético e HMF e a um terço a formação de Furfural.

Desta forma, o ensaio 5 foi considerado a melhor condição para a recuperação de xilose da fração hemicelulósica do folíolo, embora uma análise de custo seja adequada para a escolha final.

FIGURA 20 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de Folíolo com Ácido Clorídrico.

3.1.3.2 Efeito das variáveis tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração do ácido, no pré tratamento com ácido sulfúrico para fração da folha (Folíolo)

Para o pré-tratamento do Folíolo com ácido sulfúrico, as melhores recuperações de xilose (em torno de 79%) foram apresentadas pelos ensaios 5 e 7 a 130ºC e nos ensaios 9, 10 e 11 (condição de ponto central) que correspondem aos ensaios conduzidos a temperatura de 120ºC, com máximo rendimento de xilose de 8,3g/100g de folíolo seco.

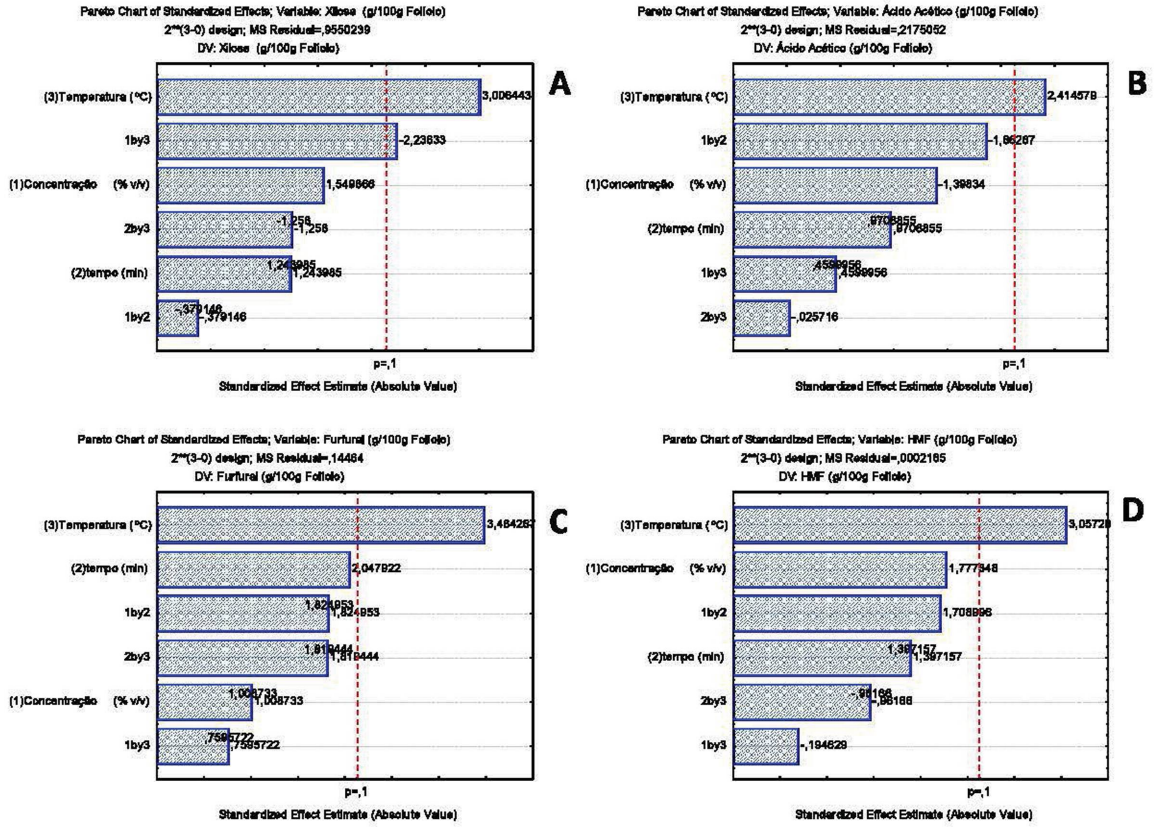
Nas condições de maior recuperação, a principal diferença entre os ensaios está na formação dos compostos secundários, principalmente ácido acético e furfural. A determinação da melhor condição foi realizada através da análise estatística.

De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 21), para as variáveis respostas, Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido acético (B), Formação de Furfural (C) e Formação de HMF (D) a um nível de 90% de confiança, para os pré-tratamento do Folíolo com ácido sulfúrico, a variável mais significativa ($p<0,01$) foi à Temperatura para todas as variáveis resposta. Sendo a única variável a influenciar na formação dos compostos secundários.

Para a recuperação de xilose, a temperatura e sua interação com a concentração apresentaram ser significativas ($p<0,01$), sendo a interação de efeito negativo. Estes resultados são semelhantes aos observados para a hidrólise do folíolo com ácido clorídrico.

Estes resultados podem ser avaliados pela Tabela 10. Para hidrólises conduzidas a 110ºC e a 130ºC, as maiores recuperações de xilose foram observadas nas condições de maior concentração do ácido (3,5%v/v), e menor concentração do ácido (1,5%v/v), respectivamente. Os compostos secundários, ácido acético, furfural e HMF tiveram maior formação na temperatura de 130ºC, especialmente na condição de maior severidade do planejamento (ensaio 8).

FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 2^3 DO PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO PARA O FOLÍOLO DA PALMA.



FONTE: O autor (2016).
Nota: A - Formação de Xilose (R^2= 0,83); B - Formação de Ácido acético (R^2= 0,75), C - Formação de Furfural (R^2= 0,86) e D - Formação de HMF (R^2= 0,82).

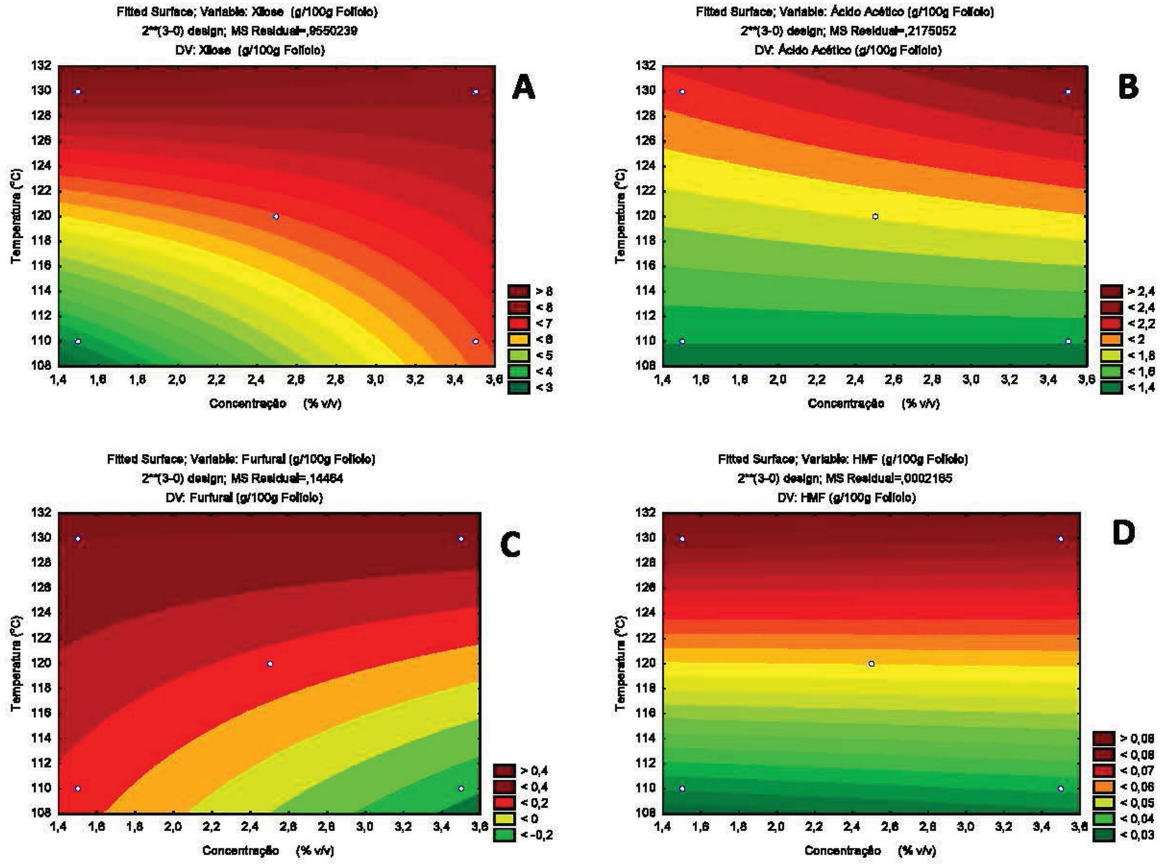
Para a determinação da melhor condição para recuperação da xilose, com baixa formação de ácido acético entre as condições que obtiveram as melhores recuperações (ensaios 5, 7 e ponto central), as superfícies de contorno, Figuras 22 A, B, C e D foram avaliadas.

Observa-se da Figura (22A), para hidrólises conduzidas em 15 minuto, que a recuperação de xilose é favorecida em temperaturas mais elevadas (120ºC e 130ºC). Para hidrólises a 120ºC, a recuperação da xilose é favorecida pelo uso de altas concentrações de ácido, sendo que 130ºC, uma maior recuperação é obtida em toda faixa de concentração estudada.

Da Figura 22B, observa-se que a formação de ácido acético aumenta quando se utiliza altas temperaturas e altas concentrações. A formação de Furfural e HMF (Figura 22 C e 22D, respectivamente), apresentam o mesmo comportamento observado para a recuperação da xilose.

Desta forma, hidrólises conduzidas a 130°C, com baixos tempos de hidrólise e baixa concentração de ácido (ensaio 5) são favoráveis para a recuperação de xilose com baixa formação de ácido acético, furfural e HMF. Embora, uma condição tenha sido estabelecida, é possível otimizar as variáveis, temperatura, concentração do catalisador e tempo para reduzir a formação principalmente de ácido acético e furfural, maximizando a recuperação de xilose.

FIGURA 22 - SUPERFÍCIE DE CONTORNO COM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS TEMPERATURA E CONCENTRAÇÃO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTA



FONTE: O autor (2016).
NOTA: Recuperação de Xilose (A); Formação de Ácido Acético (B); Formação de Furfural (C); Formação de HMF (D) em Pré-Tratamento de Folíolo com Ácido Sulfúrico.

3.2 ESTIMATIVA DOS CUSTOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Os custos dos pré-tratamentos foram determinadas para todas as condições dos planejamentos, para as frações de EFB, Pecíolo e Folíolo. Com a estimativa de custo, é possível avaliar as condições técnicas e econômicas que viabilizam a recuperação da xilose com baixa formação de compostos secundários.

O custo do ácido clorídrico foi estimado em R$ 0,92/Kg, para ácido sulfúrico R$0,41/Kg e o custo do vapor foi estimado para agroindústrias em torno de R$100/ton, estes valores representam a média dos valores comercializados por empresas.

O valor estimado para cada pré-tratamento foi determinado em relação à quantidade de xilose recuperada em cada condição.

3.2.1 **Estimativa dos custos para os planejamento com a fração de EFB**

A Estimativa de Custo para os pré-tratamentos realizados com EFB, utilizando como catalisadores ácido clorídrico e sulfúrico são apresentados na Tabela 11. Nas tabelas encontra-se em negrito as condições com maior recupeção de xilose com baixa formação de compostos secundários.

TABELA 11 - ESTIMATIVA DE CUSTOS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE EFB

	Condições			**Custo do Pré-tratamento**			
				HCL		**H_2SO_4**	
Ensaio	**Ácido (%)**	**Tempo (min)**	**Temp. (ºC)**	**(R$/ kg xilose)**	**Xilose (g/100g EFB)**	**(R$/ kg xilose)**	**Xilose (g/100g EFB)**
1	1,5	15	110	2,95	9,41	1,39	14,49
2	3,5	15	110	2,39	19,27	1,37	20,61
3	1,5	75	110	2,42	12,84	1,29	18,14
4	3,5	75	110	2,18	22,68	1,55	20,33
5	1,5	15	130	1,52	**20,28**	1,05	**22,08**
6	3,5	15	130	2,37	20,78	1,64	19,07
7	1,5	75	130	1,53	**22,79**	1,12	24,21
8	3,5	75	130	2,34	22,72	1,75	20,13
PC	2,5	45	120	1,78	**22,60**	1,22	**22,50**

FONTE: O autor (2016).

Da Tabela 11, observa-se que as condições com menor custos são as que hidrolizam a 130ºC, com 1,5(%v/v) de catalisador para os tempos de 15 e 75 min. Nestas condições para o tempo de 75 min (ensaio 7), é a condição em que se observa maiores recuperações de xilose, embora para ácido sulfúrico esta condição apresenta

alta formação de furfural. Da análise estatística para pré-tratamento de EFB com ácido clorídrico e sulfúrico (itens 3.1.1.1 e 3.1.1.2), verificou-se que há uma tendência em aumentar a recuperação de xilose com o uso de altas temperaturas, reduzindo a formação de compostos secundários com o uso de baixas concentrações do catalisador e reduzidos tempos de hidrólise, sendo neste caso, o ensaio 5 a melhor condição. Embora esta condição, apresente uma redução de 11% na recuperação de xilose, em relação ao ensaio 7, com a otimização em relação a concentração do ácido e tempo é possível aumentar a recuperação de xilose com redução dos custos.

A condição de ponto central, também é uma condição favorável é deve ser otimizada para redução de custo, uma vez que apresenta alta recuperação de xilose.

Observa-se que os custo com pré-tratamento com ácido sulfúrico para a condição determinada (ensaio 5) é 40% menor em relação ao ácido clorídrico. Este menor custo está relacionado com o valor do ácido, e pela maior recuperação de xilose nesta condição. O uso de condições em que se reduz o tempo e a porcentagem de ácido com pequenas perdas na recuperação do produto principal é uma das alternativas na redução dos custos em pré-tratamento.

3.2.2 **Estimativa dos custos para os planejamento com a fração de Pecíolo**

A Estimativa de Custo para os pré-tratamentos realizados com Pecíolo, utilizando como catalisadores ácido clorídrico e sulfúrico são apresentados na Tabela 12, sendo as condições de maior recuperação de xilose marcadas em negrito.

Da Tabela 12, para avaliação de custo para pré tratamento de pecíolo, os menores custos são observados nas condições 5 para ambos os ácidos, que coincide com a avaliação estatística (itens 3.1.2.1 e 3.1.2.2). A condição de ponto central seria uma segunda opção, embora apresente um custo mais elevado (18 a 25%), mas com a otimização do tempo e da concentração de catalisador, é possível aumentar a recuperação da xilose reduzindo os custos.

TABELA 12 - ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRÉ-TRATAMENTO DE PECÍOLO

Condições	**Custo do Pré-tratamento**	
	HCL	**H_2SO_4**

Ensaio	Ácido (%)	Tempo (min)	Temp. (°C)	(R$/ kg xilose)	Xilose (g/100g Pecíolo)	(R$/ kg xilose)	Xilose (g/100g Pecíolo)
1	1,5	15	110	5,49	5,06	2,09	9,60
2	3,5	15	110	4,27	10,79	1,95	14,45
3	1,5	75	110	6,25	4,97	1,76	13,31
4	3,5	75	110	3,17	15,58	2,15	14,64
5	1,5	15	130	1,73	**17,86**	1,34	**17,26**
6	3,5	15	130	2,76	17,82	2,07	15,07
7	1,5	75	130	2,01	17,38	1,53	17,76
8	3,5	75	130	2,96	17,98	2,10	16,79
PC	2,5	45	120	2,30	**17,50**	1,65	**16,70**

FONTE: O autor (2016).

3.2.3 Estimativa dos custos para os planejamento com a fração do Folíolo

A Estimativa de Custo para os pré-tratamentos realizados com Folíolo, utilizando como catalisadores ácido clorídrico e sulfúrico são apresentados na Tabela 13. Observa-se que os custos para o pré-tratamento do Folíolo foram superiores aos custos para EFB e Pecíolo, devido o baixo rendimento de xilose para esta biomassa.

Os menores custos de produção, R$3,29/Kg de xilose e R$2,18/Kg de xilose), para os pré-tratamentos de folíolo com ácido clorídrico e sulfúrico, respectivamente, foram apresentados na condição do ensaio 5, o qual apresenta maiores recuperações de xilose com baixa formação de ácido acético, furfural e HMF, utilizando temperaturas de 130°C, em tempos de 15 minutos e concentrações de catalisador de 1,5%(v/v).

Embora a condição do ensaio 5, para o ácido clorídrico não seje a condição de maior recuperação de xilose, com a otimização das condições de concentração do ácido e tempo é possível obter melhores rendimentos.

TABELA 13 - ESTIMATIVA DE CUSTO PARA PRÉ-TRATAMENTO DE FOLÍOLO

	Condições			Custo do Pré-tratamento			
				HCL		H_2SO_4	
Ensaio	Ácido	Tempo	Temp.	(R$/	Xilose	(R$/	Xilose

	(%)	(min)	(°C)	kg xilose)	(g/100g Folíolo)	kg xilose)	(g/100g Folíolo)
1	1,5	15	110	10,32	2,14	4,80	3,23
2	3,5	15	110	6,10	6,18	3,24	6,53
3	1,5	75	110	5,41	4,57	3,42	5,60
4	3,5	75	110	5,07	**8,29**	3,38	7,82
5	1,5	15	130	3,29	**7,47**	2,18	**8,24**
6	3,5	15	130	5,42	7,52	3,25	7,75
7	1,5	75	130	3,61	7,49	2,66	**8,24**
8	3,5	75	130	5,72	7,71	3,88	7,73
PC	2,5	45	120	4,14	7,78	2,83	**8,26**

FONTE: O autor (2016).

3.3 COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISES ÁCIDAS PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA

De acordo com os estudos de planejamento efetuados para as frações da folha (Pecíolo e Folíolo) e EFB da palma, em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de ácido (ácido clorídrico e sulfúrico) estabelecidos no item 3.1, observa-se que embora as biomassas apresentem diferentes composições e diferentes rendimentos, foi possível estabelecer uma condição de hidrólise que satisfaça as três frações, com com menor custo de produção.

A Tabela 14 sintetiza os rendimentos, recuperações de xilose e custos obtidos para cada fração avaliada, na condição determinada pelas análises estatística e econômica (temperatura de 130°C, concentrações do catalisador de 1,5 (%v/v), tempo de 15 minutos), objetivando uma maior recuperação de xilose, com baixa formação de compostos secundários e menores custos de produção.

Da Tabela 14, verifica-se que os maiores rendimentos na produção de xilose ocorrem em hidrólises com EFB, sendo que as conduzidas com ácido sulfúrico como catalisador possui o menor custo de produção. As menores recuperações ocorreram com a fração do Folíolo, devido à baixa porcentagem de hemicelulose em sua estrutura, acarretando um maior custo desta hidrólise.

De acordo com BENJAMIN; CHENG; GÖRGENS (2014), o grande desafio dos pré-tratamentos com ácidos diluídos é encontrar condições que maximize a formação de açúcares (pentose e hexoses), mantendo a formação de produtos secundários em níveis mínimos, com reduzidos custos.

TABELA 14 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PLANEJAMENTOS 2^3 PARA AS FRAÇÕES DA FOLHA (PECÍOLO E FOLÍOLO) E EFB DA PALMA OLEAGINOSA

Biomassa	Ácido	Rendimento Xilose (g/100g de resíduo)	Recuperação Xilose (%)	Custo (R$/kg xilose)
EFB	HCL	20,28	80%	1,52
	H_2SO4	22,08	87%	1,50
PECÍOLO	HCL	17,86	85%	1,73
	H_2SO4	17,26	82%	1,34
FOLÍOLO	HCL	7,47	72%	3,29
	H_2SO4	8,24	79%	2,18

FONTE: O autor (2016).

4 CONCLUSÃO

Resíduos do processamento da palma oleaginosa como a folha e EFB podem ser utilizadas como fonte de biomassa para a produção de diferentes frações lignocelulósica. Para a produção de pentoses, especialmente xilose, as frações de EFB e Pecíolo são as mais indicadas, uma vez que apresentam 28,14% e 23,35% da sua estrutura formada por hemicelulose, respectivamente.

A fração do folíolo apresentou baixo rendimento de xilose, não sendo indicada para a recuperação de pentoses. Esta fração pode ser utilizada para a produção de lignina através de pré-tratamentos alcalinos em uma primeira etapa, e em uma segunda etapa pré-tratamento ácido para recuperação dos açúcares da hemicelulose e celulose.

Através da aplicação de pré-tratamentos em condições brandas é possível recuperar 70% à 90% das xilose, o principal açúcar da hemicelulose presente na palma oleaginosa. O uso de condições branda de pré-tratamento em relação especialmente ao tempo e a concentração de ácido, diminui a formação de compostos de degradação como HMF e Furfural, e diminui a desacetilação da hemicelulose, diminuindo consequentemente a formação de ácido acético.

Das análises concluiu-se que as melhores recuperações dos açúcares com

redução na formação de ácido acético, furfural e HMF, para todas frações avaliadas, deve ocorrer em pré-tratamentos com temperaturas elevadas (130ºC), com baixa concentração de ácido (1,5 %v/v), e baixo tempo de hidrólise (15 minutos). Com estas condições é possível recuperar a xilose com baixo custo.

A recuperação dos açúcares da hemicelulose é uma etapa importante para reaproveitamento de todas as frações da biomassa, para a interação dos processos de biorrefinaria. A seleção de um pré-tratamento adequado depende principalmente de fatores ambientais, econômicos e tecnológicos, incluindo economia de energia, quantidade de águas residuais, máxima recuperação de substrato com mínima utilização de produtos químicos.

5 SUGESTÕES

Para um reaproveitamento de todas as frações da palma para a produção de açúcares fermentescível e melhorar a eficiência dos pré-tratamentos, mais estudos devem ser conduzidos para:

a) Avaliar o pré-tratamento de um "*blend*" com as 3 frações da palma.
b) Otimizar o tempo e a concentração dos ácidos nas temperaturas de 120ºC e 130ºC.
c) Avaliar sistemas com agitação para melhorar a transferência de calor e massa, permitindo uma distribuição mais homogênea de água e de produtos químicos, e uma temperatura mais uniforme no reator.
d) Avaliar reatores com temperaturas controladas para maior uniformidade da temperatura do sistema.

CAPÍTULO IV: ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSES

RESUMO

A procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses é um dos desafios frente às dificuldades na tecnologia da produção de etanol de segunda geração. Os resíduos lignocelulósicos são considerados promissores para a produção de etanol, devido a sua composição em açúcares, grande disponibilidade e baixo custo. Uma das grandes dificuldades está em encontrar espécies que tenham a capacidade de fermentar xilose e glucose simultaneamente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, embora apresente atributos ideais para o uso industrial, não é capaz de fermentar alguns açúcares presentes nesta biomassa, como xilose e arabinose (açúcares não convencionais). Assim, é interessante a busca por leveduras em biomas onde esses açúcares estão presentes. O Brasil apresenta uma rica biodiversidade, qualificada pela diversidade em ecossistemas e espécies biológicas. Neste contexto, este estudo teve por objetivo realizar o isolamento de linhagens de leveduras com capacidade de fermentar pentoses, mais especificamente D- xilose e avaliar a habilidade destas cepas de fermentar e assimilar xilose em meio sintético e em hidrolisados ácidos de cachos vazios da palma (EFB). Dentre 105 cepas isoladas apenas 12% apresentaram habilidade em fermentar xilose como única fonte de carbono, 43% apresentaram habilidade em fermentar em meio hidrolisado de EFB de ácido clorídrico e 30% em meio hidrolisado de EFB de ácido sulfúrico e somente 4 foram capazes de fermentar todos os meios. Todas as cepas foram capazes de assimilar os meios contendo xilose. A caracterização destas cepas e sua identificação são necessárias para avaliar se estas cepas podem ser consideradas novas estirpes, assim como a otimização das condições de fermentação para verificar o rendimento em termos de etanol.

Palavras-chave: Resíduos ligncelulósicos. Isolamento de leveduras fermentadoras de pentose. Xilose.

1 INTRODUÇÃO

Grande atenção de pesquisadores ao redor do mundo tem sido focada em material lignocelulósico como uma fonte renovável e "limpa" de energia para a produção de biocombustível, uma vez que possuem dois tipos de polissacarídeos: celulose e hemicelulose, fontes de açúcares fermentescíveis (GUAN et al., 2013).

Glucose e xilose são os dois açúcares dominantes nos hidrolisados de material lignocelulósicos. Ambos precisam ser fermentado de forma eficiente, mas as abordagens atuais são ineficientes, uma vez que microrganismos não são capazes de converter todos os açúcares em etanol com alto rendimento (FERREIRA et al., 2011). *Saccharomyces cerevisiae*, é a levedura mais utilizada para a produção de etanol, pois naturalmente converte a glucose em etanol, mas não são eficientes na utilização da xilose (CHEN et al., 2011).

O aproveitamento de açúcares provenientes da hemicelulose que constitui de 20 - 35% da biomassa lignocelulósico é um dos gargalos da produção de etanol de segunda geração. O principal componente da hemicelulose são pentoses, sendo a xilose presente em maior quantidade (CARVALHO et al., 2013). Em comparação com a hexoses, pentoses são mais difíceis de assimilar e fermentar por microorganismos (MARTINIANO et al., 2013).

As pentoses podem ser convertidas a etanol por bactérias, leveduras e fungos (SKOOG et al., 1988). Os requisitos gerais de um organismo para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico são: a eficiente utilização de hexoses e pentoses; taxas de fermentação rápidas, alta produção de etanol, alta tolerância ao etanol produzido e aos inibidores presentes no hidrolisado, e capacidade de fermentar em pH relativamente baixo (KUHAD et al., 2011). Vários fatores influenciam a fermentação de xilose, como: o microorganismo em si, a concentração de substrato, pH, temperatura, inibidores e outros aditivos na fermentação além da oxigenação, que influi diretamente no metabolismo da levedura.

A procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses é um dos desafios frente às dificuldades na tecnologia da produção de etanol de segunda geração. As fontes naturais de materiais lignocelulósicos podem ser reservatórios de linhagens com potencial de assimilação e fermentação de pentoses. Neste contexto, torna-se interessante a procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE FONTES NATURAIS

2.1.1 **Coleta de Amostras**

O isolamento foi realizado nos mais diversos resíduos lignocelulósicos no ano de 2015. As principais fontes foram resíduos lignocelulósicos da palma e do beneficiamento de EFB, oriunda do Pará-PA, incluindo o solo, folha, EFB e Lodo da indústria. Solo e material lignocelulósicos em decomposição foram coletados de biosistemas de Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Paraná. Também foram coletados microorganismo do Lodo de Estação de Tratamento de Água de Curitiba, cedido pela Sanepar (Curitiba-PR).

No total foram obtidas 31 amostras (Tabela 15), as quais foram coletadas de forma direta e estocadas em plásticos estéreis e armazenadas em refrigeração para uso posterior, caso não utilizada no mesmo dia. A metodologia de isolamento foi adaptada de MORAIS et al. (2013) com algumas modificações.

TABELA 15 - MATERIAL COLETADO EM CADA REGIÃO

Amostra	Material coletado
Mojú (Pará- PA)	Solo, resíduo processado de EFB e Folha da palma Resíduo líquido do processamento da palma (POME)
Tapurah (Mato Grosso-MT)	Material em decomposição de reserva natural
Florianópolis (Santa Catarina- SC)	Material em decomposição, folhas caule e semente de Olho de boi
Guaratuba (Paraná-PR)	Folha e solo de Coqueiro (*Areca Bambu*)
Curitiba (Paraná-PR)	Folha, Flores e Frutos em decomposição e solo Lodo da Estação de Tratamento da Sanepar

FONTE: O autor (2016).

2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

2.2.1 **Isolamento**

Foram diluídos 1 gr ou 1 mL de cada amostra em erlenmeyer de 50mL com 20mL de meio YNB-D-Xilose, composto de: 6,7g/L Base nitrogenada para levedura (YNB), 5g/L de D-Xilose, 0,2 g/L de cloroanfenicol. Cada um dos componentes do meio foram autoclavados separadamente, sendo o YNB esterilizado em filtro. Os frascos foram incubados a 30° C por 48h em 120rpm.

Após o crescimento, o material foi diluído sucessivamente e 0,1mL de cada diluição (10^{-3} a 10^{-7}) plaqueado. O inóculo foi distribuído sobre os meios com o auxilio da alça de Drigalski em placas contendo meio extrato de levedura-extrato de malte ágar (YMA): 10g/L glucose, 5g/L peptona, 3g/L extrato de levedura, 3g/L extrato de malte, 20g/L ágar. As placas foram incubadas a 30°C até o desenvolvimento das colônias.

Posteriormente foi realizado a contagem das colônias isoladas de levedura, somente as placas com menor número de colônias foram avaliadas e as colônias diferenciadas pelas características morfológicas como: tamanho, cor, brilho (opaca ou brilhosa), forma e textura (lisa ou rugosa), consistência (cremosa, mucóide, amanteigada, membranosa, esfarelada, dura ou seca), margem (regular, irregular, lobada ou com raízes), elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) segundo (YARROW, 1998).

2.2.2 **Purificação e Conservação das colônias isoladas**

A partir de cada tipo morfológico observado foi selecionada uma colônia, para transferência em um novo meio sólido, com o auxílio de uma alça estéril por esgotamento em placas de Petri em placas com meio YMA com 0,2 g/L de cloranfenicol. A seguir, as placas foram acondicionadas em estufa a 30°C por 5 dias.

As colônias isoladas foram armazenadas em meio YPD (glucose, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L; peptona 20g/L) com 20% de glicerol a -7 °C para posterior identificação e realização de testes de fermentação.

2.3 HABILIDADE EM ASSIMILAR E FERMENTAR PENTOSES

Para avaliar a capacidade de fermentação das leveduras isoladas, foram realizadas fermentações com meio sintético contendo xilose e em meios contendo hidrolisados ácidos de EFB produzidos com ácido clorídrico e sulfúrico acrescidos de fonte de nitrogênio e nutrientes, de acordo MARTINI (2014). A capacidade de fermentação foi avaliada pela formação de gás em tubo de Durham.

2.3.1 **Preparo do pré-inóculo**

Para a preparação do inóculo, uma alçada de células de cada levedura isolada e purificada foi inoculada em erlenmeyer de 25 mL com 10 mL de meio YPD líquido, composto de 20g/L de glucose, 10g/L de extrato de levedura e 20g/L de peptona, e incubado por 24 horas a 30 ± 2 °C sob agitação, o pH ajustado para 6,0.

2.3.2 **Preparo dos meios de fermentação**

2.3.2.1 Meio sintético

O meio sintético foi preparado utilizando apenas xilose como fonte de carbono, acrescido de fonte de nitrogênio. A composição do meio sintético foi constituído de Xilose 20g/L, Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), 5g/L, Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4), 1g/L e Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$), 0,5g/L, com pH ajustado para 6,0.

O meio foi esterilizado em autoclave a 121 ºC por 15 minutos, a 1 atm de pressão.

2.3.2.2 Meio com Hidrolisados de EFB

Os meios hidrolisados de EFB foram preparados de acordo com metodologia descrita no Capitulo III (item 2.2).

Nesta etapa, as condições utilizadas para o preparo dos hidrolisados foram condições determinadas inicialmente antes da realização dos planejamentos (Cap. III), sendo para pré-tratamento com ácido clorídrico utilizado as condições de 2,5% (v/v) de ácido a 120ºC por 45 min. Para pré-tratamento com ácido sulfúrico, as condições

utilizadas foram de 3,5% (v/v) a 110ºC por 15 min. Aos hidrolisados preparados e neutralizados foi adicionado a fonte de nitrogênio utilizada no meio sintético, constituída de Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), 5g/L, Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4), 1g/L e Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$), 0,5g/L e o pH reajustado para 6,0. Os meios hidrolizados foram esterilizados em autoclave a 121 ºC por 15 minutos, a 1 atm de pressão.

2.3.3 **Avaliação da habilidade de crescer e fermentar a xilose**

A partir de cada suspensão de levedura crescida em YPD, 0,2 mL foi retirado e inoculado em um tubo com 10 mL de meio. Em cada tubo de ensaio, com o meio e o inóculo foi inserido um tubo de Durham para verificação da produção de gás. Os tubos de ensaio foram acondicionados em estufa à 30 ± 2º C, durante 10 dias. As análises foram realizadas em duplicata. Como controle, tubos contendo somente o meio foram avaliados também neste período.

As leveduras que expressaram a capacidade de fermentar xilose e açúcares dos hidrolisados foram selecionadas a partir da observação da formação e acúmulo de gás nos tubo de Durham. A leitura foi considerada negativa quando não houve acúmulo de gás. A assimilação das fontes de carbono foi considerada positiva quando foi observado a presença de massa celular.

2.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ETANOL

As amostras que apresentaram acúmulo de gás no tubo de Duhram, foram avaliadas em HPLC para determinação da concentração de etanol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

Foram isoladas 105 cepas de leveduras a partir de 31 amostras vegetais. A Tabela 16 apresenta o número de isolados de cada região onde as amostras foram coletadas. Embora o número de amostras tenha sido pequeno, o emprego de meios de enriquecimento para o isolamento das leveduras pode ter contribuído com elevado número de isolados obtidos por este trabalho.

TABELA 16 - NÚMERO DE ESPÉCIES ISOLADAS POR REGIÃO

Região	Número de cepas isoladas
Mojú (Pará- PA)	26
Tapurah (Mato Grosso-MT)	6
Florianópolis (Santa Catarina- SC)	12
Guaratuba (Paraná-PR)	20
Curitiba (Paraná-PR)	41
TOTAL	**105**

FONTE: O autor (2016).

Na maioria das amostras o número de isolados foi de 1 a no máximo 5 leveduras. Um maior número de leveduras foi isoladas de amostras de solo da região do Pará e Mato Grosso, uma vez que este tipo de amostras possui uma maior diversidade devido a grande decomposição de materiais vegetais que ocorre no solo.

Esses resultados também podem estar relacionados ao tipo(s) de microrganismo(s) presentes nesses ambientes, os quais podem produzir substâncias que impedem o crescimento de outros. Algumas cepas de leveduras produzem e excretam toxinas extracelulares, micotoxinas ou toxinas *"killer"*, que podem interferir no desenvolvimento de cepas sensíveis a estas substâncias, levando a exclusão desses microrganismos das fontes de isolados (CADETE et al., 2012).

O número de isolados por amostras depende muito da biodiversidade do ambiente das amostras e do meio em que foram isolados. Em estudos similares, utilizando YNB como meio base para isolamento, MORAIS et al. (2013), isolaram 324 leveduras de 100 amostras de madeira em decomposição coletadas em duas áreas de Mata Atlântica Brasileira de Minas e Bahia. CADETE et al.(2012) isolou 224 cepas de leveduras a partir de 40 amostras de madeira em decomposição recolhidos de dois locais da Floresta Amazônica Brasileira.

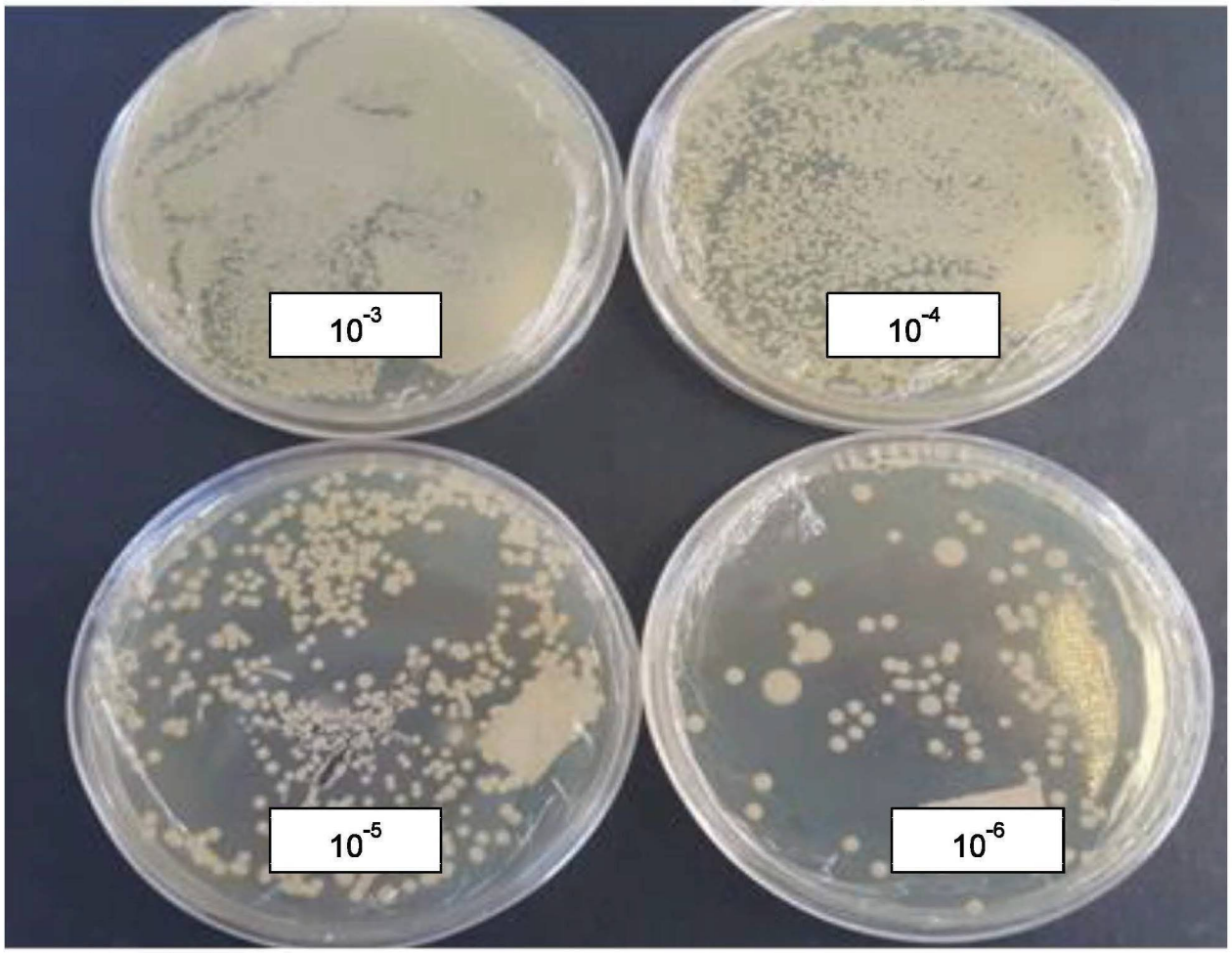
Estima-se que aproximadamente 90% do potencial de diversidade de leveduras ainda encontram-se desconhecidos, necessitando de maiores estudos da biodiversidade destes microrganismos (SHUPE; LIU, 2012). Uma vez que as leveduras são consideradas os principais decompositores e estão entre os primeiros colonizadores de substratos ricos em nutrientes, tais como tecidos de plantas terra, juntamente com uma sucessão de organismos que degradam a matéria orgânica morta (MORAIS et al., 2013).

O meio utilizado para isolamento foi capaz de diferenciar as colônias quanto à sua morfologia, embora alguns isolados apresentaram características morfológicas muitos semelhantes. A maioria das leveduras isoladas apresentaram caracteristicas: circunférica, cremosa, sendo a maioria muito pequena.

De acordo com OLSSON; HAHN-HÄGERDAL (1996) e SKOOG et al. (1988) não é possível afirmar que as leveduras que têm o mesmo fenótipo ou características da colônia, são representantes de um mesmo microrganismo. Para a identificação das espécies de leveduras isoladas é necessário à realização de testes bioquímicos e moleculares, os quais serão realizados posteriormente.

A Figura 23 apresenta isolamento de leveduras a partir da folha de coqueiro *(Areca Bambu)* coletada no litoral do Paraná, Guaratuba, para diluições de 10^{-3} a 10^{-6}.

FIGURA 23 - ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DAS FOLHAS DE COQUEIRO *(ARECA BAMBU)*



FONTE: O autor (2016).

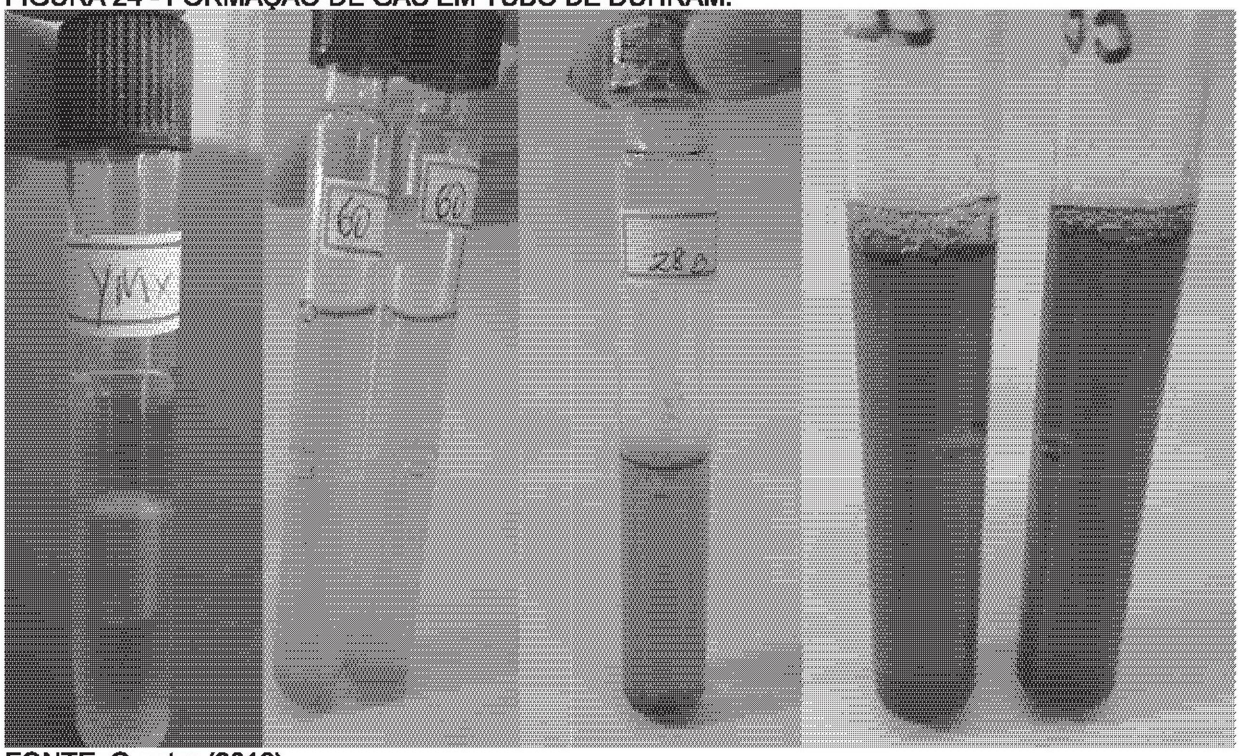
3.2 HABILIDADE EM ASSIMILAR E FERMENTAR FONTES DE CARBONO

As 105 amostras isoladas foram avaliadas quanto à habilidade em fermentar xilose em meio sintético e em meio hidrolisados de EFB pela observação do acúmulo de gás no tubo de Duhram, como apresentado na Figura 24.

Das 105 amostras avaliadas, apenas 12 cepas apresentaram capacidade de fermentação em meio sintético, 45 cepas em meio hidrolisado de EFB produzidos com ácido clorídrico e 30 cepas em meio hidrolisado de EFB com ácido sulfúrico (Gráfico 2).

Do total de cepas isoladas, apenas 4 apresentaram capacidade de fermentar os três meios, sendo elas: T1, isolada de solo Curitiba-PR; PH1, isolada de Araucária na região de Curitiba - PR; TrP2: isolada de solo do Pará-PA; LM2: isolada de lodo. As demais, 5 foram capazes de fermentar em meio sintético e meio hidrolisado produzidos com ácido clorídrico, e somente 2 foram capazes de fermentar em meio sintético e meio hidrolisado produzido com ácido sulfúrico; e 8 foram capazes de fermentar nos meios de ambos os hidrolisados.

FIGURA 24 - FORMAÇÃO DE GÁS EM TUBO DE DUHRAM.



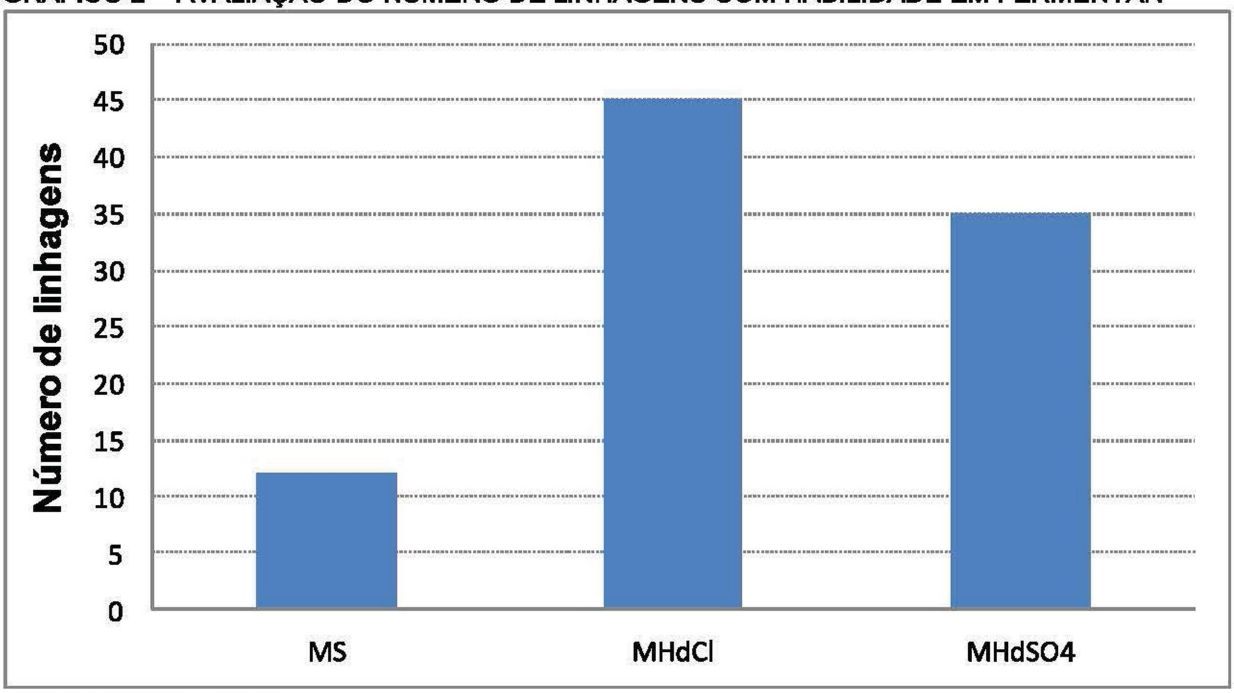
FONTE: O autor (2016)

Embora nem todas as cepas foram capazes de fermentar o meio sintético com xilose e os meios hidrolisados com uma mistura de açúcares (xilose, glucose e

arabinose) e compostos inibidores (principalmente ácido acético e furfural), todas as 105 cepas apresentaram capacidade em assimilar as fontes de carbono, pois todas apresentaram a presença de massa celular, caracterizado pela turvação do meio.

Os resultados mostraram-se promissores, pois estudos conduzidos por ROSSI (2009), das 48 cepas isoladas do bioma Brasileiro, nenhuma apresentou habilidade em fermentar as pentoses presentes nos hidrolisados ácidos de bagaço de cana, embora algumas foram capazes de assimilar os açúcares. Este autor propõe a utilizar as pentoses presentes no hidrolisado para a produção de massa celular, a qual pode ser utilizada como SCP (*single cell protein*).

GRÁFICO 2 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE LINHAGENS COM HABILIDADE EM FERMENTAR



FONTE: O autor (2016).
NOTA: MS: Meio Sintético; MHDCL: Meio Hidrolisado Com Hidróxido De Cloro; MHDSO4: Meio Hidrolisado De Ácido Sulfúrico;

De acordo com AGBOGBO & COWARD-KELLY (2008) a levedura *Pichia stipitis*, considerada um microrganismo promissor para a produção em larga escala de etanol a partir de xilose não é capaz de fermentar L-arabinose a etanol e em determinadas condições produz apenas massa celular. Embora um grande número de espécies de levedura são capazes de metabolizar a xilose, apenas cerca de 1% deles são capazes de fermentar a xilose em etanol (FERREIRA et al., 2011).

3.3 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ETANOL

A formação de etanol nos tubos em que foi observado a formação de gás no tubo de Duhram foi determinada por análise em HPLC (Método 5b – capítulo II). Os valores das concentrações de etanol determinados para o meio sintético e os meios hidrolisados são apresentados na Tabela 17.

Da Tabela 17, observa-se que a concentração máxima obtida foi de 0,5 e 0,7g/L em fermentações conduzidas em meio contendo hidrolisado de EFB produzidos com ácido sulfúrico e clorídrico, respectivamente. As fermentações conduzidas em meio sintético apresentaram máxima concentração de etanol de 0,3g/L.

TABELA 17 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL APRESENTADA PELAS CEPAS ISOLADAS NA AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE FERMENTAR PENTOSES NOS MEIOS SINTÉTICOS E HIDROLISADOS.

	Concentração de etanol (g/L)	
Meios	**Mínima**	**Máxima**
MS	0,1	0,3
MHdCl	0,2	0,7
MHdSO4	0,1	0,5

FONTE: O autor (2016).
NOTA: MS: meio sintético; MHdCL: meio hidrolisado de EFB produzido com ácido clorídrico; MHdSO4: meio hidrolisado de EFB produzido com ácido sulfúrico.

Concentrações maiores de etanol produzido pela fermentação de hidrolisados ácidos de diferentes biomassas foram observados na literatura, somente após a otimização do processo fermentativo (FERREIRA et al., 2011; MARTINIANO et al., 2013; SHUPE; LIU, 2012).

Outra observação a ser feita é com relação à presença de glucose nos meios hidrolisados, juntamente com as pentoses liberadas. Sabe-se que leveduras fermentadoras de xilose, também são fermentadoras de glucose, ou seja, a formação de etanol observada nos meios hidrolisados pode ser proveniente também da glucose.

A principal dificuldade em fermentar hidrolisados ácidos, de resíduos lignocelulósicos, está no fato destes hidrolisados conterem uma diversidade de substâncias, como ácido fórmico, ácido acético, furfural, 5- hidroximetilfurfural (HMF) e derivados da lignina que são considerados inibidores nos processos de fermentação (CHANDEL et al., 2007).

A fermentação utilizando as cepas que apresentaram habilidade em fermentar, deve ser reavaliada, através da determinação dos parâmetros fermentativos como, consumo de açúcares, massa celular produzida, taxas de aeração, avaliação da concentração de compostos inibidores e principalmente a produtividade de etanol.

4 CONCLUSÃO

Embora tenham sido isoladas 105 cepas provenientes de meio contendo xilose, apenas 12 delas apresentaram habilidade em fermentar xilose como única fonte de carbono. Dessas, 45 tem habilidade em fermentar em meio hidrolisado de EFB com ácido clorídrico e 30 em meio hidrolisado de EFB com ácido sulfúrico e apenas 4 foram capazes de fermentar todos os meios.

A caracterização destas cepas e sua identificação são necessárias para avaliar se estas cepas podem ser consideradas linhagens distintas.

5 SUGESTÕES

a) Avaliar diferentes meios de isolamento, possibilitando resgatar uma maior diversidade de leveduras.
b) Realizar a identificação das linhagens isoladas neste trabalho.
c) Avaliar o potencial biotecnológico das linhagens isoladas, quanto à capacidade de produzir: enzimas, gomas, pigmentos, aromas, lipídeos, entre outros compostos.

CAPÍTULO V: FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB

RESUMO

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos no pré-tratamento ácido de EFB, contém açúcares, principalmente pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glucose) juntamente com outras substâncias consideradadas inibidoras em processo fermentativo, como ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) entre outros. A constituição destes hidrolisados dificulta a fermentação direta com leveduras, necessitando de uma adaptação destas cepas de forma gradativa aos meios hidrolisados assim como do estudo das condições favoráveis à fermentação destes hidrolisados. Neste trabalho, hidrolisados de EFB, preparados com ácido clorídrico e ácido sulfúrico, foram avaliados quanto a adaptação da *P. Stipitis*, o efeito da suplementação do meio por diferentes fontes de nitrogênio e sais, porcentagem de hidrolisados para a preparação de inóculos, assim como a influência da relação entre o volume do meio volume do frasco (V_m/V_F), uma vez que condições de microaeração são significativas nos processos de produção de etanol via pentoses. Os resultados demonstram que a *P. Stipitis* em meios de hidrolisados ácidos de EFB são tolerantes a concentrações de ácido acético até 5g/L, acima desta concentração começa haver inibição no crescimento. Em meio sintético, os melhores resultados em relação à produção de etanol (8,9 g/L) foi observada quando a fermentação ocorreu com concentrações de açúcares semelhantes as apresentadas no meio hidrolisado com a suplementação de extrato de levedura como única fonte de nitrogênio, obtendo um rendimento de 75% em relação a formação de etanol, quando utilizado uma relação volume de meio e volume de frasco de 50%, com agitação de 120rpm. No processo de adaptação da cepa da levedura *P. stipitis* em diferentes porcentagens de hidrolisados foi possível isolar colônias adaptadas em meios contendo 75% de hidrolisado, sendo esta mais resistente e tolerante aos meios hidrolisados. Com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que hidrolisados ácidos de EFB podem ser fermentados por *Pichia stipitis* adaptada ao meio, desde que condições previamente estabelecidas de suplementação de nutrientes e oxigênio sejam otimizadas para uma efetiva produção de etanol.

Palavras-chave: Etanol. *Pichia stipitis*. Hidrolisado hemicelulósico de EFB

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial para a produção de etanol em grande escala, tendo em vista que a maioria destes materiais são subprodutos de atividades agrícolas e resíduos agro-industriais e produzidos em grandes quantidades.

Através de pré-tratamentos adequados, a estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos são degradados liberando açúcares fermentescíveis, hexoses (glucose) e pentoses (xilose e arabinose) (GÍRIO et al., 2010). Xilose, é o segundo açúcar mais abundante da biomassa lignocelulósica (SINGLA et al., 2012). A utilização eficiente de pentoses e hexoses, permitirá aumentar a viabilidade econômica da produção de bioetanol (SHUPE; LIU, 2012).

Embora *Saccharomyces cerevisiae* seja a levedura mais utilizada na produção de etanol, ela não é capaz de fermentar xilose (WATANABE et al., 2011). Entre as leveduras fermentadoras de xilose, a *Pichia stipitis* tem se mostrado promissora para aplicação industrial uma vez que fermenta xilose rapidamente com um rendimento elevado de produção de etanol e também é capaz de fermentar glucose (NIGAM, 2001). Uma das dificuldades em se utilizar *Pichia stipitis* é a sua baixa tolerânica a altas concentrações de etanol (AGBOGBO et al., 2006) e aos compostos inibidores formados no processo de hidrólise (BELLIDO et al., 2011; DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). Estratégias de aclimatação de leveduras aos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos têm sido avaliadas como uma alternativa promissora (HERRERA-RUALES; ARIAS-ZABALA, 2014; CARNEIRO, 2011).

O resíduo do processo de produção do óleo de dendê, especialmente, os cachos vazios da palma (EFB), tem se caracterizado com uma excelente biomassa para produção de etanol, uma vez que apresenta alta composição de polissacarídeos. Através de pré-tratamento ácido-térmico de EFB, é possível obter açúcares, principalmente xilose em um meio altamente complexo de açúcares e substâncias (ácido acético, Furfural e 5-Hidroximetilfurfural) consideradas inibidoras nos processos fermentativos. Neste contexto, estudos relacionados à composição do meio, condições de aeração, influência da concentração de inibidores entre outros fatores se faz necessário para o aumento da produção de etanol por *Pichia stipitis*, em hidrolisados de EFB.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes de fermentação foram realizados para se determinar parâmetros para a elaboração de planejamentos experimentais que visem uma otimização da produção de etanol a partir dos açúcares obtidos da hidrólise ácida da hemicelulose de EFB.

O EFB foi utilizado como matéria-prima para a preparação dos hidrolisados, uma vez que apresenta uma porcentagem significativa de pentoses na fração hemicelulósica (28,14%) e é um dos resíduos da palma que possui maior disponibilidade e acessibilidade, pois é gerado no ambiente industrial.

2.1 PREPARO DOS HIDROLISADOS ÁCIDOS

Os meios hidrolisados de EFB foram preparados de acordo com metodologia descrita no capítulo III (item 2.2).

Nesta etapa, as condições utilizadas para o preparo dos hidrolisados foram condições determinadas inicialmente antes da realização dos planejamentos (Cap. III), sendo para pré-tratamento com ácido clorídrico utilizado as condições de 2,5% (v/v) de ácido a 120ºC por 45 min. Para pré-tratamento com ácido sulfúrico, as condições utilizadas foram de 3,5% (v/v) a 110ºC por 15 min.

Após o preparo dos hidrolisados foram refrigerados para posterior uso.

2.2 MICROORGANISMO

Neste trabalho foi utilizada a levedura *Pichia stiptis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois. A cultura foi mantida repicada em tubos inclinados, contendo MEIO YPD (glucose, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L; peptona 20g/L) com 20% de glicerol a 4ºC.

2.3 AVALIAÇÃO DA PORCENTAGEM DE HIDROLISADO NA PREPARAÇÃO DE INÓCULOS

Neste estudo investigou-se o cresciento da levedura P*ichia stipitis* NRRL Y-7124 em hidrolisados ácidos de EFB com ácido clorídrico (MHdCl) e com ácido sulfúrico ($MHdSO_4$), avaliando a porcentagem de hidrolisado para preparo do inóculo. O crescimento em meios hidrolisados foram comparados com o cresciento em meio sintético.

Para determinação do inóculo a ser usado nas fermentações, o crescimento da *Pichia stiptis* NRRL Y-7124, foi avaliada em diferentes concentrações de hidrolisados como apresentado na Tabela 18 para hidrolisado de ácido clorídrico e Tabela 19 para hidrolisados de ácido sulfúrico. Foram preparados meios para inóculo com 25%, 50%, 75% e 100% de cada hidrolisado e para efeito de comparação inóculo utilizando somente xilose, ou seja, 0% de hidrolisado também foi preparado. Todos os meios foram acrescidos de Extrato de levedura (3g/L), Extrato de malte (3g/L) e Peptona (5g/L).

Os meios para inóculo foram preparados em pH 5,5, e mantidos sob agitação de 120rpm a 30 °C, por 24 horas. O crescimento da biomassa, foi avaliado por peso seco.

TABELA 18 - COMPOSIÇÃO DOS INÓCULOS PARA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE EFB DE ÁCIDO CLORÍDRICO

Composição dos meios	**Porcentagem de Hidrolisado**				
(g/L)	**0%**	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
Celobiose		0,30	0,60	0,90	1,20
Glucose		0,25	0,50	0,75	1,00
Xilose	10,00	4,10	8,20	12,30	16,40
Arabinose		0,60	1,20	1,80	2,40
Ac. Acético		1,55	3,10	4,65	6,20
Extrato de levedura			3,00		
Extrato de malte			3,00		
Peptona			5,00		

FONTE: O autor (2016).

TABELA 19 - COMPOSIÇÃO DOS INÓCULOS PARA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE EFB DE ÁCIDO SULFÚRICO

Composição dos meios	**Porcentagem de Hidrolisado**				
(g/L)	**0%**	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
Celobiose		0,45	0,90	1,35	1,8
Glucose		0,21	0,43	0,64	0,85
Xilose	10,00	4,55	9,10	13,65	18,2
Arabinose		0,69	1,38	2,07	2,76
Ac. Acético		1,70	3,40	5,10	6,8
Extrato de levedura			3,00		
Extrato de malte			3,00		
Peptona			5,00		

FONTE: O autor (2016).

2.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB COM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES

A constituição dos meios de fermentação é um dos fatores que influenciam diretamente na eficiência da produção de etanol. Diferentes meios são propostos na literatura para aumentar a produção. Neste ensaio foram avaliados três meios com diferentes fontes de nutriente para avaliar a influência destes meios no crescimento da biomassa, em hidrolisados ácidos de EFB.

A composição dos meios utilizados é apresentada na Tabela 20. O meio 1 (M1) avaliado em estudos anteriores no laboratório, Meio 2 (M2) adaptado de HERRERA-RUALES; ARIAS-ZABALA (2014) e Meio 3 (M3) adaptado de (CARVALHO, 2009). Os meios foram constituídos com 75% de hidrolisados de EFB (com ácido clorídrico e com ácido sulfúrico, separadamente). O pH de todos os meios foram ajustados para 5,5. Os meios foram previamente autoclavados a 121ºC por 15 min. Observando, que a solução de sais do meio 3 (M3) foi autoclavado separadamente e adicionado após a esterilização.

As fermentações foram conduzidas *shaker* com agitação de 120rpm a 30ºC por 48horas, sendo a relação Vmeio/Vfrasco de 1:10. A retirada de amostras para avaliação do crescimento de biomassa foi realizada a cada 12h. Os ensaios foram realizados em duplicata.

TABELA 20 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO DE *Pichia stiptis* EM HIDROLISADOS DE EFB

Composição dos meios (g/L)	Meios com Hidrolisado de EFB					
	Ácido Clorídrico			Ácido Sulfúrico		
	M1	M2	M3	50%	75%	100%
Celobiose	0,9	0,9	0,9	0,00	0,00	0,00
Glicose	1,13	1,13	1,13	0,00	0,00	0,00
Xilose	12,71	12,71	12,71	7,50	7,50	7,50
Arabinose	2,06	2,06	2,06	1,99	1,99	1,99
Ac. Acético	5,33	5,33	5,33	5,21	5,21	5,21
Extrato de levedura	10,00	4,00	2,00	10,00	4,00	2,00
Peptona	0,00	3,00	0,00	0,00	3,00	0,00
$(NH_4)_2SO_4$	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00
$MgSO4 . 7 H_2O$	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00
Uréia	0,00	0,00	1,25	0,00	0,00	1,25
KH_2PO_4	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00	1,10
Solução de Sais	0,00	0,00	40mL/L	0,00	0,00	40mL/L

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Onde solução de sais é composta por: MgSO4.7H2O: 12,5g/L; CuSO4.5H2O: 0,025g/L; $CaCl_2$.2H2O: 1,25g/L; $CoCl_2$.6H2O: 0,025g/L; Ácido cítrico: 12,5 g/L;$NaMoO_4$.$2H_2O$: 0,035g/L;FeSO4.$7H_2O$: 0,9g/L; H_3BO_3: 0,050g/L; $MnSO_4$: 0,19g/L; KI: 0,009g/L; $ZnSO_4$.7H2O: 0,30g/L; $Al_2(SO_4)_3$: 0,0125g/L.

Neste ensaio utilizou-se a *Pichia stipitis* Y-7124, adaptada do ensaio anterior em 50% de hidrolisado ácido de EFB. Os inóculos foram preparados com 75% de hidrolisado ácido de ácido clorídrico (MHdCl) e ácido sulfúrico (MHdSO4), e como fonte de nitrogênio: 3,0 g/L de extrato de malte, 3,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de peptona. Os inóculos foram preparados em frascos de erlenmeyer de 250mL com 25 mL de meio e incubados em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 120 rpm, por 24 horas. Alíquotas de 2,5mL foram utilizadas para inocular (10% do volume do meio).

A avaliação do crescimento da *Pichia stipitis* Y-7124 foi determinada através de contagem de número de células em câmara de Neubauer.

2.5 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO VM/VF NA PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO.

Embora as fermentações alcoólicas ocorram em anaerobiose, no caso de fermentação de pentose, a levedura necessita de microaeração, e neste caso uma pequena agitação ou aeração é necessária. Neste ensaio, avaliou-se a formação de etanol, consumo de xilose e crescimento de biomassa, variando a relação

Volume do meio e Volume do frasco (Vm/Vf). O meio sintético de fermentação foi composto pelos açúcares encontrados nos hidrolisados, sendo: 30g/L de xilose; 5g/L de glucose; 4,5g/L de arabinose. 2,5 g/L de celobiose e 10g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O pH do meio foi ajustado para 5,5 ± 0,2. Os meios foram distribuídos em Erlenmeyer de 125mL, contendo a porcentagem de 20%, 50% e 80% em relação ao volume do frasco e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. As fermentações foram conduzidas em *shaker* a 30 °C, com agitação de 120rpm por 72h. Alíquotas foram retiradas a cada 24h.

Os inóculos utilizados neste estudo foram preparados com meio YMX (10g/L de xilose; 3g/L extrato de levedura; 3g/L extrato de malte; 5g/L de peptona. Os inóculos foram crescidos por 24h a 30°C com agitação de 120rpm. A inoculação dos meios ocorreu com um volume de inóculo de 10% do volume do meio de fermentação.

O crescimento da biomassa foi acompanhado através de análise de massa seca e contagem de células em câmara de Neubauer, o consumo de açúcares e a produção de etanol avaliado em HPLC, como descrito no Método 5b (capítulo 2).

2.6 ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB

Nesta etapa, cepas da levedura P*ichia stiptis* Y-7124 foram aclimatadas sequencialmente em diferentes porcentagens de hidrolisados ácidos de EFB.

A levedura *Pichia stiptis* Y-7124 foi primeiramente cultivada em meio YM (10g/L de glucose; 3g/L extrato de levedura; 3g/L extrato de malte; 5g/L de peptona) e cultivada a 30°C, 120rpm por 24horas. Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 250mL contendo 25mL. Uma alíquota de 2,5mL (correspondendo a 10% da taxa de inoculação) foi transferida assepticamente para um meio contendo uma proporção de 25%(v/v) de hidrolisado. Após 48h, novamente uma alíquota de 2,5mL (correspondendo a 10% da taxa de inoculação) foi transferida assepticamente para um meio contendo uma proporção de 50% (v/v) de hidrolisado. Este procedimento foi repetido para meios mais concentrados de 75% e 100%, a cada 48h. Neste estudo, os hidrolisados foram concentrados em rotaevaporador. A composição dos hidrolisados de EFB em ácido clorídrico e ácido sulfúrico, são apresentados nas Tabelas 21 e 22 respectivamente.

TABELA 21 - COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DO HIDROLISADO CONCENTRADO DE EFB COM ÁCIDO CLORIDRICO

Composição	**Hidrolisados de EFB em HCl**			
(g/L)	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
Glucose	0,53	1,05	1,58	2,1
Celobiose	0,8	1,6	2,4	3,2
Xilose	10	20	30	40
Arabinose	0,85	1,7	2,55	3,4
Ácido acético	2,2	4,4	6,6	8,8

FONTE: O autor (2016).

TABELA 22 - COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DO HIDROLISADO CONCENTRADO DE EFB COM ÁCIDO SULFÚRICO

Composição	**Hidrolisados de EFB em H_2SO_4**			
(g/L)	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
Glucose	0,45	0,9	1,35	1,8
Celobiose	0,45	0,9	1,35	1,8
Xilose	10,93	21,85	32,78	43,7
Arabinose	0,85	1,7	2,55	3,4
Ácido acético	1,88	3,75	5,63	7,5

FONTE: O autor (2016).

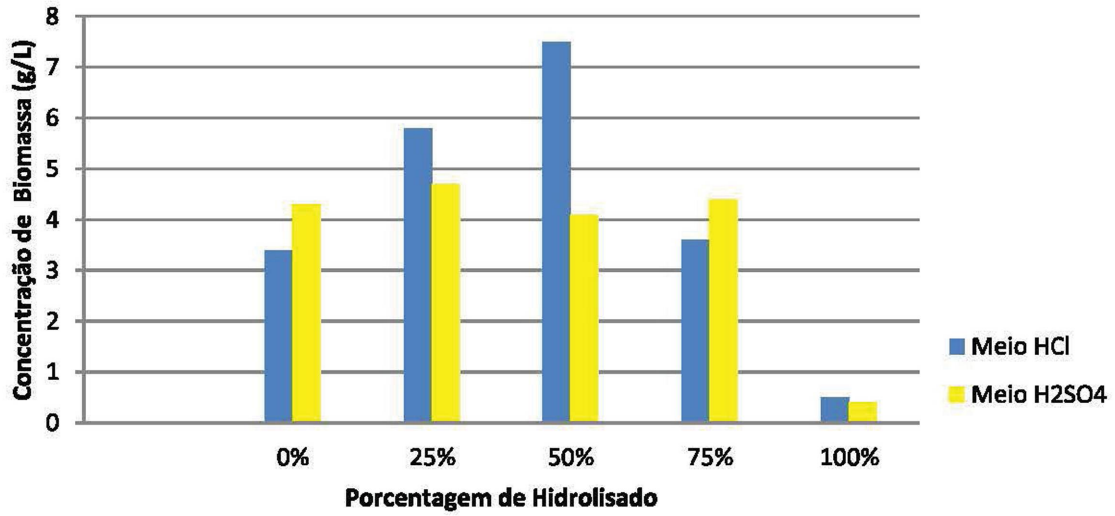
As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento, através da contagem de números de células em câmara de Neubauer, e por crescimento em placa contendo o mesmo meio da fermentação, acrescido de ágar. Todos os ensaios e as análises foram conduzidos em duplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB

A avaliação do crescimento da levedura em meios hidrolisados de EFB, produzidos com ácido clorídrico e ácido sulfúrico para *Pichia stipitis* Y-7124, é apresentado no Gráficos 3.

GRÁFICO 3 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB



FONTE: O autor (2016).

Observa-se que o crescimento da levedura *Pichia stipitis* Y-7124, em hidrolisados ácidos de EFB, apresentou comportamentos diferentes. Em meios contendo hidrolisados de EFB com ácido clorídrico, o melhor crescimento foi no meio com 50% de hidrolisado (7,5g de biomassa/L), este valor foi superior ao encontrado para o inóculo com 0% de hidrolisado, meio sintético (YMX). Este comportamento não foi observado para os meios contendo hidrolisados de EFB com ácido sulfúrico, o qual não apresentaram grandes diferenças em termos de crescimento nos meios contendo 0%, 25%, 50% e 75% de hidrolisado, na média o crescimento foi de 4,4g de biomassa/L.

A principal diferença entre os inóculos, sintéticos e hidrolisados é a composição do meio. Em meios sintéticos, somente a xilose está presente, como única fonte de carbono. Em meios hidrolisados, há uma quantidade de açúcar

disponível maior, pois além de xilose, possuem glucose, arabinose e celobiose o qual estão ausentes no inóculo de 0%.

Além da concentração dos açúcares ser maior, na sua composição também encontram-se ácido acético, sais minerais e outros compostos, que sinergicamente podem estar influenciando no crescimento da levedura. Para os meios contendo 100% de hidrolisado, a concentração de ácido acético é de 6,2 e 6,8g/L para os meios com ácido clorídrico (MHdCl) e ácido sulfúrico (MHdSO4), respectivamente. Nesta porcentagem de hidrolisado o crescimento da levedura *Pichia stipitis* foi praticamente inibida em ambos os hidrolisados.

Vários fatores podem ser avaliados com a relação à baixa concentração de biomassa nos meios com 100% de hidrolisado, como: alta concentração de carboidrato e baixa concentração de nitrogênio, a presença do ácido acético e outras substâncias presentes nos hidrolisados, considerados inibidores, como o HMF e o furfural.

O ácido acético é considerado um dos inibidores dos processos fermentativos. Na literatura, não há uma concentração (mínima ou máxima) de ácido acético definida como inibidora, uma vez que a inibição do crescimento varia conforme o microrganismo utilizado e a sinergia dos compostos presentes nos hidrolisados.

BELLIDO e colaboradores (2011), observaram que concentrações acima de 3,5g/L de ácido acético inibiu a fermentação de *Pichia Stiptis* em hidrolisados de palha de trigo produzidos por explosão a vapor, assim como, um efeito sinérgico entre os três principais inibidores: ácido acético, furfural e HMF. Entretanto OLIVA et al.(2003), afirma que o ácido acético em concentrações inferiores a 10g/L não apresentou efeito inibitório sobre a levedura *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisados de álamo produzidos por explosão a vapor, sendo considerado um inibidor de menor relevância. LARSSON e colaboradores (1999) relataram que concentrações de ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico até 6g/L, aumentaram o rendimento de etanol de hidrolisados ácidos de abeto, quando fermentados com *Saccharomyces cerevisiae*, e somente concentrações mais elevadas destes compostos diminuiram o rendimento de etanol.

Avaliando o crescimento da levedura com relação a concentração de ácido acético nos hidrolisados ácidos de EFB sobre o crescimento da *Pichia stipitis* Y-7124, pode-se dizer que concentração de 4,65g/L inibiu o crescimento em meio

hidrolisado com ácido clorídrico (MHdCl) e 6,8 g/L inibiu o crescimento em meio hidrolisado com ácido sulfúrico (MHdSO4) (Tabela 18 e 19 respectivamente). Como mencionado anteriormente, outros fatores devem ser avaliados conjuntamente.

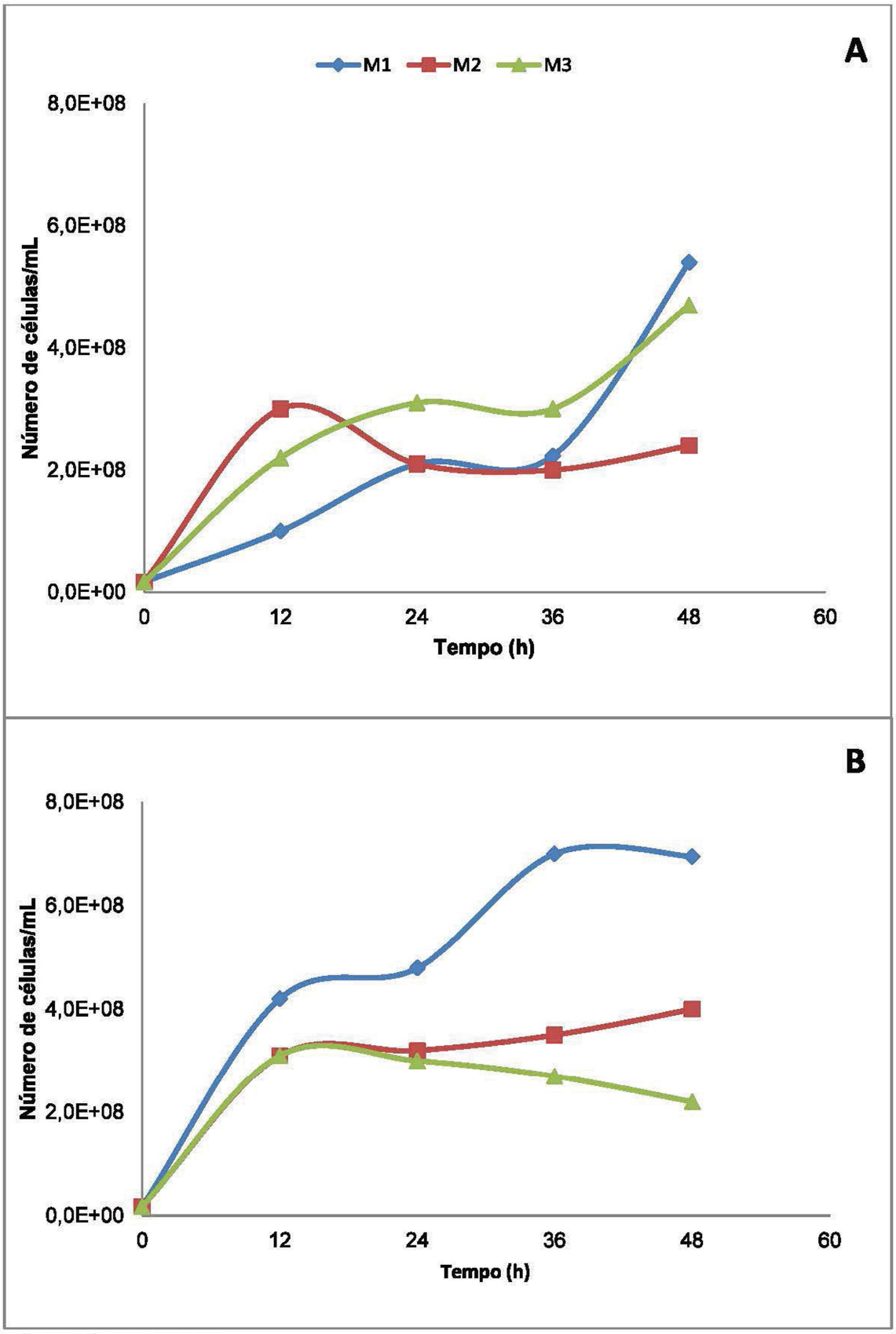
Dessa análise determinou-se que o inóculo com 50% de hidrolisado de EFB produzido com ácido clorídrico (MHdCl) e inóculo com 75% de hidrolisado de EFB produzido com ácido sulfúrico (MHdSO4), seriam utilizados para a fermentação dos respectivos meios.

3.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB COM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTES

Um dos principais fatores que afeta a eficiência do processo fermentativo é a composição do meio de cultivo. O estabelecimento de concentrações ótimas dos componentes do meio de cultura é uma importante maneira de aumentar a produtividade e melhorar a eficiência de um bioprocesso (SLININGER et al., 2006), sendo de vital importância estabelecer formulações de meios com componentes de baixo custo, para maior viabilidade econômica do processo. Os resultados do crescimento da *Pichia stipitis*, nos três meios estudados para hidrolisados de EFB são apresentados na Figura 25, sendo A – Hidrolisados de EFB com ácido clorídrico e B – Hidrolisados de EFB com ácido sulfúrico.

Observa-se que os gráficos 25A e 25B, possuem comportamentos distintos em termos de crescimento da *Pichia stiptis* para os meios M1, M2 e M3 nos diferentes hidrolisados de EFB. O meio M1 embora composto apenas por extrato de levedura apresentou os melhores crescimentos em ambos os hidrolisados.

FIGURA 25 - CRESCIMENTO DE *Pichia stipitis* EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIO HIDROLISADO DE EFB.



FONTE: O autor (2016).
NOTA: (A) Com Ácido Clorídrico E (B) Com Ácido Sulfúrico.

Em estudos conduzidos por SILVA et al. (2012) da avaliação da influência da composição dos meios na conversão de xilose a etanol observou que a presença de extrato de levedura é significativa na produção de etanol por *Pichia stiptis*. O consumo de substrato, em meios contendo extrato de levedura como única fonte de nitrogênio aumentou em 80% em relação aos meios que não utilizavam. Apresentando melhores resultados de consumo de substrato e produção de etanol (74% e 24,17g/L, respectivamente), em meios contendo 3g/L de extrato de levedura, 2,3 g/L de uréia e 1g/L de $MgSO_4$ x $7H_2O$. De acordo com PALMQVIST; HÄHN-HÄGERDAL (2000), o extrato de levedura além de ser uma fonte de vitaminas, peptídeos e elementos traços que são constituintes essenciais para o crescimento e metabolismo de leveduras, também contém fontes de nitrogênio na forma de aminoácidos. O extrato de levedura apresenta um efeito protetor no crescimento e viabilidade de fermentação, estimulando a produção de etanol (SINGLA et al., 2012).

Os meios M2 e M3 embora acrescidos de diferentes fontes de nitrogênio possuem menor concentração de extrato de levedura, e foram os meios em que a *Pichia stiptis* apresentou menor crescimento ao final de 48h. Observou-se comportamentos distintos da levedura nos hidrolisados e meios avaliados. No meio (M2) a levedura apresentou maior crescimento no meio com hidrolisado de EFB com ácido sulfúrico (MHdSO4), no final de 48h, entretanto no meio com hidrolisado de EFB com ácido clorídrico (MHdCl), embora tenha apresentado pico de crescimento em 12h, após decresceu o crescimento.

A levedura no meio M3, mais rico em nutrientes, apresentou comportamento inverso: melhor crescimento em meio hidrolisado de EFB com ácido clorídrico (MHdCl) em 48h, e pico de crescimento em 12h no meio com hidrolisado de EFB com ácido sulfúrico (MHdSO4), e após decresceu o crescimento.

A diferença de comportamento de crescimento da *Pichia stipitis* em meios hidrolisados suplementados com diferentes fontes está relacionada com a composição de cada hidrolisado. Os hidrolisados são meios complexos, constituídos de diferentes substâncias provenientes tanto da própria constituição do resíduo, como dos produtos formados durante o pré-tratamento. O efeito sinérgico destes compostos e suas diferentes composições tornam cada hidrolisado com características individuais.

Sendo o custo dos meios de fermentação um dos principais fatores para determinar a viabilidade econômica de um processo de produção de etanol a partir de hidrolisados, estabeleceu-se que os meios hidrolisados de EFB podem ser acrescidos apenas de extrato de levedura, o qual pode suprir as necessidades nutricionais da levedura.

3.3 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO VM/VF NA PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO.

A necessidade de microaeração dos meios é relatada na literatura, como um fator importante na produção de etanol por levedura *Pichia stiptis,* em meios contendo xilose como principal fonte de carboidrato. Neste estudo, avaliou-se a relação Volume de meio e Volume frasco (Vm/Vf) em agitação de 120rpm, como forma de produzir um sistema de microaeração.

Os resultados para a fermentação do meio sintético para as relações Vm/Vf de 20%, 50% e 80%, são apresentados nas Tabelas 23, 24 e 25 respectivamente.

TABELA 23 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO COM VM/VF = 20%

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	5,57	30,00	5,90	0,00	0,50
24	0,54	28,14	5,80	0,13	2,90
48	0,36	22,76	5,75	0,51	3,05
72	0,22	22,03	5,70	5,61	2,40

FONTE: O autor (2016).

TABELA 24 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO COM VM/VF = 50%

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	5,57	30,00	5,90	0,00	0,50
24	0,52	24,76	5,90	2,15	4,65
48	0,39	18,80	5,90	4,51	3,25
72	0,27	3,10	5,90	8,90	2,95

FONTE: O autor (2016).

TABELA 25 - RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* Y-7124 EM MEIO SINTÉTICO COM VM/VF = 80%

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (g/L)
0	5,57	30,00	5,90	0,00	0,50
24	0,53	26,69	5,88	0,17	4,15
48	0,45	26,37	5,76	1,60	5,75
72	0,26	18,50	5,60	4,50	2,85

FONTE: O autor (2016).

Das três relações Vm/Vf avaliadas, a melhor produção de etanol (8,90g/L) e maior consumo de xilose (89,60%) foi apresentada pela fermentação onde a relação Vm/Vf foi de 50% em 72horas (Figura 26B). Nesta condição (Vm/Vf = 50%), também ocorreu o consumo de 95,15% da glicose presente no meio.

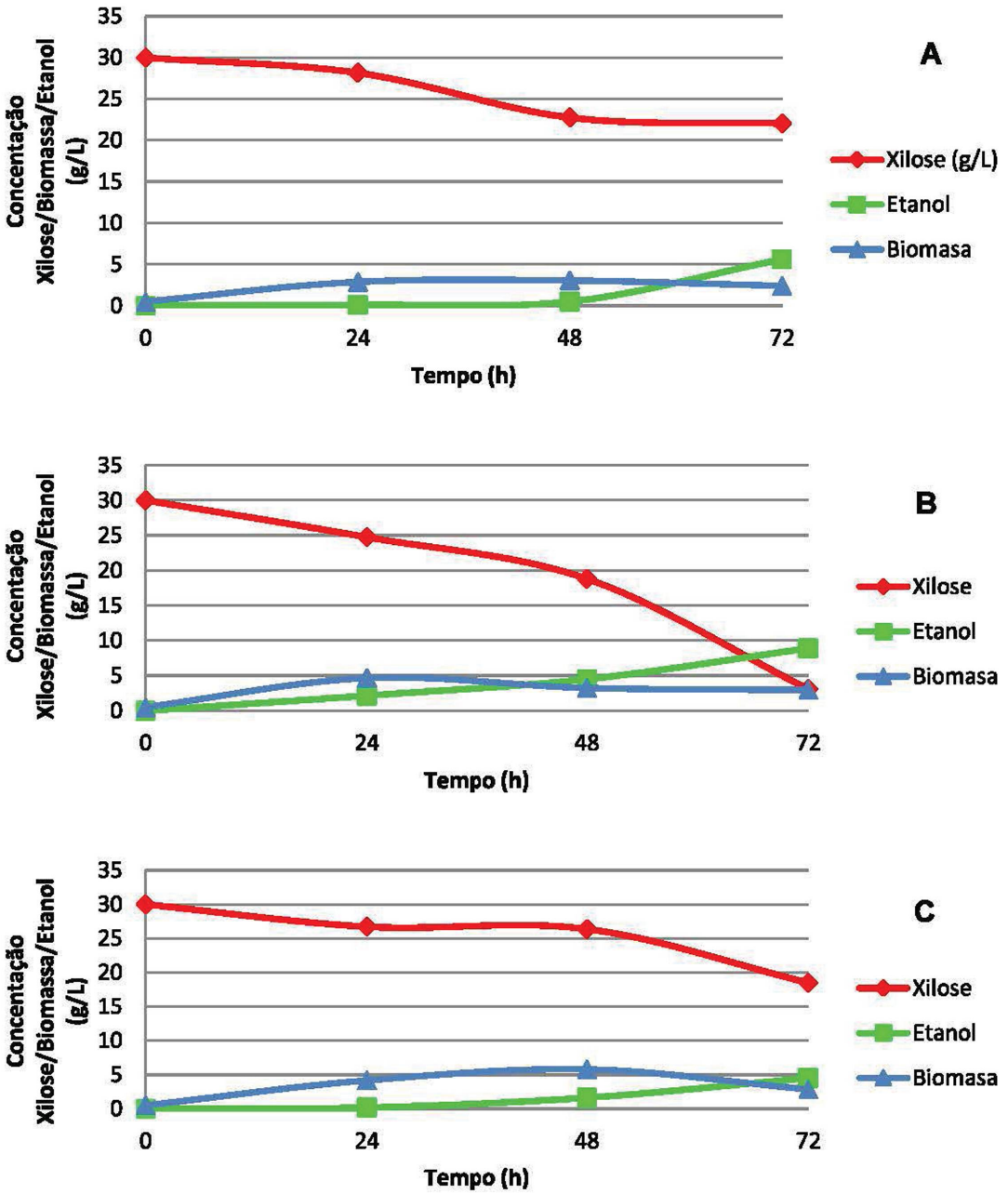
Os meios com relação Vm/Vf de 20% e 80% apresentaram menor formação de etanol de 5,61 (g/L) e 4,50 g/L em 72h, respectivamente, com baixo consumo de xilose 26,56% (Vm/Vf = 20%) e 38,33% (Vm/Vf =80%) (Figura 26 A e C). Mas apresentaram alto consumo de glicose, 96,05% e 95,33% para Vm/Vf de 20% e 80%, respectivamente. Ou seja, parte do etanol formado é proveniente da glicose do meio, uma vez que a levedura *Pichia stiptis*, consome preferencialmente glicose quando em meios com xilose.

O maior crescimento de biomassa (5,75g/L) foi observado no meio com 80% do volume do frasco ocupado. Observou-se que condições de alto e baixo volume de meio no frasco (Vm/Vf = 80% e Vm/Vf= 20%), favorecem o crescimento da biomassa, mas não são eficientes no consumo de xilose e formação de etanol.

A disponibilidade de oxigênio tem uma influência significativa na fermentação da xilose. Segundo SKOOG et al. (1988), leveduras fermentadoras de pentoses, em condições aeróbicas produzem biomassa, sob condições de anaerobiose produzem xilitol, e sob condições limitadas de oxigênio produz etanol. A levedurra *P. Stipitis*, cresce rapidamente sem a produção de etanol em condições aeróbicas, e fermenta glicose ou xilose sob as condições de limitação de oxigénio (microaeração). Em caso de condições anaeróbicas, não é observado seu crescimento (SINGLA et al., 2012).

Desta forma, estabeleceu-se que para melhor produção de etanol a relação volume do meio e volume do frasco deve ser de 50%, mantendo agitação de 120 rpm, que pode ser caracterizado como uma condição limitada de oxigênio.

FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE XILOSE, PRODUÇÃO DE ETANOL E CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA PARA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES RELAÇÕES VM/VF.



FONTE: O autor (2016).
NOTA: A – referem-se ao consumo de xilose, produção de etanol, e concentração de biomassa para relação Vm/Vf=20%; B– referem-se ao consumo de xilose, produção de etanol, e concentração de biomassa para relação Vm/Vf=50%; C – referem-se ao consumo de xilose, produção de etanol, e concentração de biomassa para relação Vm/Vf=80%.

3.4 ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stiptis* NRRL Y-7124 EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS ÁCIDOS DE EFB

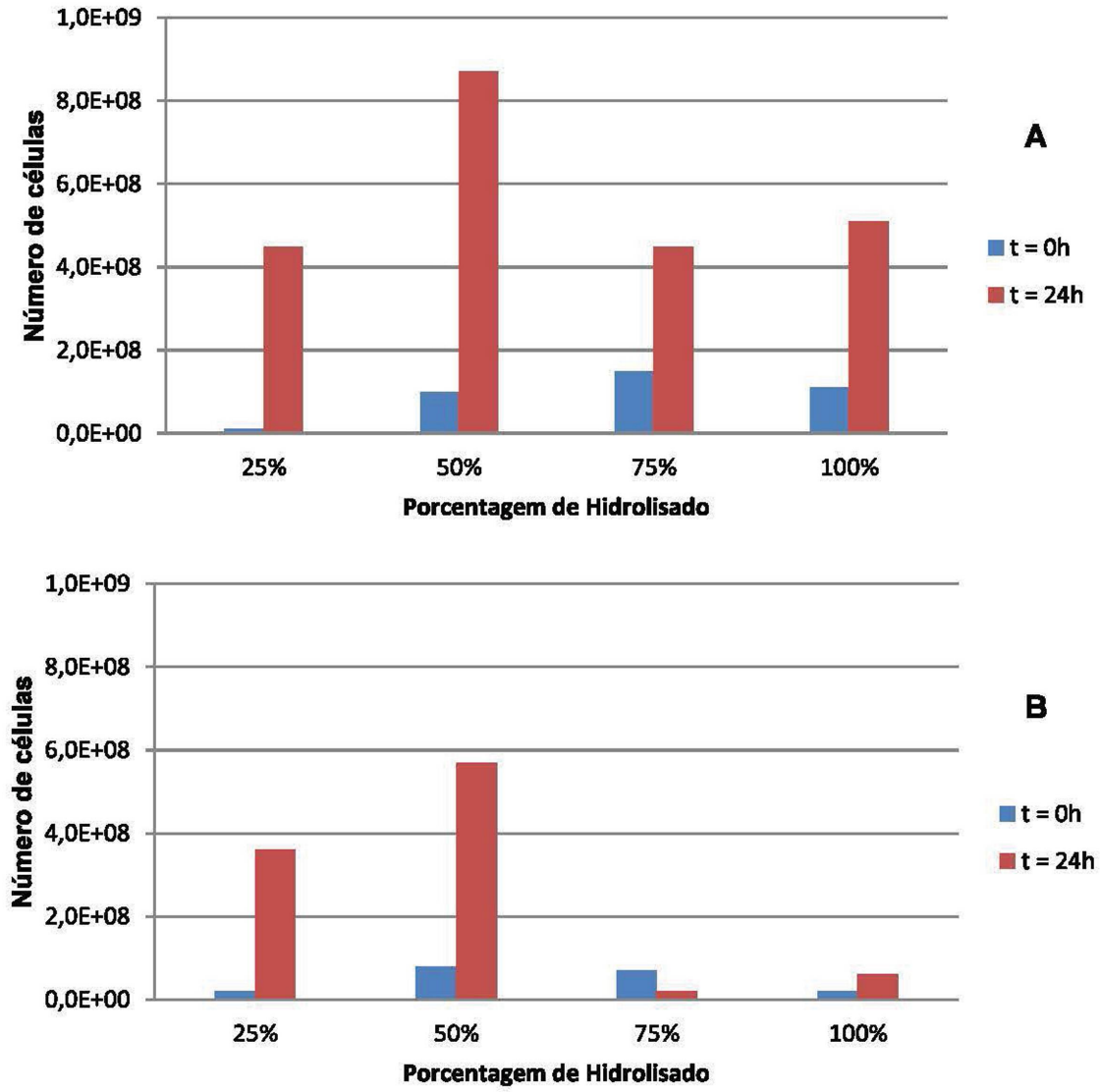
A utilização da levedura *P. stipitis* em fermentações de hidrolisados de material lignocelulósico, está condicionada ao uso de hidrolisados com baixa carga de compostos inibidores. A levedura *P. stipitis* é sensível a alguns compostos orgânicos, incluindo ácido acético e outros compostos como HMF e Furfural, que em determinadas concentrações reduzem o crescimento celular, diminuindo a produção de etanol (HUANG et al., 2009).

Desta forma, o emprego de estratégias que permitam superar os efeitos de inibição, representa um importante aspecto a ser considerado na utilização de hidrolisados lignocelulósicos como matéria prima em bioprocessos.

Uma dessas estratégias é a adaptação da levedura nos meios hidrolisados, através do cultivo sucessivo do microrganismo em concentrações crescentes do meio. Desta forma, obtêm-se cepas mais resistentes aos compostos tóxicos presentes em hidrolisados. Neste estudo apenas foi acompanhado o crescimento das cepas adaptadas em meios sucessivos de hidrolisados pela contagem de número de células em câmara de Neubauer e em placas.

A Figura 27, apresenta a variação de crescimento da levedura em relação ao número de células, na adpatação da *P. stipitis* em diferentes porcentagens de hidrolisados ácidos de EFB. As maiores inibições foram observadas em meios contendo 75% e 100% dos hidrolisados de EFB com ácido sulfúrico (MHdSO4), onde as concentrações de ácido acético estão acima de 5g/L.

FIGURA 27 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB, PARA ADAPTAÇÃO.



FONTE: O autor (2016).
NOTA: A - MHdCl, B - MHdSO4.

Embora as concentrações de ácido acético nos meios de 75% e 100% de hidrolisado de EFB de ácido clorídrico (MHdCl), sejam maiores que as observadas nos respectivos meios com (MHdSO4), a inibição do crescimento foi menor.

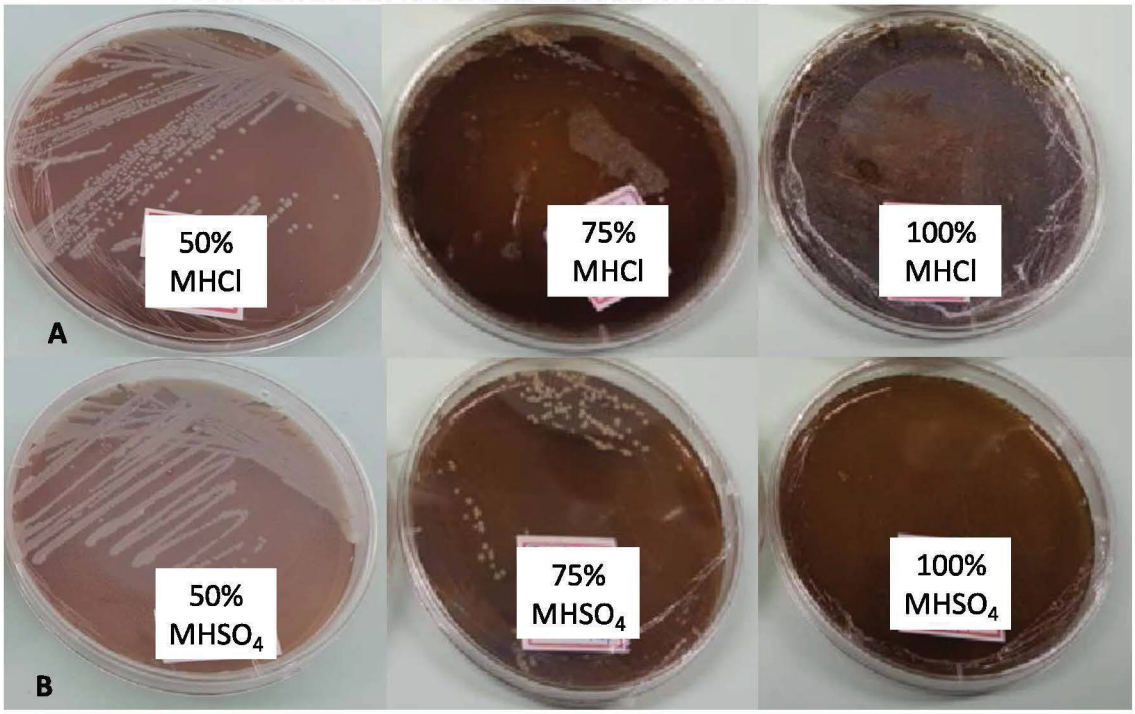
Esta observação pode ser relacionada com a composição do meio de cultivo, a qual contém compostos (sais, ácidos, fenólicos), que podem exercer efeito protetor sobre a levedura.

Estudos de CARNEIRO (2011), em relação à adaptação de cepas em hidrolisados de palha de arroz também obteve adaptações com até 75% de hidrolisado ácido, isolando uma cepa mais tolerante ao hidrolisado, a qual

aumentou a produção de etanol em 28%. HERRERA-RUALES; ARIAS-ZABALA (2014), em estudos de adaptação *P. stipitis* em meios sequenciais de hidrolisados de palma de 25%, 40%, 60%, 75%, 85% e 100%, obteve uma cepa, a qual aumentou em 3 vezes a velocidade máxima de crescimento sendo possível produzir 8,48g/L de etanol a partir de 22,4 g/L de xilose.

A Figura 28 A 8 B, apresentam o crescimento da levedura *Pichia stipitis* em placas, para as porcentagens de 50%, 75% e 100% de hidrolisados de EFB com ácido clorídrico (MHdCl) e com ácido sulfúrico (MHdSO4), respectivamente.

FIGURA 28 - CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM DIFERENTES PORCENTAGENS DE HIDROLISADOS DE EFB.



FONTE: O autor (2016).
NOTA: A - MHdCl, B - MHdSO4.

A levedura *P. stipitis* foi capaz de crescer em meios com 25% (não apresentado) e 50% em até 48h. Em meios contendo 75% de hidrolisado foi observado pequeno crescimento, mas somente após 72h de plaqueamento. Em 100% de hidrolisado o crescimento foi totalmente inibido.

As cepas adaptadas, foram denominadas de PCl25, PCl50, PCl75 e PS25, PS50, PS75, foram repicadas e mantidas em refrigeração para uso posterior.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que hidrolisados ácidos produzidos com resíduo de palma de dendê, especialmente EFB, podem ser fermentados por *Pichia stipitis*, desde que sejam estabelecidos as condições favoráveis ao seu crescimento e produção de etanol.

A adaptação da *Pichia stipitis*, em diferentes meios proporcionou o isolamento de cepas mais tolerantes ao hidrolisados ácidos de EFB, podendo ser utilizada para fermentação destes meios nas condições determinadas.

Pelos estudos realizados, embora o meio hidrolisado de EFB com ácido clorídrico e sulfúrico, apresentarem um meio complexo composto de fonte de carboidrato e vários sais minerais, necessários para o seu metabolismo celular a suplementação com uma fonte de nitrogênio se faz necessário. Sendo possível otimizar a concentração de extrato de levedura para redução dos custos.

Na fermentação de pentoses por *P. stipitis*, é influenciada pela disponibilização de oxigênio, necessitando de microaeração para a produção de etanol, e neste caso, utilizando-se de agitação de 120rpm, o volume ocupado pelo meio deve ser de 50% do volume do frasco.

Para a fermentação, os inóculos devem ser preparados com as cepas de *P. stipitis* adaptadas aos hidrolisados, com concentrações de 50 ou 75%.

Outros fatores como, a concentração de xilose inicial, relação entre a concentração de glucose e xilose, o tamanho do inóculo, assim como, a concentração de compostos inibidores como ácido acético, furfural e HMF, devem ser avaliados, para a produção eficiente de etanol.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F. K. et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333–2336, nov. 2006.

ALVAREZ-VASCO, C.; ZHANG, X. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of softwood: Hemicellulose degradation pathways. **Bioresource technology**, v. 150, p. 321–7, dez. 2013.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–61, jul. 2010.

AYENI, A. O. et al. Optimization of pretreatment conditions using full factorial design and enzymatic convertibility of shea tree sawdust. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 130–138, jan. 2013.

BAHARUDDIN, A. S. et al. Co-composting of empty fruit bunches and partially treated palm oil mill effluents in pilot scale. **International Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 2, p. 69–78, 2009.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, fev. 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.

BANERJEE, S. et al. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 12, p. 1680–1686, dez. 2009.

BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, ago. 2014.

BELLIDO, C. et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by Pichia stipitis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868–10874, dez. 2011.

BENJAMIN, Y.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Optimization of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment to Maximize Combined Sugar Yield from Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 610–630, jan. 2014.

BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovations. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, p. 1–21, 2013.

BIAN, J. et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638–645, abr. 2012.

BINOD, P. et al. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic sacchari fi cation and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 109–116, 2012.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. **Transport Phenomena**.

CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43135, 13 ago. 2012.

CAMPIONI, T. Obtenção de hidrolisado enzimático da fração celulósica de resíduos sólidos da palma para a produção de bioetanol. **Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biporocessos e Biotecnologia - UFPR.**, n. 1, p. 160, 2014.

CARNEIRO, L. M. Avaliação de estratégias de cultivo da levedura Pichia stipitis em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol. **Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo**, p. 175, 2011.

CARVALHEIRO, F. et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by Debaryomyces hansenii CCMI 941. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1215–1223, mar. 2005.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CARVALHO, L. G. **Produção de Biocombustíveis a Partir da Biomassa de Dendê (Elaeis guinaeensis).** Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (2009).

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

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by Candida shehatae NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, jul. 2007.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 108, n. May, p. 67–93, jan. 2007.

CHEN, W.-H. et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2916–24, fev. 2011.

CHEN, W.-H.; TU, Y.-J.; SHEEN, H.-K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, n. 8, p. 2726–2734, ago. 2011.

CHIESA, S.; GNANSOUNOU, E. Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for bioethanol production: A thorough comparison between dilute acid and dilute alkali pretreatment. **Bioresource technology**, v. 159C, p. 355–364, 7 mar. 2014.

CHIN, S. X. et al. Ball milling pretreatment and diluted acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch (EFB) fibres for the production of levulinic acid. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 000, p. 1–8, 2015.

CHUM, H. L. et al. Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, n. 1, p. 1–14, 1990.

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, n. 3, p. 220–225, ago. 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, n. 6, p. 360–364, jun. 1986.

DUBEY, A. K. et al. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting Pichia stipitis. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 825–829, abr. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.** [s.l: s.n.].

FERNANDES, T. V et al. Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 9, p. 2575–9, maio 2009.

FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain , Scheffersomyces stipitis UFMG-IMH 43 . 2 , isolated from the Brazilian forest. n. May, p. 547–554, 2011.

FERRER, A. et al. Influence of temperature, time, liquid/solid ratio and sulfuric acid concentration on the hydrolysis of palm empty fruit bunches. **Bioresource technology**, v. 129, p. 506–11, fev. 2013.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of

lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, nov. 2012.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78–88, 2006.

GAO, J. et al. Ionic liquid pretreatment to enhance the anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 150C, p. 352–358, 16 out. 2013.

GÍRIO, F. M. et al. Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOH, C. S. et al. Evaluation and optimization of organosolv pretreatment using combined severity factors and response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 4025–4033, out. 2011.

GOH, C. S.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Hot compressed water pretreatment of oil palm fronds to enhance glucose recovery for production of second generation bio-ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7362–7367, out. 2010.

GOH, C. S.; TAN, H. T.; LEE, K. T. Pretreatment of oil palm frond using hot compressed water: an evaluation of compositional changes and pulp digestibility using severity factors. **Bioresource technology**, v. 110, p. 662–9, 2012.

GUAN, D. et al. Sequential incubation of Candida shehatae and ethanol-tolerant yeast cells for efficient ethanol production from a mixture of glucose, xylose and cellobiose. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 419–422, 2013.

GUPTA, R.; MEHTA, G.; CHANDER KUHAD, R. Fermentation of pentose and hexose sugars from corncob, a low cost feedstock into ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 334–341, 2012.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, nov. 2013.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. VAN; FAAIJ, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, abr. 2005.

HAMES, B. et al. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 8 / 06 / 2008 Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). n. August, 2008.

HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 1, p. 10–8, jan. 2009.

HEREDIA-OLEA, E.; PÉREZ-CARRILLO, E.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and

C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 216–223, 2012.

HERRERA-RUALES, F. C.; ARIAS-ZABALA, M. Bioethanol production by fermentation of hemicellulosic hydrolysates of african palm residues using an adapted strain of Scheffersomyces stipitis. **Dyna**, v. 81, n. 185, p. 204–210, 2014.

HUANG, C.-F. et al. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of Pichia stipitis. **Bioresource technology**, v. 100, n. 17, p. 3914–20, set. 2009.

HUSSIN, M. H. et al. Physicochemical characterization of alkaline and ethanol organosolv lignins from oil palm (Elaeis guineensis) fronds as phenol substitutes for green material applications. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 23–32, ago. 2013.

INCROPERA, F. P.; DEWITT, D. P. **Fundamentos de transferencia de calor**. [s.l: s.n.].

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.-S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 221–268, 2000.

JUN, Y.; YU-PING, G. Biotechnology education for future: Learning motivation and innovation. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. S770–S771, out. 2008.

JUNG, Y. H. et al. Ethanol production from oil palm trunks treated with aqueous ammonia and cellulase. **Bioresource technology**, v. 102, n. 15, p. 7307–12, ago. 2011.

JUNG, Y. H. et al. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. **Bioresource technology**, v. 132, p. 109–14, mar. 2013.

KAAR, W. E.; HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. v. 18, 2000.

KIM, J. S. et al. Kinetic study of empty fruit bunch using hot liquid water and dilute acid. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1527–39, jul. 2012a.

KIM, S. et al. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. **Bioresource technology**, v. 109, p. 229–33, abr. 2012b.

KIM, S.; KIM, C. H. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. **Renewable Energy**, v. 54, p. 150–155, jun. 2013.

KRISTENSEN, J. B. et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 888–895, mar. 2007.

KRISTIANI, A. et al. Effect of pretreatment process by using diluted acid to characteristic of oil palm's frond. **Energy Procedia**, v. 32, p. 183–189, 2013.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950–4962, 2011.

KUMAR, S. et al. Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 83, p. 850–858, 2015.

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 151–159, 1999.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, v. 81, n. 1, p. 33–44, jan. 2002.

LEE, J. M.; JAMEEL, H.; VENDITTI, R. A. A comparison of the autohydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource technology**, v. 101, n. 14, p. 5449–58, jul. 2010.

LI, C. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4900–6, jul. 2010.

LI, H.-Q. et al. pH pre-corrected liquid hot water pretreatment on corn stover with high hemicellulose recovery and low inhibitors formation. **Bioresource technology**, v. 153, p. 292–9, fev. 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, ago. 2012.

LIN, T.-H. et al. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting Pichia stipitis. **Bioresource technology**, v. 116, p. 314–9, jul. 2012.

LIU, H. et al. Furfural formation from the pre-hydrolysis liquor of a hardwood kraft-based dissolving pulp production process. **Bioresource technology**, v. 131, p. 315–20, mar. 2013.

LU, H. et al. Effects of particle shape and size on devolatilization of biomass particle. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 1156–1168, maio 2010.

MARTINI, C. Isolamento, identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. **Tese (doutorado) - Universidade**

Estadual Paulista , Instituto de Biociências de Rio Claro., p. 121, 2014.

MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of novel xylose-fermenting yeast strains from Brazilian forests for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 345–352, 11 out. 2013.

MEDINA, J. D. C. et al. Steam explosion pretreatment of oil palm empty fruit bunches (EFB) using autocatalytic hydrolysis: A biorefinery approach. **Bioresource Technology**, set. 2015.

MESA, L. et al. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1157–1162, abr. 2011.

MOHAMMED, M. A. A. et al. Gasification of oil palm empty fruit bunches: A characterization and kinetic study. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 628–636, 2012.

MORAIS, C. G. et al. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 19–28, 2013.

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

NADIA, H. et al. Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, n. 0, p. 254–264, 2013.

NG, W. P. Q. et al. Waste-to-wealth: green potential from palm biomass in Malaysia. **Journal of Cleaner Production**, v. 34, n. September 2011, p. 57–65, out. 2012.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by Pichia stipitis. **Journal of biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17–27, 27 abr. 2001.

OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. Sono-assisted organosolv/H2O2 pretreatment of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) fronds for recovery of fermentable sugars: Optimization and severity evaluation. **Fuel**, v. 115, p. 170–178, jan. 2014.

OLIVA, J. M. et al. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 105 - 108, p. 141–153, 2003.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 95, p. 312–331, 1996.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. The potential for oligosaccharide production from

the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannooligosaccharides (MOS). **Carbohydrate research**, v. 360, p. 84–92, 1 out. 2012.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 523–536, 1987.

PALAMAE, S. et al. ScienceDirect Retention of hemicellulose during delignification of oil palm empty fruit bunch (EFB) fiber with peracetic acid and alkaline peroxide. **Biomass and Bioenergy**, p. 1–9, 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, ago. 2000.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PANAGIOTOPOULOS, I. A et al. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource technology**, v. 102, n. 24, p. 11204–11, dez. 2011.

PARK, N. et al. Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (Pinus rigida). **Bioresource technology**, v. 101, n. 18, p. 7057–64, set. 2010.

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 739–750, 2010.

PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PITARELO, A. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. **Tese (doutorado) Programa de Pós Graduação em Química – UFPR - Curitiba -PR**, p. 161, 2013.

PRAWITWONG, P. et al. Efficient ethanol production from separated parenchyma and vascular bundle of oil palm trunk. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 37–42, dez. 2012.

RAHMAN, S. H. A et al. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresource technology**, v. 98, n. 3, p. 554–9, fev. 2007.

RAHMAN, S. H. A.; CHOUDHURY, J. P.; AHMAD, A. L. Production of xylose from

oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 1, p. 97–103, maio 2006.

RAMAN, J. K.; GNANSOUNOU, E. Ethanol and lignin production from Brazilian empty fruit bunch biomass. **Bioresource Technology**, v. 172, p. 241–248, 2014.

RIANSA-NGAWONG, W.; PRASERTSAN, P. Optimization of furfural production from hemicellulose extracted from delignified palm pressed fiber using a two-stage process. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 1, p. 103–10, 3 jan. 2011.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693–3700, dez. 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANTOS, R. B. et al. Wood based lignin reactions important to the biorefinery and pulp and paper industries. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 1456–1477, 2013.

SARAIVA MORAIS, J. P.; DE FREITAS ROSA, M.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. p. 54, 2010.

SARITPONGTEERAKA, K. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Solid state co-fermentation as pretreatment of lignocellulosic palm empty fruit bunch for organic acid recovery and fi ber property improvement. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 100, p. 172–180, 2015.

SHINOJ, S. et al. Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 7–22, jan. 2011.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 31–38, abr. 2012.

SIDIK, D. A. B.; NGADI, N.; AMIN, N. A. S. Optimization of lignin production from empty fruit bunch via liquefaction with ionic liquid. **Bioresource technology**, v. 135, p. 690–6, maio 2013.

SILALERTRUKSA, T.; BONNET, S.; GHEEWALA, S. H. Life cycle costing and externalities of palm oil biodiesel in Thailand. **Journal of Cleaner Production**, v. 28, p. 225–232, jun. 2012.

SILVA, D. D. V et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by Candida guilliermondii in sugarcane bagasse hydrolysate. p. 248–254, 2004.

SILVA, J. P. A. et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by Pichia stipitis. **Renewable Energy**, v.

37, n. 1, p. 259–265, jan. 2012.

SINDHU, R. et al. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 67–72, 2013.

SINGLA, A. et al. Bioethanol production from xylose: Problems and possibilities. **Journal of Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1, 2012.

SKOOG, K. et al. Xylose fermentation. v. 10, n. April 1987, p. 66–80, 1988.

SLININGER, P. J. et al. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast Pichia stipitis NRRL Y-7124. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1285–1296, 2006.

SLUITER, A. et al. Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars , Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. n. January, 2008a.

SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). n. January, 2008b.

SLUITER, A. et al. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. n. March, 2008c.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. n. June, 2010.

SRIMACHAI, T. et al. Optimization and Kinetic Modeling of Ethanol Production from Oil Palm Frond Juice in Batch Fermentation. [s.l.] Elsevier B.V., 2015. v. 79

SULAIMAN, F. et al. An outlook of Malaysian energy , oil palm industry and its utilization of wastes as useful resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3775–3786, 2011.

SUMATHI, S.; CHAI, S. P.; MOHAMED, A. R. Utilization of oil palm as a source of renewable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 9, p. 2404–2421, dez. 2008.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5474–9, set. 2008.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 1 set. 2008.

TAN, H. T.; LEE, K. T. Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 448–458, 2012.

TAN, L. et al. Pretreatment of empty fruit bunch from oil palm for fuel ethanol production and proposed biorefinery process. **Bioresource technology**, v. 135, p. 275–82, maio 2013.

THAIS OGEDA. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

TIMILSENA, Y. P. et al. Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass. **Bioresource technology**, v. 135, p. 82–8, maio 2013.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221–1223, 1984.

TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource technology**, v. 157, p. 68–76, abr. 2014.

TRAVAINI, R. et al. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource technology**, v. 133, p. 332–9, abr. 2013.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal of Animal Science**, v. 26, p. 119–128, 1967.

VAN SOEST, P. J. . W. R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists,** v. 51, p. 780–785, 1968.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 10, p. 3583–97, out. 1991.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica: organografiaViçosa: Imprensa Universitária UFV**, 2000. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Bot&#65533;nica+Organografia#0>

WANG, K. et al. Influence of delignification efficiency with alkaline peroxide on the digestibility of furfural residues for bioethanol production. **Bioresource technology**,

v. 146, p. 208–14, out. 2013.

WANG, Z. et al. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource technology**, v. 101, n. 10, p. 3583–5, maio 2010.

WATANABE, T. et al. A UV-induced mutant of Pichia stipitis with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1844–8, jan. 2011.

WIJAYA, Y. P. et al. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 164, p. 221–31, jul. 2014.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Xanthan Gum Production From Cassava Bagasse Hydrolysate With <I>Xanthomonas campestris</I> Using Alternative Sources of Nitrogen. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 305–312, 2004.

YAMADA, H. et al. Old oil palm trunk: A promising source of sugars for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 11, p. 1608–1613, nov. 2010.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: **The Yeasts.** [s.l.] Elsevier, 1998. p. 77–100.

YE, L. et al. Simultaneous detoxification, saccharification and co-fermentation of oil palm empty fruit bunch hydrolysate for l-lactic acid production by Bacillus coagulans JI12. **Biochemical Engineering Journal**, v. 83, p. 16–21, fev. 2014.

YOO, C. G. et al. Pretreatment of corn stover using low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) process. **Bioresource technology**, v. 102, n. 21, p. 10028–34, nov. 2011.

YU, Q. et al. Two-step liquid hot water pretreatment of Eucalyptus grandis to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4895–9, jul. 2010.

YUNUS, R. et al. Effect of ultrasonic pre-treatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch. **Bioresource technology**, v. 101, n. 24, p. 9792–6, dez. 2010.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 142–148, 2015.

ZHANG, D. et al. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. **Chemical Engineering Journal**, v. 181-182, p. 636–642, fev. 2012.

ZHANG, Y.; FU, X.; CHEN, H. Pretreatment based on two-step steam explosion

combined with an intermediate separation of fiber cells--optimization of fermentation of corn straw hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 100–4, out. 2012.

ZHENG, Y. et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 42, p. 35–53, 2014.

ZU, S. et al. Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 364–370, 2014.