



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
**Faculdade de Engenharia Química**

Viviane Marcos Nascimento Vicente

**Hidrolisado hemicelulósico: destoxificação, caracterização dos compostos  
fenólicos e avaliação do processo fermentativo para produção de E2G**

**Hemicellulosic hydrolysate: detoxification, phenolics characterization and  
fermentability evaluation for 2G ethanol**

CAMPINAS  
2020

VIVIANE MARCOS NASCIMENTO VICENTE

**Hidrolisado hemicelulósico: destoxificação, caracterização dos compostos fenólicos e avaliação do processo fermentativo para produção de E2G**

*Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.*

**Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Sarita Cândida Rabelo**

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VIVIANE MARCOS NASCIMENTO VICENTE, E ORIENTADA PELO PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO.

**CAMPINAS**

**2020**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

V622h Vicente, Viviane Marcos Nascimento, 1986-  
Hidrolisado hemicelulósico: destoxificação, caracterização dos compostos fenólicos e avaliação do processo fermentativo para produção de E2G / Viviane Marcos Nascimento Vicente. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Rubens Maciel Filho.  
Coorientador: Sarita Candida Rabelo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Lignina. 3. Pentoses - Metabolismo. 4. Etanol 2G. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Rabelo, Sarita Candida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Hemicellulosic hydrolysate: detoxification, phenolics characterization and fermentability evaluation for 2G ethanol

**Palavras-chave em inglês:**

Sugarcane bagasse

Lignin

Pentoses- Metabolism

2G ethanol

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Rubens Maciel Filho

Aline Carvalho da Costa

Adilson Roberto Gonçalves

Daniel Ibraim Pires Atala

Rafael Ramos de Andrade

**Data de defesa:** 03-08-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0737-2045>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8560315748041202>

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Defesa de Tese de Doutorado defendida por Viviane Marcos Nascimento Vicente, aprovada em 03 de agosto de 2020, pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Presidente e Orientador

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dr. Adilson Roberto Gonçalves

Unesp Rio Claro

Videoconferência

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Bioprocess Improvement Consultoria e Pesquisas em Bioprocessos LTDA.

Videoconferência

Dr. Rafael Ramos de Andrade

Universidade Federal de São Paulo

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

**Dedico esse trabalho aos meus pais, Waldomiro e Selma, a minha irmã Juliane, ao meu marido Marcéu e a minha filha Luiza que chegou para completar a nossa família.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus pelos direcionamentos, paciência e sabedoria ao longo desses anos para concluir essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Waldomiro e Selma, pelo apoio e amor incondicional.

A minha irmã Juliane pelo companheirismo, amizade, amor em todos os momentos e por me ensinar que a vida se vive hoje.

Ao meu marido Marcéu, pelo amor, incentivo, compreensão e principalmente paciência durante todos os momentos ao longo dessa longa trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubens Maciel Filho pela oportunidade, orientação e confiança ao longo desse trabalho.

A minha co orientadora e amiga Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sarita Candida Rabelo, pela grande oportunidade, direcionamentos e principalmente aprendizado.

A Silvana e Maurício do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pelo auxílio com as análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto e ao César Augusto Gandin da Unesp Botucatu pelo auxílio com as análises de SAX 's realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS).

A Gisláine pelo auxílio com a atividade antioxidante e a Simone pelo auxílio na fermentação.

Ao Dr. George Jackson de Moraes Rocha pelos ensinamentos aos longos desses anos.

A toda equipe do Laboratório Nacional de Biorenováveis (LNBR – CNPEM), em especial Tatiane, Thaynara, Daniele, Renan, Angélica, Gisláine, Edilaine, Bianca, Paula e Lívia pela amizade e disposição em tornar o nosso local de trabalho um ambiente agradável.

Ao Vitor pelo notebook que foi de significativa importância para o término dessa tese.

Meus sinceros agradecimentos a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

## RESUMO

A fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico apresenta inúmeros desafios tecnológicos em termos de rendimento, principalmente devido a complexidade estrutural dos compostos inibidores que o constituem. Este trabalho tem como objetivo investigar o processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, obtido após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana-de-açúcar, visando a extração dos ácidos orgânicos, aldeídos furânicos e compostos fenólicos que são sub-produtos formados durante o processo, além da avaliação da fermentabilidade dos meios não destoxificados e destoxificados pelo cultivo das leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum*. Adicionalmente, uma caracterização sistemática dos compostos presentes nas frações orgânicas e aquosas foi realizado. A destoxificação abordou uma etapa de evaporação, seguida de extração líquido-líquido, utilizando, para verificação da eficiência, separadamente quatorze solventes entre álcoois, cetonas, ésteres e dois tipos de biodiesel. A evaporação, sob pH 1,7, resultou na remoção de  $16,0 \pm 0,8$  % ácido fórmico,  $65,0 \pm 1,0$  % ácido acético,  $13,0 \pm 0,5$  % HMF,  $98,0 \pm 0,9$  % furfural e  $34 \pm 0,77$  % compostos fenólicos sem arrastes expressivos de carboidratos para o destilado. Os álcoois apresentaram as melhores eficiências de extrações dos inibidores. Em contrapartida, inibiram o crescimento celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*, com acúmulo de  $70,9 \pm 1,70$  % e  $56,0 \pm 2,27$  % de açúcares redutores residuais para o butanol, respectivamente. Os solventes MIBK, MTBE e DIBK resultaram em incrementos de produtividade na faixa de 85 % a 90 % para *S. stipitis* e em torno de 34 % em relação ao hidrolisado evaporado para *S. passalidarum*. Os compostos fenólicos extraídos nas frações orgânicas apresentaram baixa massa molar, máximo de Mw de 725 g/mol e estruturas correspondentes a *p*-cumaratos e ferulatos. O hidrolisado evaporado apresentou concentrações majoritárias de ácido 4-hidroxicinâmico (0,5 g/L), 4-hidroxiacetofenona (0,3 g/L) e 4- hidroxibenzaldeído (0,2 g/L). O processo por destoxificação por MIBK foi o selecionado e resultou na remoção de 36 % dos compostos presentes (detectado por UPLC-MSMS), sendo majoritariamente constituídos por fragmentos de massa molar até 400 g/mol. O MIBK extraiu do hidrolisado evaporado todos os padrões avaliados, exceto os ácidos ferúlico e trans-ferúlico, com concentrações residuais de 0,01 g/L. A avaliação preliminar dos impactos das estruturas dos inibidores frente ao desempenho fermentativo indicou ação sinérgica de unidades ferulato com ácido acético em concentrações acima de 2 g/L, resultando em inibição fermentativa para ambas as leveduras estudadas.

Palavras- chave: bagaço de cana; hidrolisado hemicelulósico; destoxificação; extração líquido-líquido; fermentação pentoses; caracterização lignina.

## ABSTRACT

The hemicellulosic hydrolysate fermentability still present innumerable technological challenges in terms of yield, mainly due structural complexity of inhibitory compounds. The objective of this work was to study the detoxification process of the hemicellulosic hydrolysate, obtained after dilute sulfuric acid pre-treatment of sugarcane bagasse, aiming the extraction of organic acids, furanic aldehydes and phenolic compounds, besides fermentability of the non-detoxified and detoxified hydrolysate evaluation by *S. stipitis* and *S. passalidarum* in shaker and laboratory biorreactor. In addition, a systematic characterization of the phenolic compounds from organic and water fractions were carried out. The detoxification addressed an evaporation step, followed by liquid-liquid extraction, using fourteen solvents as alcohols, ketones, ethers and biodiesel. Evaporation, under pH 1,7 resulted in  $16.0 \pm 0.8$  % formic acid,  $65.0 \pm 1.0$  % acetic acid, and  $13.0 \pm 0.5$  % HMF,  $98.0 \pm 0.9$  % of furfural and  $34.0 \pm 0.77$  % of the phenolic content removals, without expressive carbohydrate loss for the distillate. The highest inhibitors efficiency extractions were achieved for alcohols. In contrast, these solvents resulted in cell growth inhibition both *S. stipitis* and *S. passalidarum*, with accumulation of  $70.9 \pm 1.70$  % and  $56.0 \pm 2.27$  % of residual reducing sugars in 48 hours of fermentation, for butanol. MIBK, MTBE and DIBK resulted in improvements in ethanol volumetric productivity in the range of 85-90 % for *S. stipitis* and around 34% in relation to the evaporated hydrolysate for *S. passalidarum*. The extracted compounds showed low molar mass, with a maximum value of Mw of 725 g/mol and typical signals from *p*-coumarates and ferulates structures. The evaporated hydrolysate presented majority concentrations of 4-hydroxycinnamic acid (0.5 g/L), 4-hydroxyacetophenone (0.3 g/L) and 4-hydroxybenzaldehyde (0.2 g/L). MIBK was the selected solvent and resulted in 36 % of compounds removal (detected from UPLC-MSMS), with the majority under 400 g/mol. MIBK extracted from hydrolysate all evaluated standards, excepted for ferulic and trans-ferulic acids, with 0,01g/L of residual concentrations. The preliminary assessment of inhibitors structures and fermentative performance pointed a sinergic relation of ferrulates and acetic acid (above 2 g/L), resulting in both yeasts inhibition.

Keywords: sugarcane bagasse; hemicellulosic hydrolysate; detoxification; liquid-liquid extraction; pentoses fermentation; lignin characterization



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Fluxograma com os processos gerais desta Tese. ....	20
<b>Figura 2.</b> Ilustrativo da distribuição dos principais componentes da parede celular vegetal. .	27
<b>Figura 3.</b> Modelo molecular de uma xilana de gramínea, incluindo (A) - regiões das arabinoxilanas substituída por éster de ácido ferúlico ligado ao 5-OH da arabinofuranose, (B) $\beta$ -1,4-xilose substituída com $\alpha$ -1,2 e/ou $\alpha$ -1,3-arabinofuranose da arabinoxilana, (C) $\beta$ -1,4-xilose sem substituição.....	29
<b>Figura 4.</b> Estrutura do ácido ferúlico esterificado a arabinoxilana (principal componente das hemiceluloses em monocotiledôneas), onde (A) representa o ácido ferúlico ligado a arabinose da cadeia da arabinoxilana pela ligação O-5; (B) ligação $\beta$ -1,4- da cadeia xilana e (C) ligação $\alpha$ -1,2- ligada a L-arabinose. ....	30
<b>Figura 5.</b> Estrutura simplificada da ligação entre o ácido ferúlico (FA) e a arabinoxilana (AX) na parede celular de gramíneas. Onde a ligação $\beta$ -1,4 da cadeia da xilana é representada pelas linhas pontilhadas e as cadeias laterais, como a arabinose são representas com círculos. As ligações éster e éter são identificadas com setas conforme numeração: (1) grupo acetil; (2) ligação éster de FA para AX (3) ligação entre arabinoxilana e lignina (4) ligação éster 5-5 entre os dímeros de FA acoplados as cadeias AX (5) ligação éter entre FA e a lignina. ....	31
<b>Figura 6.</b> Álcoois precursores e respectivas unidades constitucionais da lignina. ....	33
<b>Figura 7.</b> Esquema simplificado da biossíntese da lignina em plantas vasculares PAL: fenilalanina amônia liase, POX: peroxidases, LAC: lacases, e ROS: espécies oxigênio ativas. ....	34
<b>Figura 8.</b> Formação do radical e estrutura de ressonância para estabilização. ....	36
<b>Figura 9.</b> Exemplo de formação da ligação $\beta$ -O-4. ....	36
<b>Figura 10.</b> Exemplo de formação da ligação $\beta$ -5. ....	36
<b>Figura 11.</b> Exemplo de formação da ligação $\beta$ - $\beta$ . ....	37
<b>Figura 12.</b> Estrutura da lignina e suas principais ligações interunidades. ....	39
<b>Figura 13.</b> Representação da formação dos produtos de degradação a partir de pentoses e hexoses dos materiais lignocelulósicos. ....	44
<b>Figura 14.</b> Esquemático representativo dos mecanismos de inibição propostos na literatura para aldeídos furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos para <i>S. cerevisiae</i> . ....	49
<b>Figura 15.</b> Reator de pré-tratamento de 350L e do filtro do tipo Nutsche utilizado no processo de separação sólido-líquido. ....	54
<b>Figura 16.</b> Fluxograma esquemático da etapa de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar com as correntes de entrada e saída do processo; Sendo: A) Bagaço <i>in-natura</i> ; B) hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) e C) celulignina (fração sólida). ....	57
<b>Figura 17.</b> Balanço de massa das hemiceluloses e celulose para o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído (140°C; 0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 15min). ....	58
<b>Figura 18.</b> Região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$ 50-105/2,5-6,0) no espectro de HSQC do hidrolisado hemicelulósico com ajuste de pH. ....	60
<b>Figura 19.</b> Espectro de infravermelho (FTIR) do hidrolisado hemicelulósico.....	63
<b>Figura 20.</b> Micrografias do bagaço de cana <i>in-natura</i> (A) e após pré-tratamento com ácido diluído (B, C e D). ....	64
<b>Figura 21.</b> Balanço de massa do processo de concentração do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de- açúcar.....	73
<b>Figura 22.</b> Eficiência de extração líquido-líquido para os ácidos orgânicos: a) ácido fórmico, b) ácido levulínico e c) ácido acético. ....	77

<b>Figura 23.</b> Eficiência de extração líquido-líquido para os furanos e fenólicos: a) HMF, b) furfural e c) fenólicos. ....	78
<b>Figura 24.</b> Eficiência de extração líquido-líquido para carboidratos. ....	79
<b>Figura 25.</b> Valores de rendimento (%), AR residual (%) e produtividade volumétrica na fermentação utilizando <i>S. stipitis</i> de xilose e xilose acrescida de volumes de solvente orgânico de acordo percentual de solubilidade no hidrolisado hemicelulósico (evaporado). ....	87
<b>Figura 26.</b> Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade em 24 h de fermentação utilizando <i>S. passalidarum</i> no meio preparado acrescido de teores de solvente orgânico de acordo percentual de solubilidade no hidrolisado hemicelulósico (evaporado). ..	88
<b>Figura 27.</b> Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade em 48 h de fermentação por <i>S. stipitis</i> do meio preparado (xilose), e 72 h de fermentação para os hidrolisados evaporado e após processo de destoxificação. ....	91
<b>Figura 28.</b> Perfil de consumo de açúcar redutor total (g/L), e produção de etanol (g/L), biomassa (g/L) e xilitol (g/L) na fermentação por <i>S. stipitis</i> de xilose (meio sintético), do hidrolisado evaporado e dos hidrolisados antes (hidrolisado evaporado) e após a etapa de destoxificação empregando os solventes acetato de isobutila, MIBK, Butanol, MTBE, DIBK, decanol, álcool isoamílico, acetato de butila, acetato de isoamila, propionato de isoamila, 2 etilhexanol, biodiesel de óleo de mamona, biodiesel de óleo de coco, acetato de heptila. ....	92
<b>Figura 29.</b> Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade de etanol em 48 h de fermentação por <i>S. passalidarum</i> do meio preparado (xilose), hidrolisado evaporado e hidrolisados após processo de destoxificação. ....	101
<b>Figura 30.</b> Perfil de consumo de açúcar redutor total (g/L), e produção de etanol (g/L), biomassa (g/L) e xilitol (g/L) para fermentação com <i>S. passalidarum</i> do meio preparado (xilose) e dos hidrolisados evaporado e após destoxificação empregando extração líquido-líquido. .	102
<b>Figura 31.</b> Espectros de infravermelho dos extratos fenólicos provenientes das extrações líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico obtidos na região espectral de 4000 a 650 cm <sup>-1</sup> . ....	120
<b>Figura 32.</b> Perfil de polidispersão dos compostos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando-se distintos solventes orgânicos: MIBK (1); MTBE (2); acetato de isobutila (4); acetato de isoamila (5); propionato de isoamila (6); DIBK (7); acetato de heptila (8) e acetato de butila (9).....	127
<b>Figura 33.</b> Representação esquemática das duas populações de lignina e suas contribuições para o espalhamento de raios- X.....	130
<b>Figura 34.</b> Dados de SAXs normalizados em log (I) versus log (q) para os distintos extratos fenólicos do hidrolisado hemicelulósico. ....	131
<b>Figura 35.</b> Mapa de contorno completo 2D HSQC de frações fenólicas de bagaço de cana-de-açúcar extraídas de hidrolisado hemicelulósico (evaporado) com MIBK.....	135
<b>Figura 36.</b> Região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$ 50–105/ 2,5– 6,0) no espectro de RMN 2D HSQC dos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes: MIBK (1); MTBE (2); acetato de isobutila (4); acetato de isoamila (5); propionato de isoamila (6); DIBK (7); acetato de heptila (8) e acetato de butila (9).....	137
<b>Figura 37.</b> Região aromática/insaturada ( $\delta_C/\delta_H$ 105–155/ 6,0–8,0) do espectro de RMN 2D HSQC dos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes: MIBK (1); MTBE (2); acetato de isobutila (4); acetato de isoamila (5); propionato de isoamila (6); DIBK (7); acetato de heptila (8) e acetato de butila (9). ....	139
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas de Py-GC/MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico evaporado empregando solventes orgânicos. ....	144

<b>Figura 39.</b> Abundância relativa dos derivados S, G e H, e unidades monoméricas simples identificadas no Py-CG-MS (monômeros simples foram reportados como a soma dos percentuais em área de fenol, siringol e guaiacol).....	148
<b>Figura 40.</b> Cromatogramas de Py-TMAH-GC-MS dos extratos fenólicos provenientes do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes. ....	150
<b>Figura 41.</b> Termogramas dos extratos fenólicos provenientes do hidrolisado hemicelulósico obtidos em atmosfera oxidante. A curva de TGA é representada pela linha preta e a curva de DTG pela linha tracejada. acetato de butila (1), acetato de isobutila (2), acetato de isoamila (3), propionato de isoamila (4), acetato de heptila (5), MIBK (6), DIBK (7) e MTBE (8). ....	157
<b>Figura 42.</b> Concentração de ácido acético no ponto inicial da fermentação e percentual de açúcares redutores para fermentação por <i>S. stipitis</i> e <i>S. passalidarum</i> e as razões <i>pCa/FA</i> dos fenólicos extraídos dos hidrolisados durante a etapa de destoxificação.....	166
<b>Figura 43.</b> Produtividade específica em etanol das fermentações pelas leveduras <i>S. stipitis</i> e <i>S. passalidarum</i> dos hidrolisados destoxificados pelo processo de extração líquido-líquido e características dos fenólicos extraídos como teor de metoxila (OCH <sub>3</sub> ), massa molar (Mw) e razão grupo hidroxila fenólico e alifático (OH <sub>fenólico</sub> /OH <sub>alifático</sub> ).....	168
<b>Figura 44.</b> Espectro de UPLC-MSMS do hidrolisado hemicelulósico evaporado (linha verde) e após destoxificação por MIBK (linha vermelha).....	174
<b>Figura 45.</b> Número de compostos fenólicos identificados nos hidrolisados hemicelulósicos antes e após processo de dextoxificação por MIBK e as respectivas faixas de massa molar. ....	175
<b>Figura 46.</b> Correlação entre toxicidade dos fenólicos para as células da levedura e hidrofobicidade dos fenólicos.....	177

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição média de algumas biomassas lignocelulósicas. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Condições e características de alguns pré-tratamentos empregados no fracionamento de biomassa lignocelulósica. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Concentração de ácidos alifáticos, compostos fenólicos e aldeídos furânicos em hidrolisados oriundos de pré-tratamentos ácidos de bagaço de cana-de-açúcar (- concentrações não reportadas pelos autores). ....	43
<b>Tabela 4.</b> Métodos de remoção de compostos inibitórios usualmente empregados na literatura para hidrolisado hemicelulósico. ....	52
<b>Tabela 5.</b> Composição físico-química do bagaço de cana <i>in-natura</i> e após pré-tratamento com ácido diluído. ....	58
<b>Tabela 6.</b> Composição do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. ....	59
<b>Tabela 7.</b> Atribuições dos sinais de correlação carbono-hidrogênio para os carboidratos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de açúcar, caracterizado por RMN-HSQC. ....	61
<b>Tabela 8.</b> Identificação dos solventes empregado no processo de extração líquido-líquido e das respectivas purezas, marcas e massas molares. ....	70
<b>Tabela 9.</b> Solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico evaporado, empregados na etapa de destoxificação por extração líquido-líquido. ....	75
<b>Tabela 10.</b> Propriedades físicas dos solventes investigados para a destoxificação. ....	87
<b>Tabela 11.</b> Deslocamentos químicos e atribuições correspondentes para os compostos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico. ....	118
<b>Tabela 12.</b> Atribuições do espectro de infravermelho para os extratos fenólicos provenientes das extrações líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico. ....	121
<b>Tabela 13.</b> Médias de massa molar (Mn e Mw) e polidispersividade (PD) para as frações fenólicas extraídos do hidrolisado hemicelulósico definidas por GPC. ....	126
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros estruturais obtidos através de espalhamento de SAXs para os compostos fenólicos. ....	132
<b>Tabela 15.</b> Atribuições dos picos de correlação de lignina $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ nos espectros 2D HSQC de frações fenólicas extraídas de hidrolisado hemicelulósico. ....	141
<b>Tabela 16.</b> Características estruturais (unidades aromáticas, razão S/G, teor de cinamatos e razão <i>p</i> -cumaratos/ferulatos) das integrações dos picos de correlação $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ para o espectro de HSQC das frações fenólicas. ....	142
<b>Tabela 17.</b> Atribuições e abundâncias relativas dos compostos liberados após Py-GC/MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico (evaporado). ....	145
<b>Tabela 18.</b> Atribuições e abundâncias relativas dos compostos liberados após Py-TMAH-GC-MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico. ....	151
<b>Tabela 19.</b> Valores de temperaturas máximas de degradação (DTGmáx) para as frações fenólicas provenientes do hidrolisado hemicelulósico. ....	159
<b>Tabela 20.</b> Sistema de solventes e gradiente do eluente utilizado na análise. Detecção realizada em modo positivo e negativo. ....	163
<b>Tabela 21.</b> Quantificação de padrões fenólicos no hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido, antes e após extração com MIBK. ....	172
<b>Tabela 22.</b> Valores de toxicidade (IC <sub>50</sub> ) para as células da levedura e hidrofobicidade dos fenólicos. ....	176

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS: álcool sinapílico

AX: Arabinoxilana

CL: celulignina

DMSO-*d*<sub>6</sub> – dimetilsulfóxido deuterado

E2G: etanol de segunda geração

ELL: extração líquido-líquido

FA: ácido ferúlico

FTIR: espectrometria de infravermelho

G: guaiacila

GAX: glucuronoarabinoxilana

GAX: glucuronoarabinoxilana

GPC: cromatografia em permeação em gel;

H: *p*-hidroxifenila

HMF: hidroximetilfurfural

LAC: lacases

LH: hidrolisado hemicelulósico

MIBK- metilisobutilcetona

ML: lamela média

M<sub>w</sub>: massa molar média

*p*Ca: ácido *p*-cumárico

PD: polidispersividade

POX: peroxidases,

Py-CGMS- pirólise analítica acoplada a cromatografia gasosa e espectrômetro de massas

RMN-2D- Ressonância magnética nuclear de duas dimensões

ROS: espécies oxigênio ativas

S: siringila

SAXs: espalhamento de raios-X de baixo ângulo

TMAH: hidróxido de tetrametilamônio

TMS: tetrametilsilano

## Sumário

CAPÍTULO 1 - Introdução.....	17
1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.1 Objetivos Específicos .....	20
1.2 Relevância Científica e Contribuições da Tese .....	21
1.3 Contextualização do trabalho no cenário brasileiro de biocombustíveis.....	22
1.4 Organização do Trabalho .....	24
CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica .....	26
2.1 Aproveitamento da biomassa lignocelulósica e desafios tecnológicos.....	26
2.2 Materiais Lignocelulósicos e a parede celular vegetal .....	26
2.3 Celulose.....	27
2.4 Hemiceluloses .....	27
2.5 Os ácidos <i>p</i> -hidroxicinâmicos.....	28
2.6 Lignina .....	32
2.6.1 Origem e estrutura da lignina .....	33
2.7 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos .....	39
2.7.1 Pré-tratamento com ácido diluído, formação dos compostos inibitórios e seus efeitos nos processos fermentativos .....	40
2.8 Processos de Destoxificação .....	49
CAPÍTULO 3 - Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico e da celulignina proveniente do pré-tratamento ácido .....	53
3.1 Materiais e Métodos.....	53
3.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído para obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	53
3.1.2 Caracterização da celulignina – fração sólida .....	55
3.1.3 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) e da celulignina (fração sólida).....	55
3.1.4 Balanço de massa da etapa de pré-tratamento .....	56
3.2 Resultados .....	57
3.2.1 Pré-tratamento ácido diluído .....	57
3.3 Conclusões parciais.....	67
CAPÍTULO 4 - Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico .....	68
4.1 Materiais e Métodos.....	68
4.1.1 Centrifugação do hidrolisado hemicelulósico .....	68

4.1.2	Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico .....	69
4.1.3	Determinação da solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico.....	71
4.2	Resultados .....	71
4.2.1	Concentração do hidrolisado hemicelulósico .....	71
4.2.2	Extração líquido-líquido .....	74
4.3	Conclusões parciais.....	81
CAPÍTULO 5 - Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados .....		83
5.1	Materiais e Métodos.....	83
5.1.1	Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados em shaker.....	83
5.2	Resultados e Discussão .....	86
5.2.1	Biocompatibilidade dos solventes empregados na etapa de destoxificação para <i>S. passalidarum</i> e <i>S. stipitis</i> .....	86
5.2.2	Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados com <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124.....	90
5.2.3	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado destoxificado com <i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y- 27907.....	100
5.3	Conclusões parciais.....	109
CAPÍTULO 6 - Obtenção e caracterização dos compostos fenólicos.....		111
6.1	Materiais e Métodos.....	111
6.1.1	Recuperação dos compostos fenólicos do hidrolisado hemicelulósico .....	111
6.1.2	Caracterização dos compostos fenólicos .....	112
6.2	Resultados .....	116
6.2.1	Caracterização das frações fenólicas extraídas no processo de destoxificação....	116
6.3	Conclusões parciais.....	160
CAPÍTULO 7 – Avaliação das características dos inibidores frente a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos .....		162
7.1	Materiais e Métodos.....	162
7.1.1	Caracterização do hidrolisado antes e após destoxificação com MIBK por UPLC-MSMS.....	162
7.1.2	Valores de toxicidade (IC <sub>50</sub> ) .....	164
7.2	Resultados .....	165
7.2.1	Avaliação das características dos fenólicos extraídos frente a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos .....	165
7.2.2	Análise do hidrolisado antes e após destoxificação com MIBK por UPLC-MSMS.....	170
7.3	Conclusões parciais.....	179

CAPÍTULO 8 - Conclusões e sugestões para próximos trabalhos .....	180
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	183
ANEXOS .....	204



## CAPÍTULO 1 - Introdução

A demanda por alternativas energéticas e processos envolvendo matrizes renováveis, resulta em pesquisas e na busca do desenvolvimento de novas tecnologias capazes de otimizar e tornar economicamente viáveis processos de conversão de lignocelulósicos em combustíveis e/ou insumos químicos.

Diferentes estratégias de pré-tratamento podem ser utilizadas para a diminuição da recalcitrância do material para subsequente liberação de açúcares na forma fermentescível.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico é um dos processos mais comumente empregados no fracionamento de materiais lignocelulósicos, provendo uma fração sólida rica em carboidratos insolúveis (majoritariamente celulose) e lignina e uma fração líquida rica em açúcares monoméricos e oligoméricos solúveis (majoritariamente pentoses devido à maior susceptibilidade de hidrólise das cadeias de hemiceluloses em meio ácido) (Vaz et al., 2017).

Entretanto, vários compostos tóxicos ao metabolismo microbiano são formados durante este processo, prejudicando assim os processos fermentativos. O furfural e hidroximetilfurfural, inseridos na classe dos furânicos, são formados pela desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, durante a etapa de pré-tratamento (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a; Taherzadeh et al., 2000), e são responsáveis pela indução de modificações na cromatina, danos ao DNA, e inativação de inúmeras enzimas glicolíticas (Allen et al., 2010; Ask et al., 2013b; Banerjee et al., 1981).

Os ácidos orgânicos, como o ácido acético, formados a partir da desacetilação da xilana, e os ácidos fórmico e levulínico, produzidos a partir da degradação dos carboidratos, induzem a acumulação de células na fase de síntese de proteínas do ciclo celular e afetam o potencial e o fluxo de nutrientes da membrana citoplasmática (Zaldivar and Ingram, 1999).

Os compostos fenólicos englobam inúmeros tipos de compostos aromáticos com distintos tamanhos de cadeias, ramificações e grupos funcionais, sendo majoritariamente derivados da fragmentação da lignina, que afetam dentre outras funções, a integridade da membrana celular (Wang et al., 2017).

Para a maior eficiência no processo de obtenção de etanol de segunda geração (E2G) e/ou blocos químicos, é imprescindível o total aproveitamento tanto das pentoses como das hexoses e diferentes estratégias podem ser empregadas com o material oriundo dos pré-tratamentos.

Dentre as espécies de leveduras que fermentam naturalmente xilose, destaca-se a *Scheffersomyces stipitis* (Slininger et al., 2015), que foi isolada do intestino de insetos e a *Spathaspora passalidarum*, isolada de madeiras em apodrecimento (Nguyen et al., 2006).

O sucesso da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos depende do equilíbrio entre a formação de compostos inibitórios e a capacidade de adaptação e/ou destoxificação, *in vivo*, das células de levedura. Assim, é fundamental identificar os inibidores presentes no meio e avaliar o efeito dos compostos inibitórios na fisiologia das células, devendo, para tal, utilizar estratégias de controle da fermentação que não comprometam o rendimento do processo. Dentre as estratégias de fermentação destaca-se o processo de fermentação contínua, batelada alimentada com reciclo de células e emprego de reações com alta densidade celular (Liu et al., 2019).

Processos de destoxificação propõem transformar esses inibidores em compostos menos nocivos ao microrganismo ou reduzir suas concentrações para promover o aumento na eficiência de produção de etanol (Chandel et al., 2007). Contudo, trata-se de um processo que dependendo da estratégia empregada resulta na adição de uma etapa que pode ser dispendiosa, além da perda de açúcares fermentescíveis (Almeida et al., 2007).

Diversos métodos de tratamento (físico, químico e/ou biológico) do hidrolisado hemicelulósico têm sido propostos na literatura para reduzir a concentração dos compostos tóxicos a níveis não inibitórios ao processo fermentativo. No entanto, apesar de eficazes na remoção de ácido acético, aldeídos furânicos e compostos provenientes da degradação de lignina, estes métodos podem remover quantidades apreciáveis de açúcares do meio (~20%), ocasionando perdas ao processo produtivo (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a; Vallejos et al., 2016), além do aumento dos custos do processo global.

Processos de extração líquido-líquido são potencialmente atrativos para a remoção dos compostos inibitórios pois, além de promover uma recuperação relativamente fácil dos solventes utilizados, pode favorecer a obtenção e aplicação desses compostos em outros mercados, fazendo com que o processo se viabilize em termos de gastos energéticos inerentes a evaporação e recuperação dos extratantes e extraíveis (Parajo et al., 1997; Zautsen et al., 2009).

Apesar destes benefícios apresentados, poucos são os trabalhos de literatura que empregam o processo de extração líquido:líquido, utilizando solventes orgânicos, como método de destoxificação (Cadete et al., 2012; da Cunha-Pereira et al., 2011). Além disso, não há relatos na literatura de uma caracterização sistemática dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico, especialmente proveniente de bagaço de cana-de-açúcar.

Desta forma, espera-se, com este trabalho, contribuir com a literatura especializada no entendimento das características dos fenólicos potencialmente inibitórios frente aos microrganismos naturalmente consumidores de xilose no processo fermentativo, como é o caso das leveduras *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*, garantindo estratégias futuras de adaptação e ou adequação de processos e consequentemente redução de custos fixos atrelados a baixos rendimentos fermentativos.

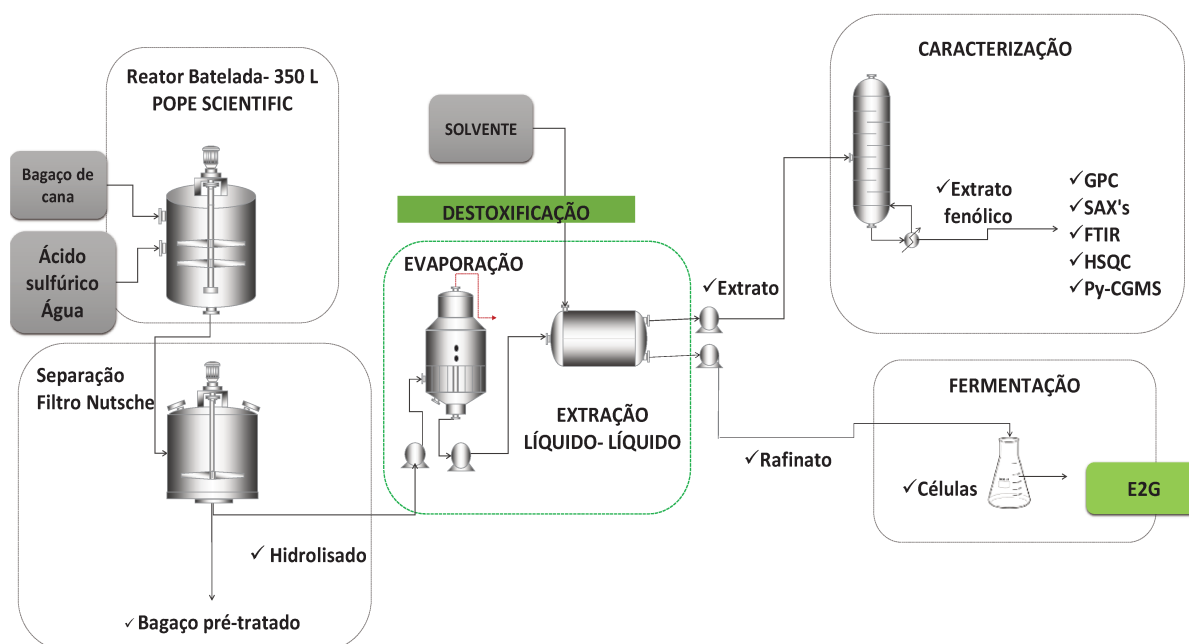
Além disso, processos de destoxificação que possibilitam a recuperação dos produtos gerados no hidrolisado hemicelulósico podem ser de interesse uma vez que a recuperação/reutilização destes produtos secundários pode acabar viabilizando uma rota produtiva do etanol a partir das pentoses.

## 1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar e avaliar a eficiência de remoção dos inibidores e a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos obtido após o processo de destoxificação empregando extração líquido: líquido com diferentes solventes.

Uma caracterização sistemática dos compostos fenólicos removidos, por cada solvente empregado no estudo, foi realizada, sendo os resultados utilizados para correlacionar as principais características destes compostos com os resultados fermentativos dos hidrolisados destoxificados. A **Figura 1** apresenta o fluxograma contendo a visão amplificada do presente trabalho de doutorado.

**Figura 1.** Fluxograma com os processos gerais desta Tese.



Fonte: Autor

### 1.1.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho englobaram:

- I. Pre-tratar e avaliar as características químicas e estruturais das frações obtidas após a etapa de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, em escala piloto;
- II. Avaliação do processo de destoxificação por extração líquido-líquido, utilizando o hidrolisado hemicelulósico obtido após pré-tratamento por ácido sulfúrico diluído, empregando-se quatorze distintos solventes;
- III. Avaliação da eficiência do processo de extração dos compostos inibitórios mediante a extração de ácido orgânicos, aldeídos furânicos e compostos fenólicos, além da preservação de carboidratos;
- IV. Avaliação da biocompatibilidade dos solventes empregados nos processos extrativos empregando-se as leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum*;
- V. Avaliação do efeito da destoxificação do meio fermentativo em termos de rendimento e produtividade volumétrica do etanol empregando as leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum* em shaker;
- VI. Caracterização dos compostos fenólicos, oriundos da fração orgânica resultante da etapa de extração líquido:líquido, quanto aos grupos funcionais, proporções guaiacila:siringila:*p*-hidroxifenila; massa molar; perfil de degradação térmico; tamanho

e formato de partículas, com o auxílio de técnicas físico-químicas e avaliação das correspondentes características estruturais e seus impactos na fermentabilidade dos hidrolisados;

- VII. Avaliação composicional do hidrolisado hemicelulósico antes e após destoxificação com MIBK por UPLC- MSMS;

## **1.2 Relevância Científica e Contribuições da Tese**

A tecnologia para produção de etanol de primeira geração, obtido majoritariamente por meio da fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou melão - subproduto da produção de açúcar - encontra-se bem consolidada no setor industrial brasileiro, enquanto, a produção de etanol de segunda geração (E2G), a partir do bagaço e/ou palha de cana-de-açúcar, ainda permanece como um desafio.

Os rendimentos e produtividades em etanol dos processos E2G ainda estão aquém do desejável para uma tecnologia com competitividade comercial (viabilidade econômica) (Milanez et al., 2015). Os inibidores oriundos do pré-tratamento representam os principais interferentes da etapa fermentativa, seja em tecnologias com separação de corrente (fração insolúvel rica em celulose e lignina e fração solúvel rica em pentoses) ou sem separação de correntes (“slurry”).

A problemática sobre a presença de inibidores no hidrolisado hemicelulósico é diagnosticada pela comunidade científica e bastante reportada na literatura, entretanto, nota-se uma escassez de resultados relevantes em termos de características estruturais e funcionais destes aromáticos, sendo um dos principais diferenciais desse trabalho.

A complexidade estrutural dos fenólicos presentes nos materiais lignocelulósicos torna necessária a utilização de distintas técnicas analíticas para em conjunto contribuir e direcionar algumas características estruturais dos compostos.

Adicionalmente, o estudo do processo de extração líquido-líquido é promissor frente aos processos convencionais de destoxificação, com altas remoções de inibidores sem perdas de carboidratos.

A elucidação estrutural de moléculas fenólicas, solubilizadas durante a etapa de pré-tratamento, tem se mostrado um desafio analítico, mas torna-se necessário para prover informações desde avaliações de eficiências de processos de destoxificação até para o direcionamento de procedimentos de engenharia metabólica de microrganismos e adaptação evolutiva.

Sendo assim, um conjunto de técnicas analíticas foram empregadas para elucidação dos compostos fenólicos, demandando desenvolvimento e/ou implementação de novos métodos e subsequente avaliação e correlação dos dados obtidos com o desempenho da fermentabilidade dos hidrolisados.

A implementação e desenvolvimento dos métodos analíticos, juntamente com a interface entre as distintas técnicas analíticas empregadas e reportadas nesse trabalho foram de grande contribuição para o grupo de pesquisa.

### **1.3 Contextualização do trabalho no cenário brasileiro de biocombustíveis**

A produção, transporte e uso de energia representam a fonte mais significativa de gases do efeito estufa. De acordo com o projeto de rotas de descarbonização (DDPP) um dos conceitos necessários para a redução das emissões é a transição de combustíveis fósseis para biocombustíveis. Esse fato deriva dos biocombustíveis serem renováveis, pois, seu carbono tem origem fotossintética, e por empregarem resíduos agroindustriais, tendo suas emissões de ciclo de vida da fase agrícola já atribuídas aos produtos principais (i.e., açúcar e etanol de primeira geração) (Hanaki and Portugal-Pereira, 2018). Também cabe destacar que os biocombustíveis estimulam o desenvolvimento sustentável nas dimensões sociais, ambientais e econômicas (IRENA, 2014).

Em torno de 50 países implementaram ou estão em processo de implementação de mandados que estimulem os biocombustíveis com alguns objetivos, dentre eles a redução de emissões de gases do efeito estufa.

Os diversos benefícios dos biocombustíveis são amplamente reconhecidos no Brasil e a nova Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) consolida esse reconhecimento (BRAZIL, 2015).

O RenovaBio (Política Nacional de biocombustíveis) surgiu após aprovação em congresso em 2017, como ferramenta para estimular a produção de biocombustíveis por meio de ativos financeiros, como créditos de descarbonização (CBIOS). Os CBIOS podem ter valor diferenciado de acordo com o processo de produção. Ou seja, quanto menor o balanço das emissões de gases do efeito estufa da empresa mais crédito de descarbonização (CGEE, 2017).

Para cumprir as metas de redução de emissões anunciadas pelo Brasil, sendo 37% abaixo dos níveis de 2005, até 2025, e posteriormente 43%, até 2030, para a economia como um todo -, medidas são previstas para: “aumentar a participação da bioenergia sustentável na matriz energética brasileira para aproximadamente 18% até 2030, ampliando o consumo de

biocombustíveis, aumentando a oferta de etanol, inclusive aumentando a participação de biocombustíveis avançados (segunda geração), e aumentando a participação de biodiesel na mistura ao diesel (CGEE, 2017).

O setor sucroenergético brasileiro tem longa tradição na produção de etanol obtido dos açúcares do caldo da cana-de-açúcar (etanol de primeira geração). Complementando o processo convencional da indústria de biocombustíveis, tecnologias inovadoras, como o etanol de segunda-geração estão se tornando maduras e disponíveis para a produção de etanol.

As rotas de produção de etanol de segunda geração obtêm o mesmo produto (etanol), porém utilizando como matérias primas biomassas estruturais (lignocelulósicas), expandindo a base de matérias primas para produção do biocombustível.

Rotas competitivas estão em desenvolvimento e avanços significativos foram realizados com o escalonamento para escalas comerciais. Cabe destacar que há duas plantas industriais pioneiras de etanol de segunda geração no Brasil. A Granbio (localizada em S. Miguel dos Campos- Alagoas, escala comercial) apresenta capacidade de 80 milhões L/ ano e utiliza bagaço e palha como insumos. O processo emprega alta temperatura e pressão para o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa, enzimas da Novozymes para a hidrólise e leveduras da holandesa DSM para a fermentação de ambos os açúcares (pentoses e hexoses)(Lorenzi and Andrade, 2019). Atualmente a planta não está operante, direcionando a biomassa para a unidade termoelétrica, com previsão de retorno das atividades de etanol celulósico para final de 2020 (NovaCana, 2020). A Raízen (localizada em Piracicaba -Sp, escala comercial) apresenta capacidade de produção de 40 milhões L/ ano e utiliza tecnologia desenvolvida pela Iogen. O processo emprega processo de pré-tratamento por explosão a vapor com bagaço como matéria-prima, hidrólise enzimática com enzimas da dinamarquesa Novozymes e fermentação de ambos os açúcares (pentose e hexoses) (Lorenzi and Andrade, 2019).

É notório que o comissionamento e início de operação dessas plantas industriais foi mais lento e difícil do que inicialmente projetado, sendo atribuído principalmente a dificuldades da etapa de pré-tratamento, impurezas minerais e dos resíduos agrícolas da cana-de-açúcar. Sendo motivos para que até o momento, nenhuma planta industrial tenha operado em sua capacidade total (Lorenzi and Andrade, 2019).

Nesse contexto, o trabalho de doutorado visa criar opção tecnológica para melhoria de desempenho da fermentação de pentoses para a produção de biocombustíveis e valorização dos fenólicos advindos da biomassa de cana-de-açúcar, no conceito de processo plataforma. Os esforços experimentais em escala laboratorial servem de aprendizado para dificuldades que poderão ser enfrentadas industrialmente. A rota de destoxificação estudada nesse trabalho,

poderia ser aplicada ao processo de etanol de segunda geração de pentoses em configurações industriais que utilizem outros tipos de biomassas como matéria prima.

Ademais, a partir dos resultados experimentais, é possível determinar (proposta de trabalhos posteriores) ótimos técnico-econômicos frente às variações na combinação de solventes, preço dos insumos (e.g solventes) e dos produtos como o etanol, ácidos orgânicos e os fenólicos. A rota estudada poderia ser acoplada a uma usina autônoma ou anexa, para integração energética (e.g com redução da demanda de vapor para recuperação do solvente).

Vale destacar também que o etanol de segunda-geração é uma tecnologia plataforma e uma vez consolidada industrialmente, poderiam ser integrados ao processo produtivo diversos co-produtos, a partir da celulose, hemicelulose e lignina, como bioquímicos, biomateriais, biocombustíveis líquidos, além de biogás, bioeletricidade a partir de outras correntes do processo industrial (Dias et al., 2013b, 2013a; Gursel et al., 2019).

#### **1.4 Organização do Trabalho**

O presente trabalho encontra-se dividido em capítulos, visando a melhor abordagem e discussão dos resultados obtidos.

O **Capítulo 2** apresenta a “Revisão Bibliográfica”, onde foram abordados a estrutura da biomassa vegetal, os tipos de pré-tratamentos comumente empregados no fracionamento da biomassa, enfatizando-se o pré-tratamento com ácido diluído.

Apresenta-se também os principais inibidores gerados durante o pré-tratamento com ácido diluído e os principais impactos causados no metabolismo das leveduras empregadas nos processos fermentativos. Enumera-se também as principais técnicas utilizadas no processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico e dos processos fermentativos.

No **Capítulo 3**, “Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico e da celulignina proveniente do pré-tratamento ácido”, apresenta-se a metodologia empregada no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, incluindo os métodos analíticos para determinação da composição química das frações sólidas e líquidas.

No **Capítulo 4**, “Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico” descreve-se a metodologia de extração líquido-líquido empregada utilizando-se 14 solventes distintos para remoção de potenciais inibidores do hidrolisado, como ácidos orgânicos, compostos fenólicos e aldeídos furânicos. Aponta-se também as eficiências de extração, coeficientes de partição e balanços de massa.



No **Capítulo 5** “Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados”, apresenta-se os ensaios de fermentação dos hidrolisados destoxificados pelo método de evaporação seguido de extração líquido: líquido empregando-se as leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum*.

No **Capítulo 6**, “Obtenção e caracterização dos compostos fenólicos”, apresenta-se a metodologia empregada na obtenção dos compostos fenólicos e as metodologias analíticas utilizadas para caracterização e identificação das principais estruturas presentes no meio, como espectroscopia de infravermelho, pirólise analítica, ressonância magnética nuclear de duas dimensões, pirólise analítica, raio-X de baixo ângulo e massa molar média.

No **Capítulo 7**, “Avaliação das características dos inibidores frente a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos” apresenta-se uma avaliação preliminar das possíveis correlações entre as características dos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico e o impacto na fermentabilidade.

Informações oriundas da caracterização dos hidrolisados, antes e após destoxificação pelo solvente selecionado MIBK, pelo método de UPLC-MSMS, também são apresentadas, visando informações complementares sobre a composição do meio empregado no processo fermentativo.

O **Capítulo 8**, “Conclusão e sugestões para trabalhos futuros” apresenta os resultados de maior relevância no trabalho e propostas de etapas futuras.

## CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica

### 2.1 Aproveitamento da biomassa lignocelulósica e desafios tecnológicos

As biorrefinarias a partir de materiais lignocelulósicos para conversão em combustíveis e bioprodutos, apesar de promissora, ainda apresenta desafios tecnológicos, como uma etapa de pré-tratamento eficiente com alto teor de sólidos e com a mínima geração de compostos de degradação; mínima geração de efluentes, coquetéis enzimáticos que proporcionem altas conversões em monossacarídeos a baixo custo e ainda uma etapa de fermentação que proporcione a completa utilização do substrato (pentoses e hexoses) são pré-requisitos para tornar economicamente viáveis processos a partir desses materiais (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

### 2.2 Materiais Lignocelulósicos e a parede celular vegetal

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de três componentes orgânicos referidos como celulose, hemiceluloses e lignina.

As matrizes das paredes celulares são estruturas complexas compostas de polissacarídeos, fenólicos monoméricos e poliméricos, além de proteínas (Hatfield et al., 2016).

A composição típica de algumas biomassas lignocelulósicas são apresentadas na

#### Tabela 1.

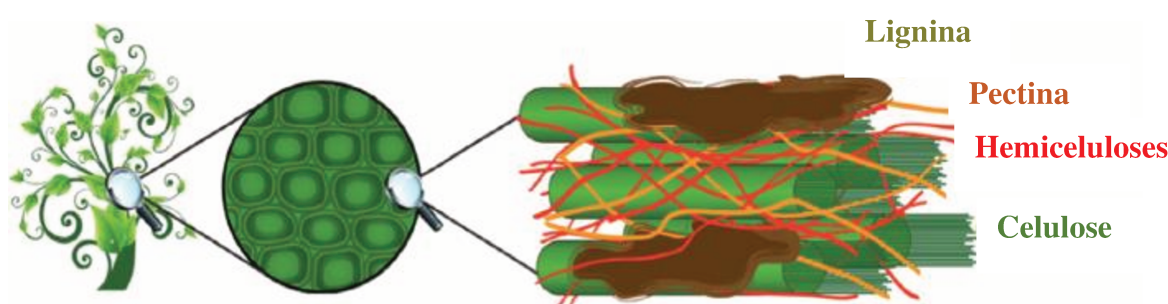
**Tabela 1.** Composição média de algumas biomassas lignocelulósicas.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemiceluloses	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Palha de trigo	30	48-50	15
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21

Fonte: Adaptado de (Santos et al., 2012).

Em geral a estrutura da parede celular vegetal apresenta as mesmas características estruturais, englobando uma cadeia celulósica embebida em uma matriz variada constituída de polissacarídeos (hemiceluloses e pectinas), lignina e proteínas (tanto estruturais quanto metabólicas) (**Figura 2**). As proporções e tipos específicos de polissacarídeos pode variar de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento e tipo de célula da parede vegetal (Hatfield et al., 2016).

**Figura 2.** Ilustrativo da distribuição dos principais componentes da parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de (Turumtay, 2015).

### 2.3 Celulose

A celulose apresenta-se como o principal constituinte da parede celular vegetal, sendo constituído como um homo polissacarídeo linear de formula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . É formado por unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose ligadas por meio de ligações do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , tendo a celobiose (dímero glicose-glicose) como a unidade repetitiva (Fengel and Wegener, 1989). A celulose apresenta estrutura linear e fibrosa devido à presença de grupos hidroxilas. Ligações de hidrogênio intramoleculares são responsáveis pela ligação entre as cadeias de celulose resultando na formação das fibras de celulose, enquanto as ligações intermoleculares são responsáveis pela formação da estrutura supramolecular, extremamente ordenadas na forma de regiões cristalinas (Fengel and Wegener, 1989).

### 2.4 Hemiceluloses

As hemiceluloses são constituídas de 80 a 200 de unidades residuais de açúcares, com pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramanose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (4-O-metil-D-glucurônico e D-galacturônico) (Pauly et al., 2013).

Na parede celular de gramíneas, como é o caso da cana-de-açúcar, o principal constituinte do polissacarídeo das hemiceluloses é a xilana (Fengel and Wegener, 1989).

A composição da xilana de gramíneas difere das xilanas de dicotiledônias na substituição com arabinofuranose e ligações do tipo éster com hidroxicinamatos (Carpita, 1996; Pauly et al., 2013; Rennie and Scheller, 2014).

A substituição da arabinofuranose na cadeia da  $\beta$ - (1,4) -xilose pode ser feita pela ligação  $\alpha$ - (1,2) ou  $\alpha$ - (1,3). Adicionalmente a cadeia de  $\beta$ -(1,4) a xilose pode ser substituída por unidade de  $\alpha$ -(1,2)-ácido glucurônico para formar glucuronoarabinoxilana (GAX) contendo unidade arabinosil e glucuronosil como substituinte na cadeia  $\beta$ -1,4 xilana (Ebringerová and Heinze, 2000).

As xilanas de gramíneas têm outra característica única em relação as xilanas de dicotiledônias: a adição de ácido ferúlico e em menor extensão ácido *p*-cumárico nos resíduos  $\alpha$ -(1,3) -arabinofuranose (Ishii, 1997).

## 2.5 Os ácidos *p*-hidroxicinâmicos

O ácido ferúlico (FA) e ácido *p*-cumárico (*p*Ca) são os ácidos *p*-hidroxicinâmicos encontrados em maior extensão na parede celular das gramíneas e apresentam capacidade de estabilizar ligações covalentes entre lignina e ou entre outros componentes poliméricos da parede celular vegetal, como as hemiceluloses.

A incorporação de ferulatos na matriz da parede celular das gramíneas resultou em uma maior reticulação da matriz em relação as espécies dicotiledônias, assim como a incorporação de *p*-cumaratos, como parte da estrutura da lignina, também resultou no aumento da complexidade da parede celular vegetal (Hatfield et al., 2016).

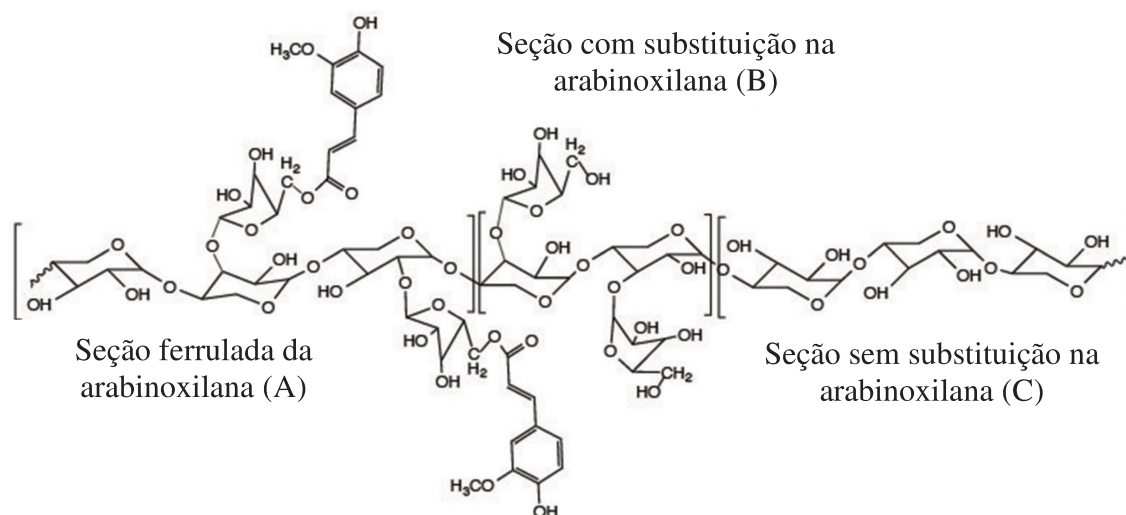
A ferulação na parede celular resultou nos polissacarídeos das hemiceluloses, principalmente arabinoxilanas, covalentemente ligados entre si e com a lignina. Evidências sugerem fortemente que os ferulatos não são responsáveis somente pela ligação entre as arabinoxilanas, mas também apresentam um fator crucial na lignificação da parede celular (Hatfield et al., 2016; Ishii, 1997).

A presença de outros fenólicos na formação da parede celular, como por exemplo os *p*-cumaratos (os quais apresentam-se em concentrações superiores aos ferulatos), permanecem desconhecidos. É possível que os *p*-cumaratos auxiliem na formação da lignina, principalmente nas espécies ricas na unidade siringil (Ralph et al., 1995)

O ácido *p*-cumárico é conhecido como responsável pela ligação éster entre a posição  $\gamma$  das cadeias laterais das unidades siringilas da lignina, enquanto o ácido ferúlico se liga tanto aos polissacarídeos pela ligação do tipo éster, como a unidades de lignina via mecanismos de acoplamento radicalar, levando a inúmeros tipos de ligação éter e carbono-carbono (Lam et al., 1994).

O ácido ferúlico e *p*Ca são ligados via ligações éster no carbono C-5 dos resíduos de arabinosurosil, conforme apresentado na **Figura 3**.

**Figura 3.** Modelo molecular de uma xilana de gramínea, incluindo (A) - regiões das arabinoxilanas substituída por éster de ácido ferúlico ligado ao 5-OH da arabinofuranose, (B)  $\beta$ -1,4-xilose substituída com  $\alpha$ -1,2 e/ou  $\alpha$ -1,3-arabinofuranose da arabinoxilana, (C)  $\beta$ -1,4-xilose sem substituição.



Fonte: Adaptado de (Hatfield et al., 2016).

Nem todos os resíduos de arabinosil contêm unidades ferulatos e a exata localização ao decorrer da cadeia de xilana ainda permanece desconhecida. Por outro lado, é amplamente aceito que as paredes celulares de gramíneas são unicamente interligadas por ferulatos para formar diferulatos e em alguma extensão ciclo dímeros de *p*-cumaratos (Ford and Hartley, 1990; Hatfield et al., 1999; Quideau and Ralph, 1997). Essas ligações se estendem para acoplamento com frações de carboidratos até a lignina.

As quantidades *p*Ca na lignina e a atuação funcional na parede celular permanece não totalmente elucidada.

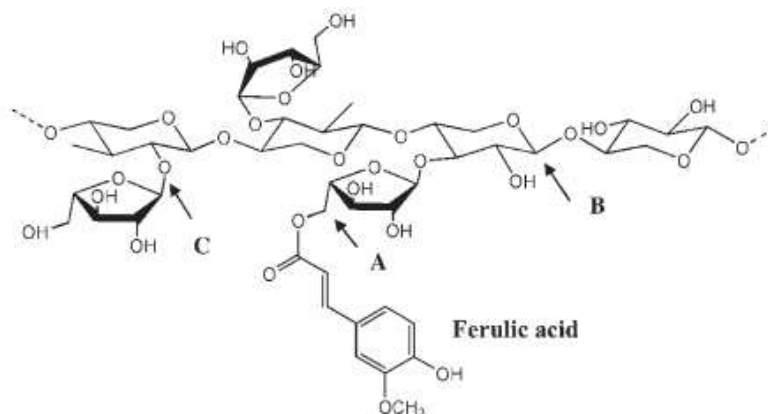
Mueller-Harvey et al., (1986) reportam que as unidades *p*Ca estão ligadas aos carboidratos das hemiceluloses assim como o ácido ferúlico, mas em um nível muito menor de 1:15, é ligado ao FA.

Um dos objetivos da presença de *p*Ca na parede celular de gramíneas é o mecanismo de transferência de radicais para auxiliar a formação dos radicais monoméricos da lignina, especialmente o álcool sinapílico (Hatfield et al., 2008; Takahama and Oniki, 1997).

A incorporação do *p*Ca na matriz celular por meio de acoplamento intracelular do *p*Ca ao álcool sinapílico ou coniferílico ocorre via esterificação (Hatfield et al., 2008).

As unidades *p*-hidroxinamatos (ferulatos e *p*-cumaratos) também ocorrem em ligninas de gramíneas, com *p*-cumaratos acilando o grupo  $\gamma$ -OH da cadeia lateral da lignina, e ferulatos e diferulatos acilando a parede celular dos polissacarídeos e participando das reações de acoplamento polissacarídeos- polissacarídeos e polissacarídeos-lignina, formando ligações do tipo éter similares as existentes entre as unidades da lignina (**Figura 4**) (Ralph and Landucci, 2010).

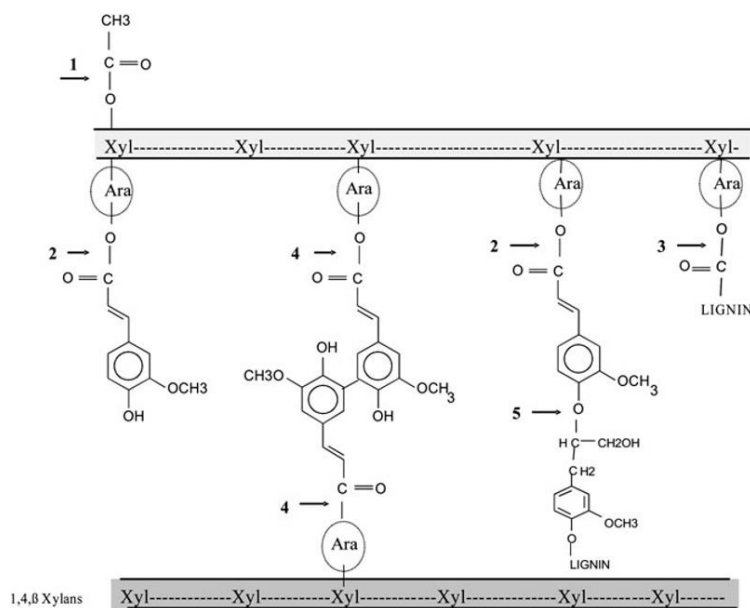
**Figura 4.** Estrutura do ácido ferúlico esterificado a arabinoxilana (principal componente das hemiceluloses em monocotiledôneas), onde (A) representa o ácido ferúlico ligado a arabinose da cadeia da arabinoxilana pela ligação O-5; (B) ligação  $\beta$ -1,4- da cadeia xilana e (C) ligação  $\alpha$ -1,2- ligada a L-arabinose.



Fonte: Adaptado de (Buanafina, 2009).

O ácido ferúlico esterificado aos polissacarídeos da parede celular tem a habilidade de formar dímeros com ligações da cadeia de arabinoxilanas, conforme apresentado na **Figura 5**.

**Figura 5.** Estrutura simplificada da ligação entre o ácido ferúlico (FA) e a arabinoxilana (AX) na parede celular de gramíneas. Onde a ligação  $\beta$ -1,4 da cadeia da xilana é representada pelas linhas pontilhadas e as cadeias laterais, como a arabinose são representas com círculos. As ligações éster e éter são identificadas com setas conforme numeração: (1) grupo acetil; (2) ligação éster de FA para AX (3) ligação entre arabinoxilana e lignina (4) ligação éster 5–5 entre os dímeros de FA acoplados as cadeias AX (5) ligação éter entre FA e a lignina.



Fonte: Adaptado de (Buanafina, 2009).

A identificação dos ácidos fenólicos na parede celular vegetal iniciou a décadas atrás, onde inicialmente acreditava-se que apenas a ligação 5-5 ferulato era formada na matriz celular (Markwalder and Neukom, 1976).

Entretanto, trabalhos subsequentes demonstraram que inúmeros tipos de dímeros de ferulato podem ser formados por meio de reações de acoplamento mediado por radicais livres (Grabber et al., 2000; Ralph et al., 1994), bem como trímeros e tetrâmeros (Bunzel et al., 2005).

Ferulatos podem se ligar a lignina pelo mesmo tipo de ligação mediada por radicais livres, para formar complexos carboidrato-lignina ligados covalentemente e unidos nas paredes celulares das gramíneas. Ressalta-se que a maioria dos ferulatos é reticulado não apenas as frações de carboidratos, mas também forma ligações covalentes nas crescentes cadeias poliméricas da lignina durante o processo de lignificação (Bunzel et al., 2005; Quideau and Ralph, 1997).

Evidências estruturais sugerem que os ferulatos pode atuar como sítios de nucleação para a formação da lignina (Hatfield et al., 1998; Ralph et al., 1995).

Dois mecanismos têm sido propostos na literatura para a formação das ligações do ácido ferúlico entre as hemiceluloses e a lignina: (1) acoplamento oxidativo do fenol mediado por peróxido de hidrogênio e peroxidases (Fry et al., 2000) e dimerização e foto isomerismo por luz UV (Ford and Hartley, 1990).

Lam et al., (2001) reportaram evidências entre o efeito negativo da pontes éster-éter entre ácido ferúlico e lignina e arabinosilanas e a digestibilidade da parede celular vegetal. Os resultados também suportam a conclusão de que a lignina por si só não é parâmetro de maior influência na digestibilidade.

## 2.6 Lignina

A lignina é uma das macromoléculas mais abundantes na estrutura vegetal depois da celulose e foi inicialmente descoberto por Anselme Payen em 1839, quando a descreveu pela primeira vez como um material incrustante da madeira (Sarkanen and Ludwig, 1971).

É exclusivo da composição química de gimnospermas e angiospermas, tendo o seu conteúdo variando de 20-40% para madeiras e de 15-20% para gramíneas. A denominação lignina, reporta o nome de uma classe de substâncias, visto que a sua heterogeneidade é manifestada em diferentes espécies, tecidos vegetais e fases de crescimentos (Fengel and Wegener, 1989)

A lignina é localizada no complexo da lamela média, com aproximadamente 50% de percentual em massa, seguido de 20 % na segunda camada da parede celular. Entretanto, como o volume da lamela média é significativamente menor que da segunda parede celular, a maior parcela da lignina ainda é representada pela segunda camada (Lv et al., 2010).

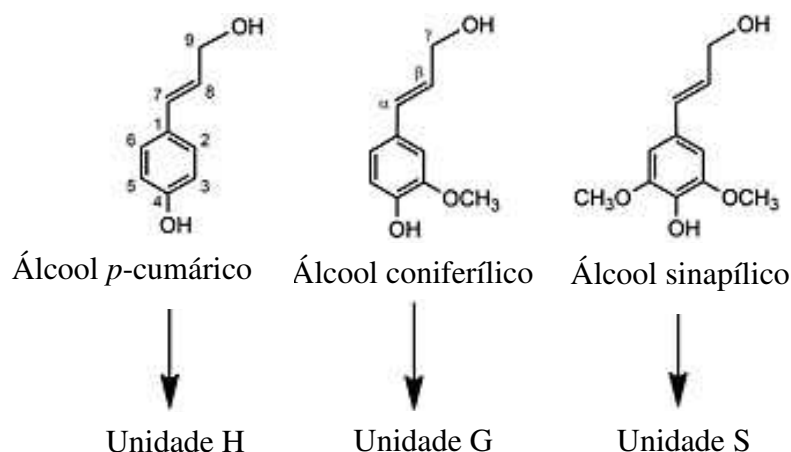
Essa macromolécula hidrofóbica promove a resistência mecânica as paredes celulares vegetais, regula o transporte de água e atua como uma importante barreira de defesa da estrutura vegetal contra a degradação microbiana e enzimática (Jorgensen et al., 2007).

Propõe-se que a sua estrutura seja composta por monômeros fenilpropanóides conhecidos como lignóis. Apresenta vários tipos de subestruturas que possuem o mesmo esqueleto fenilpropanóide, mas que diferem no grau de substituição oxigenado do anel aromático. O monolignol H consiste na unidade *p*-hidroxifenila que apresenta um grupo hidroxil sem grau de metoxilação do anel, o monolignol G consiste na unidade guaiacila que contém um hidroxil e um grupo metoxil, enquanto o monolignol S consiste na unidade siringila que contém um grupo hidroxil e dois grupos metoxila (Doherty et al., 2011; Fengel and Wegener, 1989; Rinaldi et al., 2016). As unidades denominadas H, G e S são provenientes da



polimerização oxidativa do álcool sinapílico, coniferílico e *p*-cumárico respectivamente, representados na **Figura 6**.

**Figura 6.** Álcoois precursores e respectivas unidades constitucionais da lignina.



Fonte: Adaptado de (Fengel and Wegener, 1989).

As gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, também apresentam unidades de ácidos *p*-hidroxicinâmicos (del Río et al., 2015), conforme descrito anteriormente.

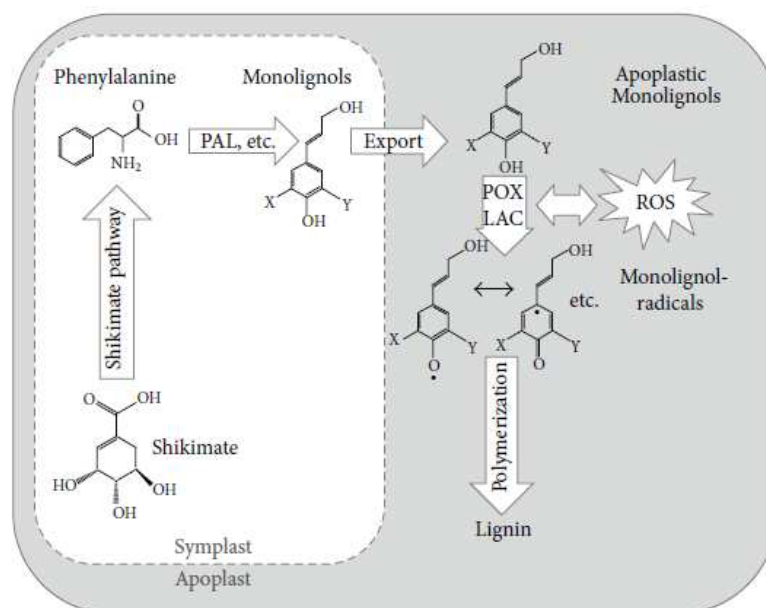
### 2.6.1 Origem e estrutura da lignina

A lignina é uma macromolécula fenólica com uma estrutura tridimensional de alta complexidade, sintetizada nas plantas pela via da pentose fosfato chiquimato e rotas dos fenilpropanóides (Vanholme et al., 2013).

Ocorre predominantemente no xilema da maioria das plantas, sendo o principal componente da parede células dos traqueídeos, vasos e fibras, além de contribuir para a força de compressão do caule e pelo sistema de condução de água (Donaldson, 2001).

A sua biossíntese ocorre no citoplasma (retículo de Golgi ou endoplasmático) com a síntese dos monômeros precursores (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumárico), os quais são liberados na parede celular pelas vesículas como monolignóis ou monolignóis glicosídeos (Frei, 2013). Enzimas localizadas na parede celular durante o processo de lignificação, envolvendo vários tipos de peroxidases e oxidases, auxiliam na polimerização dos monolignóis (Deighton et al., 1999). A **Figura 7** apresenta um esquema simplificado da biossíntese da lignina em plantas vasculares.

**Figura 7.** Esquema simplificado da biossíntese da lignina em plantas vasculares PAL: fenilalanina amônia liase, POX: peroxidases, LAC: lacases, e ROS: espécies oxigênio ativas.



Fonte: (Frei, 2013).

A lignificação em dicotiledônias é reportada como inicialmente observada nos vasos da parede, bordas das células e no meio da lamela, com a formação das unidades guaiacila da lignina, seguido em estágios mais avançados pela lignificação das fibras da parede com uma mistura de unidades guaiacil e siringil. A deposição das unidades *p*-hidroxifenila ocorre na lamela média dos vasos e fibras da parede vegetal durante os primeiros estágios da formação da parede secundária (Fukushima and Terashima, 1991).

Um padrão similar de lignificação é encontrado em monocotiledônias, com a formação adicional de ácidos fenólicos entre todos os tipos de células vegetais. O ácido ferúlico é depositado na lamela media e nas extremidades das células durante os primeiros estágios da lignificação, enquanto o ácido *p*-cumárico é depositado nas paredes secundarias (He and Terashima, 1990).

Os sites específicos, enzimas e mecanismos envolvidos na iniciação do processo de lignificação são extensivamente abordados na literatura, mas permanecem sem total elucidação devido à alta complexidade desse mecanismo (Donaldson, 2001; Mottiar et al., 2020).

Donaldson, (1994), reportou a influência da matriz de carboidratos no processo de lignificação, apontando que estes têm influência mecânica na expansão da lignina na lamela média durante a lignificação.

Atalla and Agarwal, (1985), por meio de estudo utilizando Raman mostraram que os anéis aromáticos da lignina são usualmente orientados de acordo com o plano da parede celular vegetal, possivelmente atrelado ao resultado de influências químicas ou mecânicas dos carboidratos constituintes da parede celular.

Paralelamente a lignina é formada por meio de ligações químicas com as hemiceluloses, o qual atua como uma ponte ou adesivo, conferindo aderência entre essa matriz e as microfibrilas de celulose (Fengel and Wegener, 1989).

Além das inerentes dificuldades relacionadas com a elucidação do real mecanismo e sítios da biossíntese da lignina, tem-se o desafio científico da proposição da estrutura nativa dessa macromolécula fenólica, devido principalmente ao fato dos processos de deslignificação e/ou extração incluírem rupturas nas ligações covalentes da lignina original, com o emprego de distintos métodos e condições para as etapas de separação.

Ademais, distintas fontes vegetais ou até ligninas isoladas da mesma fonte, mas utilizando outros processos de extração, podem apresentar diferentes categorias de ligações e grupos funcionais, resultante da complicada estrutura da lignina.

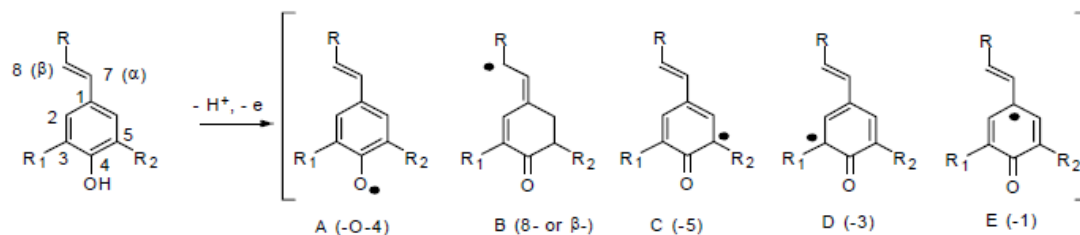
Entretanto, um modelo estrutural é geralmente apresentado para a lignina, no qual descreve-se uma estrutura hipotética com base na média de inúmeros resultados.

Sendo assim, a lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional, com as unidades constituintes H, G e S ligadas covalentemente, formando ligações éter, éster e carbono-carbono, que se repetem pela molécula aparentemente de maneira randômica, conferindo extrema complexidade a essa estrutura (Sarkanen and Ludwig, 1971).

Em 1939, Erdtmann propôs que a lignina seria formada reação de acoplamento do radical do álcool coniferílico proveniente de uma desidrogenação enzimática (Erdtmann, 1939).

Freudenberg, (1965), confirmou essa hipótese e demonstrou que um sistema lacase/O<sub>2</sub> ou peroxidase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de abstrair um elétron do grupo hidroxil fenólico do álcool coniferílico gerando a formação de um radical fenóxi. O radical fenóxi possui cinco formas mesoméricas de estabilização por ressonância, conforme reportado na **Figura 8**.

**Figura 8.** Formação do radical e estrutura de ressonância para estabilização.

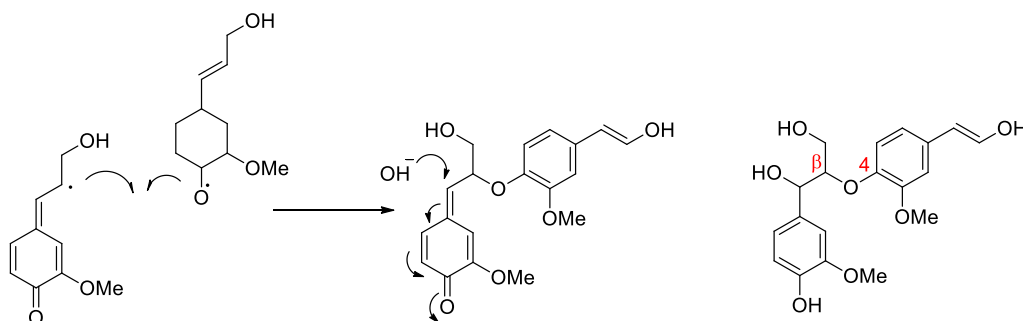


Fonte: (Morreel et al., 2010).

Sendo assim, tem-se inúmeras possibilidades de ligações inter monoméricas para os sítios de acoplamento nas posições 1-, 3-, 0-4-, 5- e 8- (ou  $\beta$ ).

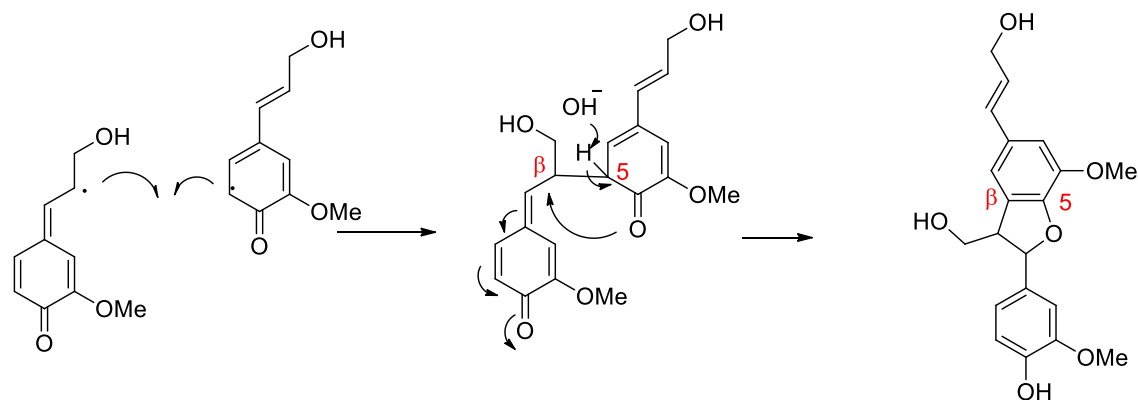
Como exemplo, se o acoplamento na posição 8 ou  $\beta$ , for favorecida, o acoplamento com outro radical monolignol resulta, após rearomatização, em uma mistura de dehidrodímeros com ligações  $\beta$ -O-4',  $\beta$ -5' e  $\beta$ - $\beta'$  (**Figuras 9, 10 e 11**).

**Figura 9.** Exemplo de formação da ligação  $\beta$ -O-4.



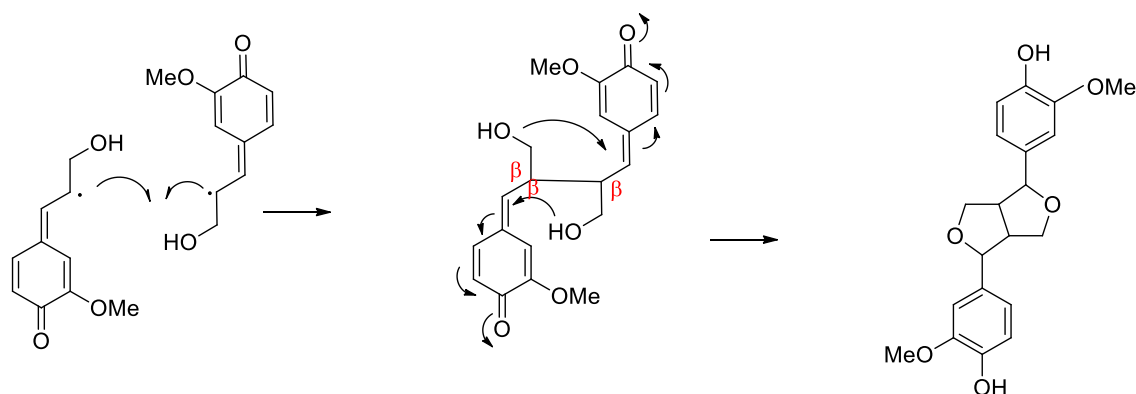
Fonte: Autor

**Figura 10.** Exemplo de formação da ligação  $\beta$ -5.



Fonte: Autor

**Figura 11.** Exemplo de formação da ligação  $\beta$ - $\beta$ .



Fonte: Autor

Essas ligações são designadas de acordo com o centro atômico dos radicais que procedem para o acoplamento radicalar durante a etapa final da biossíntese da lignina (Chen and Sarkanen, 2010) e a probabilidade da formação das ligações depende de inúmeros fatores estéricos, eletrônicos e de solvatação (Sarkanen and Ludwig, 1971).

A literatura reporta a influência de inúmeros fatores na formação da estrutura da lignina, incluindo fornecimento relativo de monolignóis, pH, a presença de polissacarídeos, concentração de peróxido de hidrogênio e elementos na matriz celular em geral (Grabber et al., 2003; Vanholme et al., 2008).

Simulações computacionais do processo de polimerização da lignina podem auxiliar na elucidação e predição da estrutura da lignina com base em parâmetros cinéticos, probabilidades dos acoplamentos e taxas de síntese dos monolignóis (Parijs et al., 2010).

As subestruturas equivalentes na estrutura presumida para esse biopolímero consistem em alquil-aryl éteres, fenilcumaranas, resinols, dibenzodioxinas, bifenils, tetrahidrofuranol-espiro-ciclohexadionas e diaril éteres (Heitner et al., 2010). Em torno de 2 a 3/4 das unidades fenilpropano das ligninas são ligadas a unidades adjacentes por ligações do tipo éter, ocorrendo apenas uma pequena parcela como hidroxil fenólico livre.

O acoplamento de dois monômeros resulta na formação de um dímero, o qual pode ser posteriormente polimerizado pela adição de um novo monômero para formar um trímero, ou com um dímero para formar um tetrâmero (Holtman, 2003).

Reporta-se que durante a extração da lignina, a ligação  $\beta$ -O-4' seja a mais comum e preferencialmente quebrada enquanto outras ligações entre dilignóis seja quimicamente mais resistente.

Adicionalmente, acredita-se que a relativa posição dos monômeros ditam a relativa abundância das ligações interunidades. Por exemplo ligninas ricas em unidades G apresentam ligações  $\beta$ -5',  $\beta$ - $\beta'$  e  $\beta$ -O-4', enquanto lignina enriquecidas em unidades S são menos reticuladas e de mais fácil extração. Por esse motivo a composição da lignina é classicamente descrita pela abundância relativa e razão das unidades S, G e H (Boerjan et al., 2003; Harris and DeBolt, 2010).

Em ligninas de madeira mole a unidade G é dominante, em madeiras duras tem-se normalmente uma mistura de lignóis S e G, com maior abundância de S, enquanto o lignol H é predominantemente encontrado em lignina de gramíneas (Wang et al., 2009).

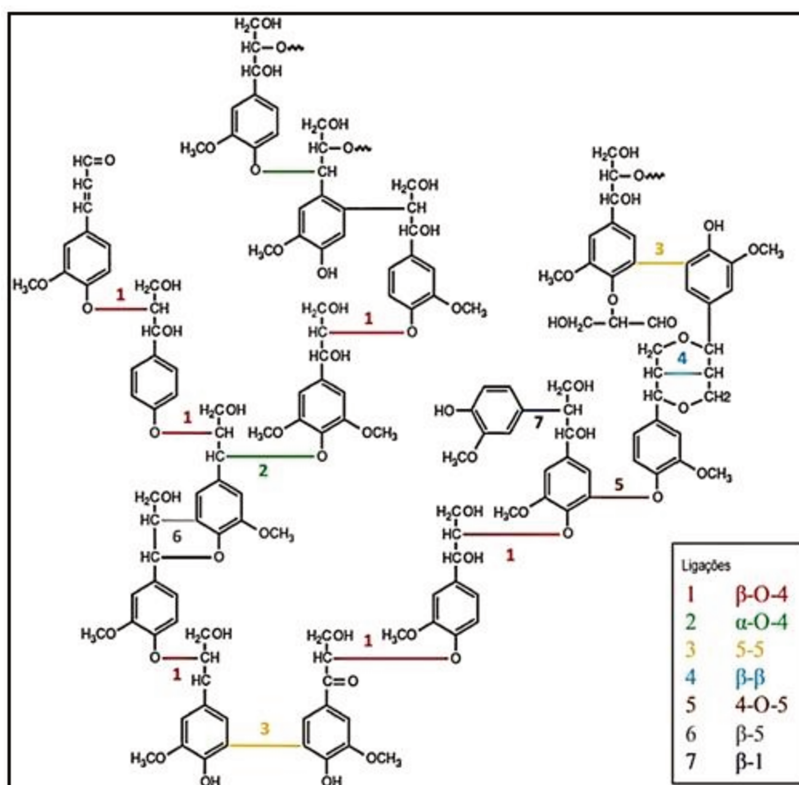
Ligninas de madeira dura incluem vastas quantias de unidades siringil, enquanto as unidades estruturais de lignina proveniente de madeira mole são predominantemente guaiacil com um pequeno percentual de unidades *p*-hidroxifenila (H).

De acordo com Parijs et al., (2010) o aumento de unidade S resulta em um maior percentual de ligações  $\beta$ -O-4 e um maior rendimento monomérico destes fragmentos após degradação.

Ligações  $\beta$ -O-4 são preferencialmente formadas a partir de unidades S, mesmo quando maior probabilidade da formação de todos os tipos de ligações são igualmente prováveis, razão essa atribuída ao fato da unidade S apresentar uma posição blindada a menos em relação a unidade G (C5 é metoxilada).

As unidades constitucionais da lignina apresentam ligadas entre si por meio de distintos tipos de ligações como  $\beta$ -O-4',  $\beta$ -5',  $\beta$ - $\beta'$ , 5-5' e 5-O-4' (**Figura 12**) (del Ríó et al., 2015; Rinaldi et al., 2016).

**Figura 12.** Estrutura da lignina e suas principais ligações interunidades.



Fonte: Adaptado de (Crestini et al., 2011; Windeisen and Wegener, 2012).

## 2.7 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Em geral, as biomassas lignocelulósicas apresentam uma estrutura complexa e compacta, sendo necessário submetê-la a uma etapa prévia de pré-tratamento físico e/ou químico antes do seu aproveitamento para produção de insumos com interesse industrial, como o E2G (Brodeur et al., 2011).

O pré-tratamento é visto como uma das etapas mais caras do processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e por isso, apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (Rabelo et al., 2014).

Distintas tecnologias de fracionamento dos materiais lignocelulósicos são reportadas na literatura, visando a separação dos três principais macros componentes: celulose, hemiceluloses e lignina.

A **Tabela 2** apresenta um resumo dos principais processos de pré-tratamentos reportados na literatura utilizando bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima.

**Tabela 2.** Condições e características de alguns pré-tratamentos empregados no fracionamento de biomassa lignocelulósica.

<b>Métodos de pré-tratamento</b>	<b>Principal efeito</b>	<b>Aditivos utilizados</b>	<b>Formação de subprodutos</b>
Ácido	Hidrólise das hemiceluloses à monossacarídeos	Catalisadores como H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , SO <sub>2</sub> , HCl, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácidos carboxílicos alifáticos, furanos, fenólicos
Hidrotérmico	Solubilização parcial das hemiceluloses	Sem aditivos	Ácido acético, aldeídos furânicos
Alcalino	Remoção da lignina e solubilização das hemiceluloses e celulose (minoritária)	NaOH, Ca(OH) <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>	Ácido acético, ácidos hidroxilados e dicarboxilados, fenólicos
Oxidativos	Remoção da lignina e parte das hemiceluloses	Peróxido, O <sub>2</sub> e O <sub>3</sub>	Ácidos aldônicos, furóicos, fenólicos e alifáticos
Líquidos iônicos	Dissolução específica de acordo com o reagente	Líquidos iônicos	Altamente dependente do solvente e das condições operacionais

Fonte: (Kumar and Sharma, 2017).

### **2.7.1 Pré-tratamento com ácido diluído, formação dos compostos inibitórios e seus efeitos nos processos fermentativos**

O pré-tratamento catalisado por ácidos tem sido considerado um dos mais efetivos, além de economicamente viáveis (Rezende et al., 2011) e resulta predominantemente na despolimerização das hemiceluloses em rendimentos de xilose, seguido de arabinose e glicose, além de potenciais inibidores para o crescimento microbiano (Chandel et al., 2010, 2009; Gírio et al., 2010).

De acordo com a aplicação final do hidrolisados do material pré-tratado, dois tipos de pré-tratamentos ácidos podem ser desenvolvidos: o primeiro envolvendo altas temperaturas com baixos tempos de residência (acima de 180°C entre a 1–5 min) e o segundo com baixas temperaturas com períodos de residência mais longos (próximos a 120°C entre 30- 90 min) (Kumar and Sharma, 2017).



Diversos ácidos, como o clorídrico, fosfórico e nítrico podem ser empregados nesse pré-tratamento, entretanto o ácido sulfúrico ainda se encontra como o mais efetivo para fragmentação de uma amplitude de materiais lignocelulósicos como madeira mole, madeira dura e gramíneas (Wei et al., 2012), além de ser comumente empregado no setor industrial (Alvira et al., 2010).

O princípio de atuação do pré-tratamento com ácido diluído é enfraquecer as ligações glicosídicas das hemiceluloses, as ligações entre hemiceluloses e lignina, e da lignina que acarretam na dissolução dos açúcares (preferencialmente pentoses) e no aumento da porosidade da parede celular vegetal (Jiang et al., 2013).

O pré-tratamento hidrotérmico ou auto catalítico também promove parcial remoção das hemiceluloses, entretanto a maior parcela da xilana solubilizada encontra-se na forma oligomérica, requerendo uma etapa adicional de pós-hidrólise para o aproveitamento da xilose em processos fermentativos, por exemplo.

Hendriks and Zeeman, (2009), reportaram a solubilização de somente 12,6 % (m/m) de hemiceluloses no pré-tratamento sem a presença de ácido sulfúrico e realizada a 135°C, 20 min, confirmando a importância da adição de ácido quando se almeja alta solubilização de hemiceluloses em temperaturas moderadas.

Sritrakul et al., (2017), reportaram em pré-tratamento de parênquima de bagaço de cana, a solubilização de 53,7 g açúcares/ 100 g bagaço base seca empregando 1–2 % v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 90 min a 121°C.

Canilha et al., (2011), no estudo do pré-tratamento ácido com bagaço de cana, variaram o tempo de residência de 5 a 35 min, a temperatura de 112,5°C a 157,5°C e a concentração de ácido sulfúrico de 0,0% a 3,0% (m/v), mantendo a carga de 15% (m/m) de sólidos constante.

Soares et al., (2017), também avaliaram os parâmetros operacionais no pré-tratamento ácido do bagaço de cana variando o percentual de sólidos entre 10–30% (massa bagaço/ volume de solução ácida), concentração de ácido sulfúrico de 0,5– 2,5% (em relação à material base seca), tempo de residência (5–25 min) e temperatura (135–195°C). Os resultados indicaram que a condição que resultou nas maiores quantidades de glicose após hidrólise enzimática (0,35 g glicose/g material pré-tratado), com quantidades mínimas de produtos de degradação foram 20 % de teor de sólidos, 15 min, 1,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 170°C.

Santoro et al., (2015), reportaram a máxima recuperação de xilose após pré-tratamento ácido de bagaço de cana em escala piloto (350 L) na condição operacional de 140°C, 15 min e 0,5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, resultando na solubilização de 85,5 ± 0,8% das hemiceluloses,

sendo preferencialmente encontrada na forma monomérica. A conversão enzimática com enzimas comerciais resultou em rendimento de  $55,3 \pm 1,3\%$ .

O pré-tratamento ácido apesar de prover um material pré-tratado com aumento de acessibilidade enzimática e hidrolisado contendo pentoses (monoméricas ou oligoméricas), apresenta algumas desvantagens como o custo para a construção de equipamentos com ligas especiais com resistência a corrosão ácida e formação de inibidores (Jönsson et al., 2016).

Esses inibidores podem ser divididos em três grandes grupos: ácidos orgânicos; derivados furânicos e compostos fenólicos derivados da lignina (Chandel et al., 2010; Kim, 2018; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000b).

A toxicidade dos compostos inibitórios está intimamente atrelada a sua concentração no meio, o tipo de organismo fermentativo, o modo de cultivo e as condições de cultivo (pH, concentração celular, oxigênio dissolvido e temperatura). Os impactos metabólicos da presença de inibidores no meio fermentativo podem ocasionar desde a redução da taxa de crescimento do microrganismo, afetando a sua taxa de assimilação do açúcar, até afetar a fisiologia celular pelo distúrbio da função da membrana biológica, resultando em decréscimo da viabilidade, rendimento e produtividade (Chandel et al., 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000b).

A formação de componentes de degradação da parede celular vegetal no hidrolisado depende de múltiplos fatores incluindo a natureza do material lignocelulósico, composição da parede celular, condições termoquímicas e tempo de reação (Caetano and Madeleno, 2011; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a). A **Tabela 3** apresenta composição de hidrolisados, em termos de ácidos orgânicos, aldeídos furânicos e compostos fenólicos, oriundos de pré-tratamentos ácidos de bagaço de cana-de-açúcar reportados na literatura.

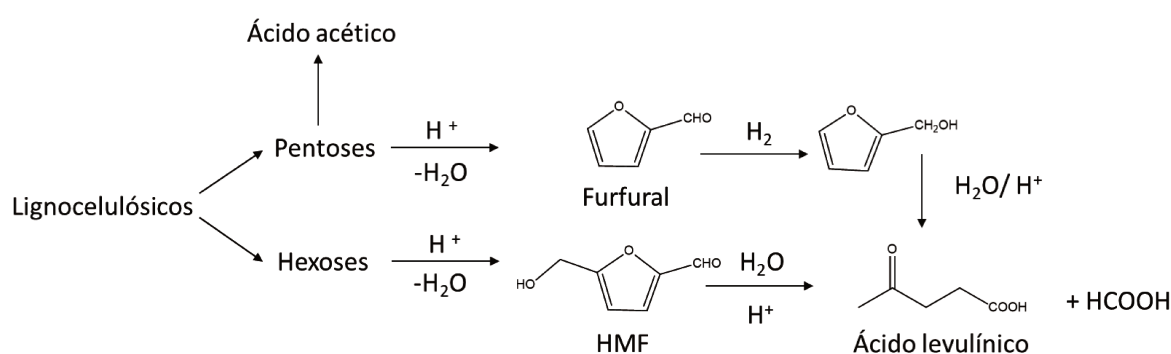
**Tabela 3.** Concentração de ácidos alifáticos, compostos fenólicos e aldeídos furânicos em hidrolisados oriundos de pré-tratamentos ácidos de bagaço de cana-de-açúcar (- concentrações não reportadas pelos autores).

Reator	Condições	Ácido acético (g/L)	Ácido glucurônico (g/L)	Ácido fórmico (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Fenólicos (g/L)	Referência
<b>Reator rotativo 20-L</b>	10% sólidos, 1% (m/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 1 % (m/v) ácido acético 190° C, 10 min.	2,21	0,21	0,74	0,05	0,01	-	(Rocha et al., 2011)
<b>Autoclave</b>	10 % (m/m) sólidos, 1,25% (m/m) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 121°C, 2 h	4,0	-	-	1,4	-	-	(Cheng et al., 2008)
<b>Reator 250 mL</b>	100 g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /g biomassa. 1:10 razão sólido/líquido, 121°C, 20 min	0,85	-	-	0,15	0,015	2,57	(Dussán et al., 2016)
<b>Reator 25 L</b>	100 mg H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /g biomassa, 130 °C, 20 min	-	-	-	2,0	0,08	-	(Rodrigues et al., 2010)
<b>Autoclave</b>	1:15 relação sólido-líquido, 121 °C, 60 min 1% v/v H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,30	-	-	0,22	-	-	(Fangkum and Reungsang, 2011)
<b>Autoclave</b>	1:15 relação sólido-líquido, 121°C, 60 min 5% v/v H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,84	-	-	0,34	-	-	(Fangkum and Reungsang, 2011)
<b>Reator de 200 mL</b>	1,75:10 (m/v) relação sólido-líquido, 2% (m/v) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 150 °C, 30 min	2,7	0,8	-	0,3	0,04	2,1	(Canilha et al., 2010)
<b>Não reportado</b>	1:10 relação sólido- líquido 0,5 % m/v HCl, 140°C, 30 min.	3,50	-	-	-	0,94	0,65	(Chandel et al., 2007)
<b>Não reportado</b>	1:10 relação sólido- líquido 1,5 % m/v HCl, 140°C, 30 min.	4,19	-	-	-	1,36	1,58	(Chandel et al., 2007)
<b>Não reportado</b>	1:10 relação sólido- líquido 3,5 % m/v HCl, 140°C, 30 min.	6,69	-	-	-	0,34	-	(Chandel et al., 2007)

### 2.7.1.1 Ácidos Orgânicos

Os hidrolisados hemicelulósicos apresentam em sua composição certa quantidade de ácidos alifáticos, resultante da hidrólise dos grupos acetilas das hemiceluloses, como é o caso do ácido acético, ou provenientes da catálise ácida e degradação termoquímica dos carboidratos, como é o caso dos ácidos fórmico e levulínico (**Figura 13**) (Climent et al., 2014; Fengel and Wegener, 1989; Jönsson et al., 2013).

**Figura 13.** Representação da formação dos produtos de degradação a partir de pentoses e hexoses dos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de (Climent et al., 2014).

Em geral, os ácidos orgânicos difundem passivamente pela membrana celular na forma não dissociada cuja toxicidade está relacionada a acidificação do citoplasma e decréscimo do pH do citosol, contribuindo para a desorganização da membrana devido a hidrofobicidade causando alterações no acúmulo de ânions intracelulares (Almeida et al., 2007; Mira et al., 2010; Palmqvist et al., 1999; Piper et al., 2001; Russell, 1992; Verduyn, 1991).

Esse decréscimo de pH é compensado pela ATPase da membrana plasmática, no qual bombeia prótons para fora da célula ao custo de consumo de ATP, sendo, conseqüentemente uma menor quantidade de ATP disponibilizada para a formação da biomassa celular.

Sendo assim, em meio com a presença de ácidos orgânicos a demanda por ATP seria tão alta que as células não teriam como evitar a acidificação do citosol, acarretando no aumento expressivo da fase *lag*, além da redução de crescimento específico e rendimento de biomassa (Guo and Olsson, 2014; Larsson et al., 1999).

O valor de pK<sub>a</sub> do ácido fórmico (3,75) é consideravelmente menor que do ácido acético (4,76) e do ácido levulínico (4,64), sendo o efeito tóxico desses ácidos em

*Saccharomyces cerevisiae* atribuído a forma não-dissociada e na seguinte ordem ácido acético < levulínico < fórmico.

A toxicidade mais pronunciada do ácido levulínico, em relação ao acético, pode estar relacionada com a sua maior hidrofobicidade, o que resultaria em uma permeação facilitada na membrana celular (Larsson et al., 1999), entretanto como o ácido acético encontra-se em concentrações mais expressivas nos hidrolisados hemicelulósicos, o seu efeito de inibição acaba sendo mais pronunciado e comumente reportado.

Guo and Olsson, (2014), em avaliação do efeito fisiológico dos ácidos orgânicos em *S. cerevisiae*, observaram que a adição de ácidos, em pH 5,0, resultou em distintas alterações na fase *lag*, tanto no consumo de glicose como para rendimento em etanol, estando atrelado a concentração e ao tipo de ácido adicionado no meio fermentativo. O ácido fórmico resultou na redução em 50 % no rendimento de biomassa em uma fase *lag* de 72 horas em relação a glicose (faixa de concentração de 95 mM a 220 mM), sendo valores muito superiores aos obtidos nos ensaios com adição de ácido acético ou ácido levulínico.

Em *S. cerevisiae*, o ácido acético é assimilado pela difusão facilitada pelo canal Fps1 (Mollapour and Piper, 2007) como difusão passiva. A dissociação intracelular acidifica o citoplasma ativando a H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática, Pma1 (Eraso and Gancedo, 1987), e estimulando a absorção de potássio para auxiliar na conservação do balanço elétrico durante a troca de prótons (Macpherson et al., 2005; Yenush et al., 2005).

A inibição de leveduras na presença de ácidos fracos tem sido reportada em concentrações superiores 220 mM ácido acético, 220 mM ácido fórmico e 400 mM ácido levulínico, em meios fermentativos preparados de glicose (Amadi and Ifeanacho, 2016; Guo and Olsson, 2014).

A concentração de ácidos alifáticos em materiais pré-tratados e hidrolisados variam de acordo com a biomassa empregada e a severidade do processo, conforme previamente reportado na **Tabela 3**.

### 2.7.1.2 Aldeídos furânicos

Os dois principais inibidores furânicos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), são formados pela decomposição de pentoses e hexoses, respectivamente, devido à desidratação por catálise ácida durante a etapa de pré-tratamento e sua formação depende da temperatura e da concentração de ácidos empregados (Fengel and Wegener, 1989; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a; Taherzadeh et al., 2000).

A concentração desses compostos pode variar amplamente de acordo com a biomassa empregada e às condições do pré-tratamento, se comportando como inibidores e ocasionando danos as paredes e membranas celulares, inibindo o crescimento celular, reduzindo as atividades enzimáticas e conseqüentemente a produção de etanol (Heredia-Olea et al., 2012). Estes compostos são responsáveis pela indução de modificações na cromatina, danificações ao DNA, redução da translação e inativação de inúmeras enzimas glicolíticas e inibem a síntese de RNA nos microrganismos (Allen et al., 2010; Ask et al., 2013a; Banerjee et al., 1981).

Algumas leveduras conseguem metabolizar esses furanos e transformá-los em álcoois de menor toxicidade com o uso de oxireductases e NADPH como cofator (Ask et al., 2013a; Diaz De Villegas et al., 1992). Essa conversão aumenta a energia celular e reduz a concentração de cofatores redox (Ask et al., 2013a; Taherzadeh et al., 2000).

Sendo assim é associado a redução na produção de glicerol e um aumento na produção de acetato durante a produção de etanol na presença principalmente de furfural (Ask et al., 2013b; Palmqvist et al., 1999).

Resultados de exposição de *S. cerevisiae* a esses furanos, sugere que o crescimento da levedura é mais sensível a presença do furfural do que ao HMF (Taherzadeh et al., 2000), devido a menor permeabilidade desde último a célula.

Além disso, o acúmulo de espécies oxigenadas reativas induzidas pelo furfural pode danificar a mitocôndria e o vacúolo de *S. cerevisiae* (Allen et al., 2010) e como ambos os compartimentos são responsáveis pela regulação do balanço redox do citosol, a perda dessas funções pode resultar na diminuição expressiva da taxa de consumo de glicose por exemplo (Caspeta et al., 2015).

O furfural apresenta-se tóxico para *S. stipitis* sob condições de fermentação aeróbica, enquanto que para *S. cerevisiae* esse composto apresenta menor influência sob condições de fermentação anaeróbicas, sendo convertido em ácido furóico (Palmqvist et al., 1999).

A adaptação de microrganismos em altas concentrações de furfural tem sido uma abordagem empregada com sucesso na diminuição do efeito desse composto no crescimento celular. Essa adaptação pode estar relacionada a síntese de novas enzimas e coenzimas responsáveis pela redução do furfural (Hao et al., 2013; Liu et al., 2004).

A redução do furfural tem sido atrelada ao cofator NADH, enquanto a redução do HMF é associada com consumo de NADPH (Almeida et al., 2008).

A capacidade dos microrganismos em reduzir os aldeídos furânicos em compostos com menor toxicidade durante o processo de fermentação em biorreator pode ser referido como destoxificação *in situ* (Liu, 2011).

### 2.7.1.3 Compostos fenólicos

Dentro da classe de inibidores fenólicos, a maior parcela é proveniente da quebra da lignina, englobando compostos orgânicos como ácidos, acetonas e aldeídos, como por exemplo siringaldeído, ácido siríngico e siringona, ácido vanílico e vanildeído (Adeboye et al., 2014; Parawira and Tekere, 2011).

Dentre as classes de inibidores, os fragmentos de lignina apresentam maior toxicidade que os compostos furânicos e ácidos orgânicos, visto que causam a partição e distúrbio da membrana celular afetando a habilidade de atuar como barreira seletiva e matriz enzimática afetando o crescimento celular e assimilação de açúcar (Negritto et al., 2017; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000b).

O efeito inibitório dos compostos fenólicos e aromáticos são muito variáveis e podem estar relacionados com grupos funcionais específicos (Larsson et al., 2000). Na maioria dos casos, o mecanismo da toxicidade não foi elucidado, entretanto a literatura reporta suposições sobre os mecanismos de atuação.

Supõe-se que os fenólicos interfiram na função e trocas na proporção proteína-lipídio (Heipieper et al., 1991) e a partição e perda da integridade da membrana biológica dos microrganismos diminuindo a taxa de crescimento e assimilação de açúcar (Palmqvist et al., 1999).

Delgenes et al., (1996), reportaram o efeito de inibidores derivados de lignina na eficiência de utilização de açúcar em *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* e reportou que a vanilina se apresenta como o inibidor de crescimento e de produção de etanol mais potente, tanto em leveduras que fermentam xilose como hexoses.

Hu et al., (2009), observaram que a vanilina e *p*-hidrobenzaldeído em concentrações de 10 mM já inibiam o crescimento de *Rhodospiridium toruloides*.

A levedura *S. cerevisiae* pode converter alguns fenólicos em compostos de menor toxicidade, como por exemplo o aldeído coniferílico é reduzido a álcool coniferílico e álcool dihidroconiferil (Larsson et al., 2000).

Sugere-se também que os compostos fenólicos estejam intimamente atrelados a inibição enzimática no processo quebra das ligações da celulose para liberação de glicose, devido a inativação das enzimas devido ao potencial de indução a precipitação (Kim et al., 2011).

Adeboye et al., (2014), investigaram o efeito inibitório de 13 compostos fenólicos usualmente encontrados em hidrolisado de conífera, como álcool vanílico, ácido siríngico,

ácido *p*-cumárico, hidroquinona, ácido homovanílico dentre outros. O estudo reportou que 3-metóxi-4-hidroxi-cinamaldeído apresentou-se como o composto mais tóxico para *S. cerevisiae*, com inibições substanciais de crescimento em concentrações de 1,8 mM.

O efeito da toxicidade não segue uma tendência com base na classificação dos compostos por grupos funcionais (fenólicos aldeídos, fenólicos cetonas e fenólicos álcoois), mas podem ser função da ocorrência também dos grupos funcionais presentes nas cadeias laterais, como metoxil e hidroxil, além da ocorrência de ligações insaturadas (Adeboye et al., 2014).

Tem sido reportado que a presença de grupos fenólicos nos hidrolisados impacta diretamente na produtividade de etanol pela *S. cerevisiae* (Larsson et al., 2000, 1999).

A literatura reporta que alguns compostos como ácido ferúlico e vanilina podem ser assimilados e convertidos pela *S. cerevisiae* (Adeboye et al., 2015), entretanto, a concentração inibitória para o ácido ferúlico é de 1.8 mM.

Os aldeídos fenólicos têm sido reportados como mais potencialmente inibidores enquanto os fenólicos ácidos e álcoois como os de menor toxicidade (Almeida et al., 2007; Klinke et al., 2004).

Adeboye et al., (2014), reportaram que o efeito inibitório dos compostos fenólicos estaria atrelado a combinação dos grupos funcionais das cadeias laterais, como grupos metoxilas e hidroxilas e a presença de ligação insaturadas na estrutura, ao invés da categorização entre as classes aldeídos, ácidos, cetonas e álcoois. Tendo que entre os 13 compostos fenólicos testados, o 4-hidroxi-3-metóxicinamaldeído apresentou-se como o mais tóxico.

A literatura supõe que a presença e posição dos grupos funcionais da cadeia lateral e as insaturações tem influência direta nas reações biológicas e nas atividades inibidoras desses fenólicos em bactérias bem como as atividades antioxidantes em humanos (Rice-Evans et al., 1996).

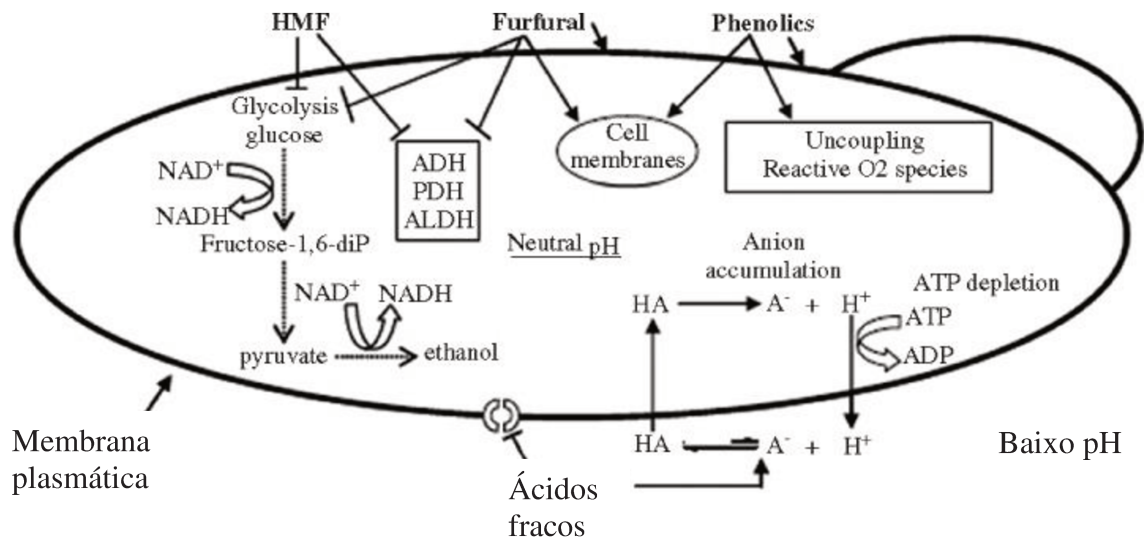
Keweloh et al., (1990) reportaram que os compostos fenólicos interferem principalmente na função das proteínas e desencadeiam mudanças na relação proteína-lipídio, sendo assim estes compostos afetam as funções celulares, como a classificação e a sinalização, bem como causam o inchaço das membranas celulares.

Vanilina e catecol são compostos frequentemente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a) e amplamente reportado em hidrolisados de madeiras, apresentando toxicidade em concentrações superiores a 1 g/L, com reduções em 30 % na produção etanol.



A **Figura 14** abaixo apresenta um representativo esquemático dos inibidores e de alguns mecanismos de inibição propostos na literatura (Almeida et al., 2007).

**Figura 14.** Esquemático representativo dos mecanismos de inibição propostos na literatura para aldeídos furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos para *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptada de (Almeida et al., 2007).

A **Figura 14** representa um resumo esquemático da influência dos principais inibidores no metabolismo das leveduras, no qual o HMF ocasiona a inibição da álcool desidrogenase (ADH) da piruvato desidrogenase (PDH), da aldeído desidrogenase (ALDH) e por resultar na inibição da glicólise tanto por meio das enzimas envolvidas, bem como dos cofatores. Já os ácidos seriam responsáveis pelo acúmulo de ânions tóxicos e pela inibição da assimilação de amino ácidos aromáticos, enquanto os compostos fenólicos geram espécies de oxigênio reativas e danos a membrana celular (Almeida et al., 2007).

## 2.8 Processos de Destoxificação

Inúmeros processos de destoxificação tem sido propostos na literatura visando a redução da concentração de compostos tóxicos que podem ocasionar a inibição dos principais microrganismos empregados em processos fermentativos (Arslan and Eken-Saraçoğlu, 2010; Chandel et al., 2007; Villarreal et al., 2006).

Os métodos de destoxificação mais usualmente empregados são baseados na adição de substâncias redutoras, no qual visa modificações químicas dos compostos tóxicos inibitórios, alterando assim o grau de toxicidade (Alriksson et al., 2011) e na modificação do pH, baseado

no decréscimo da toxicidade por meio de dois mecanismos. O primeiro mecanismo está relacionado a dependência do pH do meio para a precipitação de compostos tóxicos. Já o segundo é atribuído à decomposição de alguns compostos inibitórios pela sua instabilidade em certas faixas de pH (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a).

A maior parcela dos métodos usualmente empregados na etapa de destoxificação resultam em reduções consideráveis na concentração de açúcares, perdas essas indesejáveis para as etapas subsequentes, como por exemplo a fermentação (Eken-Saraçoğlu and Arslan, 2000; Larsson et al., 2000; Mussatto et al., 2004).

A classificação dos vários processos de tratamento do hidrolisado leva em conta a forma como são realizados (individual ou combinado) e a natureza dos agentes empregados (biológico, físico ou químico) (Kumar and Sharma, 2017).

Os métodos biológicos podem contemplar o uso de enzimas ou microrganismos que modifiquem a composição dos compostos tóxicos, ou aplicação de técnicas de bioprocessos para adaptação dos microrganismos ao meio (Oliveira et al., 2018). Já os métodos físicos podem envolver, por exemplo, etapas de evaporação e o uso de carvão ativo. Na evaporação ocorre a remoção dos compostos voláteis, como furfural e o ácido acético, entretanto promove a concentração de compostos não-voláteis, que podem aumentar a toxicidade do meio (Mussatto et al., 2004). O carvão ativo promove uma redução da concentração dos compostos inibitórios, entretanto, é geralmente integrado a outros processos como a alteração de pH com hidróxido de cálcio para uma melhor eficiência (Mateo et al., 2013).

Por fim, entre os métodos químicos pode-se citar o uso de resinas de troca iônica, processo que envolve o ajuste de pH do meio e floculação por polímeros, sendo eficientes na remoção de aldeídos furânicos, compostos fenólicos e ácido acético. Em contrapartida, apresentam custo elevado, o que torna o processo economicamente inviável na realidade tecnológica atual (Mussatto et al., 2004).

Para o processo que envolve alteração do valor de pH no meio, conhecido como *overliming*, há a diminuição de compostos tóxicos por meio da precipitação e/ou da instabilidade de certos compostos em determinadas condições de pH, porém, neste processo, açúcares podem ser degradados (Purwadi et al., 2004). O processo de floculação por polímero é eficaz na remoção de compostos tóxicos, porém se mostra menos eficiente do que os tratamentos com carvão e resina (Yasarla and Ramarao, 2012).

Processos de destoxificação que possibilitem a recuperação dos produtos gerados no hidrolisado podem ser de grande interesse uma vez que a recuperação/reutilização destes produtos secundários pode trazer ganhos para o setor sucroenergético. Neste sentido, a extração

líquido-líquido, que faz uso de solventes orgânicos para promover uma remoção seletiva de componentes tóxicos, pode ser uma alternativa interessante.

Outras estratégias incluem alterações na metodologia fermentativa, como uso de reciclo de células e fermentações com alta densidade celular, e o emprego da engenharia metabólica, com a introdução e alteração de genes tornando o microrganismo mais resistente ao agente inibidor (Mans et al., 2018; Nakanishi et al., 2017; Santos et al., 2016).

Jeong et al., (2013), avaliaram o efeito do diluente na extração de inibidores do processo fermentativo utilizando n-pentano; n-hexadecano; tetradecano e n-octanol, no qual reportou os maiores índices de extração de ácido levulínico na presença de n-hexadecano e n-octanol, enquanto HMF foi seletivamente removido pelo n-octanol.

Grzenia et al., (2012), reportam o emprego de membranas extrativas de micropropileno para a destoxificação de hidrolisado de sabugo de milho pela remoção de ácido sulfúrico, ácido acético, furfural e HMF, resultando em incrementos em 10 % no rendimento de etanol em relação ao hidrolisado hemicelulósico destoxificado com tratamento por hidróxido de amônio.

A **Tabela 4** apresenta alguns destes métodos de destoxificação empregados na literatura.

**Tabela 4.** Métodos de remoção de compostos inibitórios usualmente empregados na literatura para hidrolisado hemicelulósico.

<b>Método</b>	<b>Agentes</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Condições</b>	<b>Remoção (%)</b>	<b>Referências</b>
<b>Alcalino</b>	<i>Overliming</i> com Ca(OH) <sub>2</sub>	Explosão a vapor com ácido diluído	pH 9 – 10,5 seguido de ajuste de pH com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou HCl	Furfural (51 %) HMF (51 %) Fenólicos (41 %)	(Sánchez and Cardona, 2008)
	<i>Overliming</i> com Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidrotérmico	Ajuste de pH de 1,3 até 10 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Furfural (35 %) HMF (18 %) Fenólicos (18,5 %)	(Vallejos et al., 2016)
	<i>Overliming</i>	Hidrólise ácida com 2,5 % (v/v) HCl	Não reportado	Furanos (45,8 %) Fenólicos (35,9 %)	(Chandel et al., 2007)
<b>Microbiano</b>	<i>Trichoderma reesei</i>	Explosão a vapor	Não reportado	Fenólicos (80 %)	(Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a)
<b>Enzimático</b>	Lacases	Hidrólise ácida com 2,5 % (v/v) HCl	Não reportado	Fenólicos (77,5 %) Não reduziu furanos e ácido acético	(Chandel et al., 2007)
<b>Eletrodialise</b>	Membranas carregadas e diferença de potencial elétrico	Hidrólise ácida com 2,5 % (v/v) HCl	Pre-evaporação a 100°C, 15 min; eletrodialise a 20 V e 50 L/h	Furfural (45 %) Ácido acético (90 %)	(Cheng et al., 2008)
<b>Resina de troca iônica</b>	Resina comercial aniônica	Hidrólise ácida com 2,5 % (v/v) HCl	1:1 (m/m) resina/ hidrolisado agitação por 1 h a T ambiente.	Furanos (63,4 %) Fenólicos (75,8 %) Ácido acético (85,2 %)	(Chandel et al., 2007)
<b>Evaporação à vácuo</b>	Evaporador	Pré-tratamento hidrotérmico	Concentração 55°C sob vácuo	HMF e furfural (100%) Ácido acético (41 %) Ácido fórmico (19 %)	(Vallejos et al., 2016)
<b>Carvão Ativo</b>	Carvão Ativo	Hidrólise ácida com 2,5 % (v/v) HCl	Não reportado	Furanos (38,7 %) Fenólicos (57 %) Ácido acético (46,8 %)	(Chandel et al., 2007)
		Hidrotérmico	Tratamento com 3 % de carvão ativo à 60°C por 60 min	Furfural (81 %) HMF (100 %)	(Vallejos et al., 2016)

## **CAPÍTULO 3 - Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico e da celulignina proveniente do pré-tratamento ácido**

Este capítulo apresenta o descritivo do processo de pré-tratamento com ácido diluído, realizado em reator piloto de 350 L no modo operacional batelada, incluindo a composição detalhada das correntes de entrada e saída do processo.

Apesar do pré-tratamento ácido ser intensamente estudado na literatura, o perfil composicional do hidrolisado, que dependem das condições operacionais, ainda se encontra como um desafio científico. Neste capítulo é apresentado o balanço de massa do processo de pré-tratamento e a caracterização do hidrolisado hemicelulósico empregando desde técnicas simples como o FTIR, até avançadas como RMN-HSQC, visando assim contribuir na área de bioprocessos por meio do melhor mapeamento dos principais constituintes da fração do bagaço de cana-de-açúcar solubilizado durante um pré-tratamento ácido diluído.

### **3.1 Materiais e Métodos**

#### **3.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído para obtenção do hidrolisado hemicelulósico**

O bagaço *in-natura* utilizado neste projeto foi cedido pela Usina da Pedra (Serrana - SP), coletado por colheita mecanizada resultante da última moenda após extração do caldo. O material foi seco a temperatura ambiente, não sendo realizado no mesmo qualquer processo de lavagem ou separação.

Previamente a etapa de pré-tratamento o material foi homogeneizado, garantindo que a fração empregada seja representativa do todo.

A reação de pré-tratamento foi realizada em reator de pré-tratamento piloto de 350L de liga hasteloy 276 (Pope Scientific INC) (**Figura 15**) pertencente a planta piloto para desenvolvimento de processos (PPDP) do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR-CNPEM) de acordo com condições previamente otimizadas (Vaz et al., 2017). O reator é equipado com sistema de agitação mecânica e aquecimento por meio de inserção de vapor ou óleo térmico na camisa. O reator foi carregado com 15 kg de bagaço de cana-de-açúcar (base seca) e solução de ácido sulfúrico 0,5% (v/v), considerando uma concentração de sólidos final de 10% (m/m).

A mistura reacional foi aquecida e mantida a 140°C por 15 min sob agitação. Após o tempo reacional o reator foi gradualmente resfriado, despressurizado e descarregado após o meio atingir uma temperatura de 100°C. A fração sólida referida como celulignina (CL) foi separada do hidrolisado hemicelulósico (LH) por filtração utilizando um filtro do tipo Nutsche com capacidade de 100 L e constituído de aço hasteloy 276 (Pope Scientific INC) conforme apresentado na **Figura 15**. A CL foi lavada até pH neutro, pesada para determinação de rendimento mássico e caracterizada quanto a sua composição físico-química. A fração líquida teve seu volume determinado (considerando também a fração líquida adsorvida pela CL) e foi quantificada quanto aos carboidratos, compostos fenólicos e produtos de degradação e armazenado a 4°C para uso posterior. A reação foi realizada em triplicata. O descritivo para cálculo do rendimento mássico de pré-tratamento, solubilização dos componentes e severidade encontra-se no ANEXO A.

**Figura 15.** Reator de pré-tratamento de 350L e do filtro do tipo Nutsche utilizado no processo de separação sólido-líquido.



Fonte: Autor

### **3.1.2 Caracterização da celulignina – fração sólida**

#### **3.1.2.1 Caracterização físico-química**

A composição química do material *in-natura* e da celulignina foi determinada de acordo com a metodologia analítica reportada em (Sluiter et al., 2016), e apresentado no ANEXO B.

#### **3.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As fotomicrografias do bagaço de cana *in-natura* e após pré-tratamento com ácido diluído foram obtidas em um equipamento JEOL (modelo JSM-6330F) com detector Thermo JEOL (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 5,0 kV (equipamento pertencente a instalação do Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano/CNPEM). Para obtenção das imagens, as amostras foram previamente submetidas ao recobrimento metálico de 16 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC SCD 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

### **3.1.3 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) e da celulignina (fração sólida)**

#### **3.1.3.1 Quantificação de açúcares e produtos de degradação**

Os hidrolisado de pré-tratamento foram analisados por cromatografia líquida (HPLC) de acordo com a metodologia estabelecida no protocolo padrão do NREL (Sluiter et al., 2008). No caso do hidrolisado de pré-tratamento, parte do material foi utilizado para quantificação dos açúcares monoméricos e a outra parte foi usada para quantificação dos açúcares totais (monômeros e oligômeros) após uma etapa de hidrólise ácida como descrito por (Jacobsen and Wyman, 2002). O ANEXO B apresenta o descritivo da metodologia empregada.

#### **3.1.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As análises de FTIR do hidrolisado hemicelulósico foram realizadas em equipamento Spectrum 400 séries FTIR/NIR da marca Perkin Elmer com acessório de ATR com cristal de seleneto de zinco. A resolução espectral utilizada foi de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada amostra 16 varreduras foram acumuladas na região espectral de 650– 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.1.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - HSQC

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram adquiridos utilizando o espectrômetro Agilent Inova pertencente ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio-CNPEM), operando a uma frequência Larmor de 499,726 MHz a 25°C em um instrumento equipado com uma sonda de tripla ressonância. Os parâmetros para aquisição de dados foram: largura de pulso de 10.250, janela espectral de 8000 Hz e 256 incrementos de tempo foram gravados. Os espectros foram calibrados com base no sinal de tetrametilsilano (TMS).

Cerca de 35 mg das amostras foram dissolvidos em 0,65 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) (Aldrich, 99,8 átomos % D, contendo 0,03% (v/v) TMS) e foram colocados em tubos de RMN de 5 mm e submetidos a análise em solução de  $^1\text{H}$  NMR e 2D HSQC.

A amostra foi caracterizada após ajuste de pH devido ao fato de que o *tuning* e razão de ruído no equipamento serem afetadas em pH's ácidos em análises de carboidratos (Gjersing et al., 2013).

### 3.1.4 Balanço de massa da etapa de pré-tratamento

O balanço de massas do processo de pré-tratamento com ácido diluído foi determinado considerando-se o rendimento da reação como uma porcentagem do total de sólidos recuperados após pré-tratamento (base seca). Polímeros, oligômeros, monômeros e produtos de degradação como HMF, furfural, ácido fórmico e ácido levulínico foram medidos e considerados, de acordo com as vias de degradação, com o intuito de chegar o mais próximo possível de 100 % do fechamento mássico do processo.

Para tal, todos os componentes de todas as correntes foram compilados e reportados para cada etapa do processo de pré-tratamento. Os dados apresentados são referentes a uma média de três replicatas.

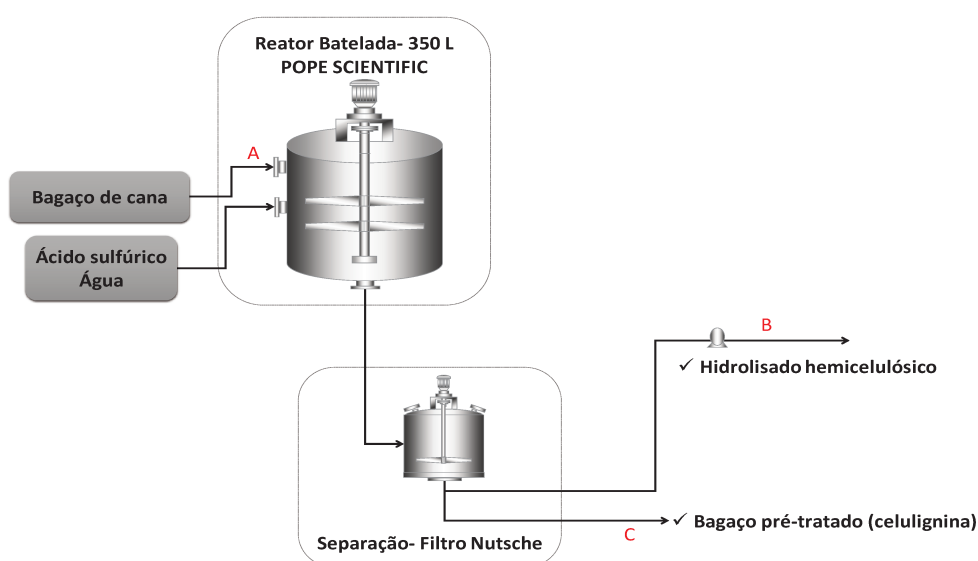
As concentrações de glicose, celobiose, ácido fórmico e HMF foram usadas para o cálculo do teor de celulose, enquanto que o teor de hemiceluloses foi calculado com base nas concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural. As suas massas foram divididas pelo peso seco do material inicial e multiplicadas pelos fatores de hidrólise, que foram 0,9; 0,95; 1,29 e 3,52, respectivamente, para a glicose, celobiose, HMF e ácido fórmico, e 0,88 para ambos, xilose e arabinose, 0,72 para o ácido acético e 1,37 para furfural.

A quantificação da lignina solúvel contida na corrente líquida foi realizada por meio de medições de absorvância em espectrofotômetro conforme descrito no item 3.1.3.1.



O balanço de massa foi realizado considerando as correntes de entrada e saída do reator, e do procedimento posterior de separação sólido-líquido, gerando uma fração sólida e uma fração líquida que foram referidas ao longo do texto como celulignina e hidrolisado hemicelulósico respectivamente, conforme fluxograma esquemático abaixo (**Figura 16**).

**Figura 16.** Fluxograma esquemático da etapa de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar com as correntes de entrada e saída do processo; Sendo: A) Bagaço *in-natura*; B) hidrolisado hemicelulósico (fração líquida) e C) celulignina (fração sólida).



Fonte: Autor

## 3.2 Resultados

### 3.2.1 Pré-tratamento ácido diluído

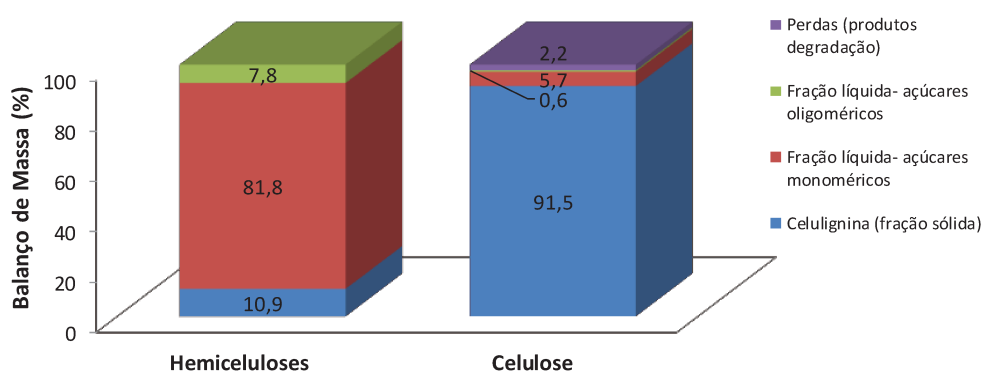
A composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a etapa de pré-tratamento é apresentada na **Tabela 5** e a **Figura 17** apresenta o balanço de massas para a celulose e hemiceluloses.

**Tabela 5.** Composição físico-química do bagaço de cana *in-natura* e após pré-tratamento com ácido diluído.

Componentes (%)	<i>In-natura</i>	Celulignina
Celulose	43,84 ± 0,50	61,39 ± 0,31
Xilana*	25,75 ± 0,14	4,29 ± 0,37
Acetil	2,63 ± 0,08	0,00 ± 0,00
Lignina	21,10 ± 0,43	31,44 ± 1,68
Cinzas	2,15 ± 0,45	4,44 ± 1,47
Extrativos	4,07 ± 0,06	-
<b>Balanco</b>	<b>99,54 ± 0,44</b>	<b>101,55 ± 0,50</b>

\*xilose + arabinose

**Figura 17.** Balanço de massa das hemiceluloses e celulose para o pré-tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído (140°C; 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15min).



O pré-tratamento com ácido sulfúrico proporcionou uma solubilização mássica média de 65%, resultando na solubilização de 8,5%; 89,1% e 2,7% de celulose, hemiceluloses e lignina respectivamente.

A aplicação da lei da conservação para analisar um processo contabilizando a massa de cada reagente/produto entrando ou saindo de uma unidade do processo é necessário para otimização de processos de bioconversão e biorrefinaria, além do fornecimento de informações para posteriores avaliações técnico-econômicas (Burkhardt et al., 2013; Garlock et al., 2011).

O grupo acetil, que pode ser quantificado na forma de ácido acético mediante a solubilização/degradação das hemiceluloses (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a), foi totalmente solubilizado, sendo quantificado na sua totalidade no hidrolisado .

A xilana foi solubilizada durante a etapa de pré-tratamento da fração sólida para a fração líquida, sendo preferencialmente encontrada no hidrolisado na forma de xilose monomérica, conforme reportado na **Figura 17**. Já a celulose foi majoritariamente preservada

durante o pré-tratamento, permanecendo 91% da quantidade inicialmente contida no bagaço de cana *in-natura*, na fração sólida (celululignina).

O fator severidade do pré-tratamento foi de 1,29 (equação A4-ANEXO A) e esse parâmetro retrata a influência da temperatura, do tempo reacional e do pH final de cada condição operacional, tendo que altas severidades resultam na obtenção de uma celulignina altamente digestível na etapa de sacarificação enzimática, em contrapartida os açúcares hemicelulósicos podem ser mais facilmente degradados em subprodutos, reduzindo assim o rendimento global de açúcar recuperado. Por outro lado, se o fator de severidade é muito baixo, a recuperação de pentoses pode ser elevada, mas a digestibilidade enzimática da celulignina diminui consideravelmente, o que também vai resultar em um baixo rendimento de açúcar global.

### 3.2.1.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizado quanto ao teor de açúcares, ácidos orgânicos, produtos de degradação, teor de fenólicos e pH e os resultados são apresentados na **Tabela 6**.

Analisando os resultados de composição do hidrolisado hemicelulósico é possível observar que os inibidores mais proeminentes no meio são o ácido acético (3,02 g/L) e compostos fenólicos (4,96 g/L).

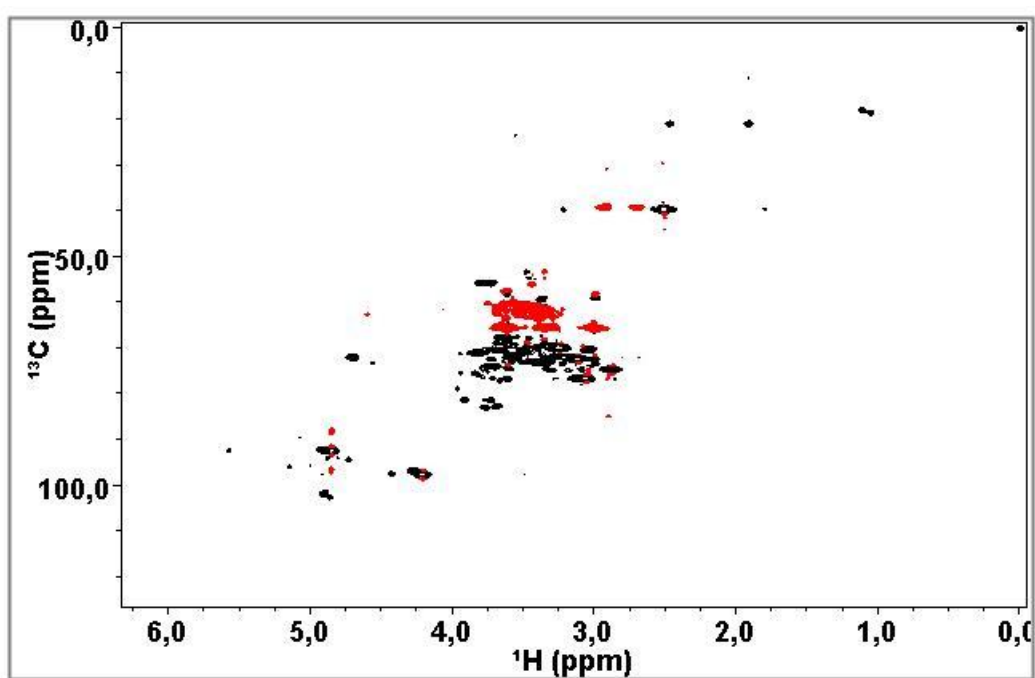
**Tabela 6.** Composição do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Compostos	Concentração (g/L)
Glicose	3,97
Xilose	42,98
Arabinose	2,41
Celobiose	0,24
Ácido fórmico	0,16
Ácido acético	3,02
Ácido levulínico	0,02
HMF	0,13
Furfural	0,70
Compostos fenólicos totais	4,96
pH	1,67

O hidrolisado hemicelulósico (pH~ 5,5- 6,0) foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (HSQC), conforme apresentado na **Figura 18**. A **Tabela 7** apresenta as respectivas atribuições.

Foram apresentados somente o espectro da região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$  50–90/ 2,5– 6,0) devido a sobressalência de sinais provenientes de carboidratos, frente os sinais dos fenólicos.

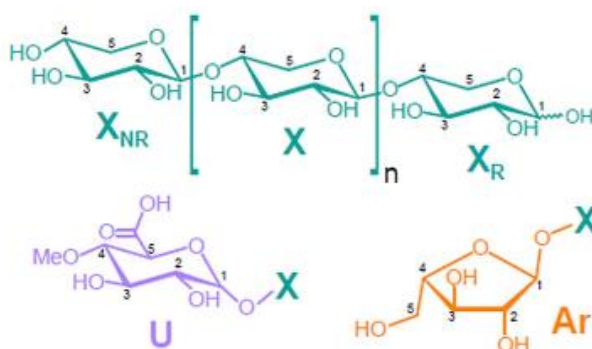
**Figura 18.** Região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$  50–105/2,5–6,0) no espectro de HSQC do hidrolisado hemicelulósico com ajuste de pH.



**Tabela 7.** Atribuições dos sinais de correlação carbono-hidrogênio para os carboidratos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de açúcar, caracterizado por RMN-HSQC.

ID	Sinais	Atribuições
	59,19 / 3,37	Não identificado
	61,12 / 3,63	Não identificado
<b>UOMe</b>	60,4 / 3.51	C/H de grupo metoxila do ácido 4-O-metilglucurônico
<b>Ar5</b>	61,40/ 3,35	C <sub>5</sub> /H <sub>5</sub> em α-L-arabinofuranosídeo
	62,45 / 3,38	Não identificado
<b>X5</b>	62,8/3.20 e 3.86	C <sub>5</sub> /H <sub>5</sub> em β-D-xilopiranosídeo
<b>X5NR</b>	65,37/3,00 e 3,35 e 3,61	C <sub>5</sub> /H <sub>5</sub> em β-D-xilopiranosídeo (NR)
	67,51/ 3,67	Não identificado
	67,65/ 3,61	Não identificado
<b>X4NR</b>	69,71/3,25	C <sub>4</sub> /H <sub>4</sub> in β-D-xilopiranosídeo (NR)
	70,25/ 3,04	Não identificado
	71,01/ 3,82	Não identificado
<b>U2</b>	71,75/ 3,55	C <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> em 4 ácido 4-O-metilglucurônico
	71,98/ 4,70	Não identificado
	72,21/ 3,12	Não identificado
<b>U3</b>	73,01 e 3,38	C <sub>3</sub> /H <sub>3</sub> em ácido 4-O-metilglucurônico
	74,59/2,87	Não identificado
	76,55/ 3,06	Não identificado
	81,32/ 3,72	Não identificado
	82,71/3,69	Não identificado
	82,88/3,77	Não identificado
<b>αX1R</b>	92,36/ 4,85 e	C <sub>1</sub> /H <sub>1</sub> em α-D-xilopiranosídeo (R)
<b>αX1R</b>	92,16/4,90	C <sub>1</sub> /H <sub>1</sub> em α-D-xilopiranosídeo (R)
	96,77/4,27	Não identificado
<b>βX1R</b>	97,51/ 4,21	C <sub>1</sub> /H <sub>1</sub> em β-D-xilopiranosídeo (R)
<b>X1</b>	101,8 e 4,91	C <sub>1</sub> /H <sub>1</sub> em β- D-xilopiranosídeo
	102,53 e 4,87	Não identificado
	140,46/8,53	Não identificado
	142,75/ 8,36	Não identificado

R- extremidades redutoras; NR- extremidades não redutoras.



Os espectros de HSQC das amostras apresentaram intensos sinais de carboidratos, enquanto os sinais de fenólicos foram fracamente detectados na região aromática do espectro, por isso não serão abordadas na discussão.

O pico do solvente ( $\delta_C$  39,5;  $\delta_H$  2,49) foi utilizado como referência e os picos de correlações do HSQC foram atribuídas conforme prévias avaliações de amostras de bagaço de cana reportadas na literatura (Reinoso et al., 2018; Sporck et al., 2017).

A análise dos polissacarídeos oriundos de materiais lignocelulósicos é um grande desafio devido a heterogeneidade da composição dos monossacarídeos, tipos de ligação e sequencias glicosídeas (Li et al., 2013). A **Figura 18** e a **Tabela 7** reportam a presença de inúmeros sinais, entretanto, uma significativa parcela não foi passível de identificação de acordo com os dados previamente publicados em literatura.

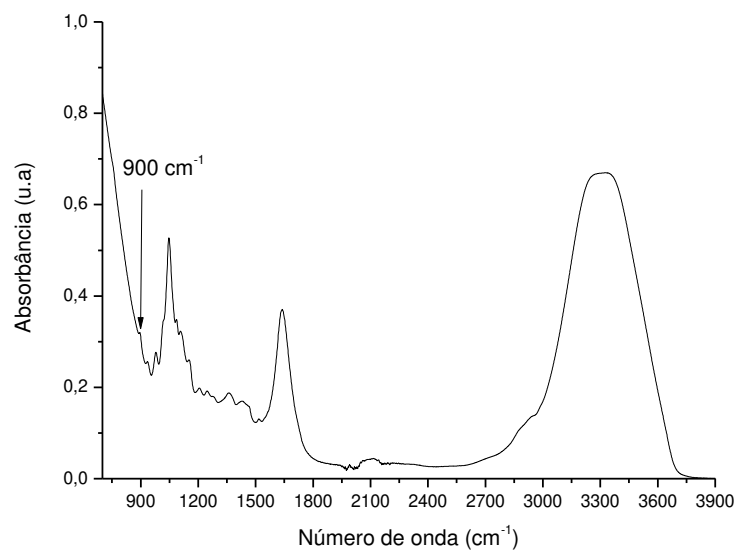
Os sinais mais importantes da fração hemicelulósica correspondem as correlações  $C_1/H_1$ ,  $C_2/H_2$ ,  $C_3/H_3$ ,  $C_4/H_4$ , e  $C_5/H_5$  para as xilanas ( $X_1$  e  $X_5$ ) e correlação  $C_2/H_2$  e  $C_3/H_3$  em ácido 4-Ometil- $\alpha$ -D-glucurônico ( $U_2$  e  $U_3$ ). Grupos laterais da unidade arabinosil (Ar) foram detectadas em pequenas quantidades, em relação a intensidade dos demais sinais dos carboidratos presentes nas amostras.

A amostra apresenta sinal em  $\delta_C$  92,23 ppm e  $\delta_H$  5,57 ppm, referente a ligação ácido 4-metilglucurônico.

A presença de ligações entre lignina e hemiceluloses tem sido estudada em detalhes para gramíneas, palhas e madeiras e (Peng et al., 2009) reportaram que a maior parte das ligninas de gramíneas está diretamente ligadas as cadeias laterais da arabinose da xilana por ligações do tipo éter.

O próton anomérico pode ser diferenciado em  $\delta_H$  4,35 ppm, com atribuição para  $1 \rightarrow 4$   $\beta$ -D-Xilp da fração das hemiceluloses. Isso confirma que a  $1 \rightarrow 4$   $\beta$ -D-Xilp é uma ligação  $\beta$ -glicosídica, o que é consistente com a presença de um pequeno pico próximo a  $900 \text{ cm}^{-1}$  no espectro de FTIR reportado na **Figura 19**.

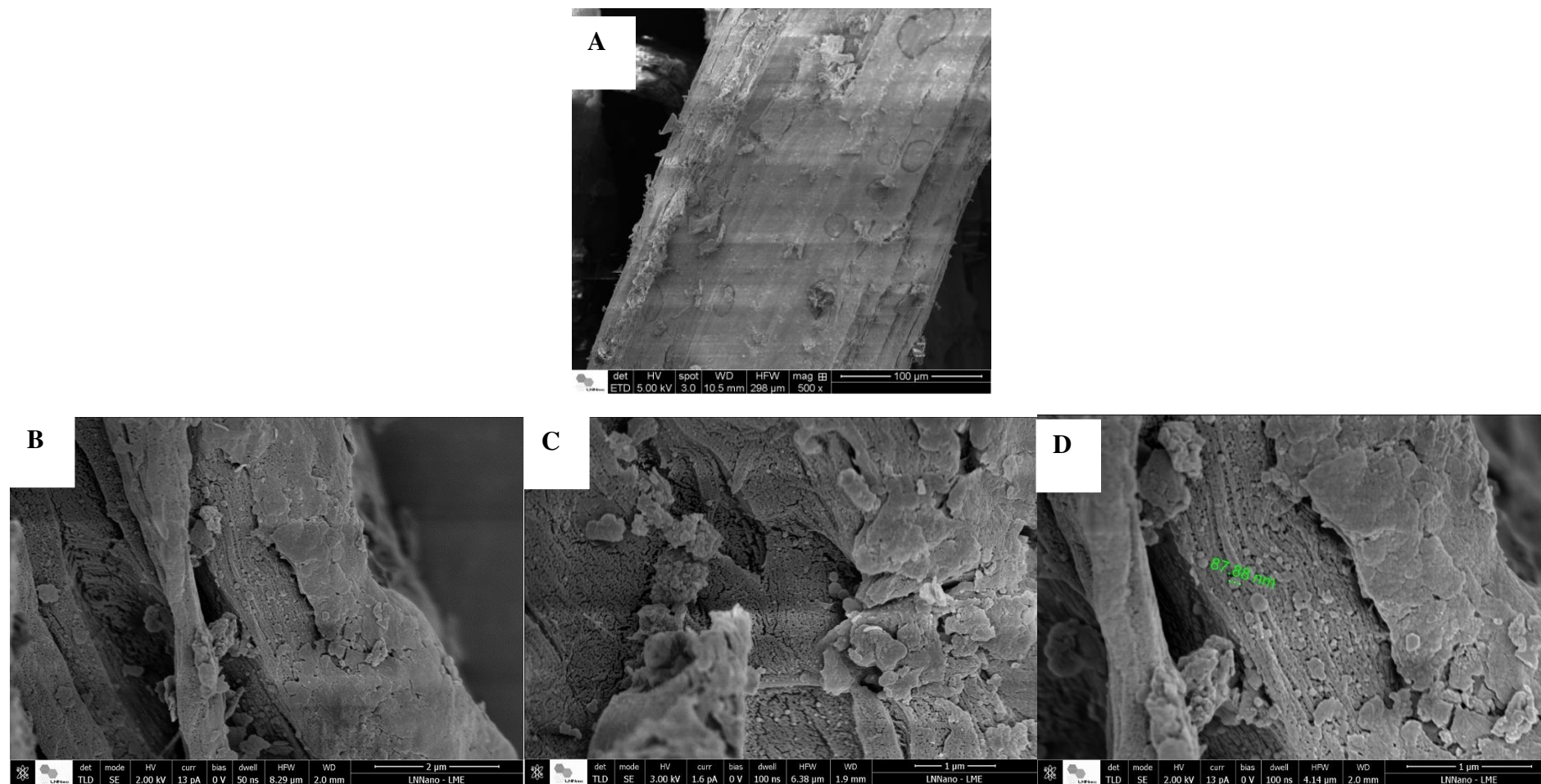
**Figura 19.** Espectro de infravermelho (FTIR) do hidrolisado hemicelulósico.



### 3.2.1.2 Caracterização da celulignina

O bagaço *in-natura* e a celulignina obtida após o pré-tratamento foram analisadas quanto a sua ultraestrutura em microscópio eletrônico de varredura. As imagens obtidas são apresentadas na **Figura 20**.

**Figura 20.** Micrografias do bagaço de cana *in-natura* (A) e após pré-tratamento com ácido diluído (B, C e D).



Fonte: Autor



A microscopia eletrônica de varredura tem sido usada como uma técnica analítica de grande importância e versatilidade no estudo da ultraestrutura da biomassa (Corrales et al., 2012). O bagaço *in-natura* (**Figura 20** – A) apresenta uma morfologia rígida e compacta, apresentando elementos típicos, como feixes de fibras e ceras e extrativos depositados na superfície.

As amostras submetidas ao pré-tratamento com ácido diluído (**Figura 20** – B,C,D) exibiram uma morfologia mais desorganizada, com maior exposição das fibras, com pequenos poros, esferas e rupturas na superfície, que revelam as alterações oriundas do processo de pré-tratamento.

Os pré-tratamentos aquosos e catalisados por ácido não proporcionam uma significativa remoção da lignina, entretanto a literatura reporta a formação de compostos similares a lignina, denominados por pseudo-lignina (Zhuang et al., 2017). De acordo com a **Figura 20** - D, observa-se a presença de estruturas esféricas com diâmetro médio de 0,87 nm., que de acordo com a literatura pode ser atribuído a pseudo-ligninas.

Leschinsky et al., (2009), reportaram que a exposição do hidrolisado hidrotérmico proveniente de madeira a 170°C resultou na formação de um precipitado preto altamente condensado que apresenta massa molar média muito superior a lignina nativa.

Esses compostos similares a lignina são reportados de inúmeras formas na literatura, incluindo a denominação pseudo-lignina e estão intimamente relacionados a adsorção não produtiva de enzimas durante a etapa de hidrólise enzimática (Hu et al., 2012; Sannigrahi et al., 2011).

Li et al., (2007), postularam e posteriormente Sannigrahi et al., (2011) reforçaram que os carboidratos provenientes do pré- tratamento termoquímico são degradados a pseudo-ligninas, tendo que altas temperaturas, baixos pH e a presença de oxigênio são fatores cruciais para a formação desses elementos (Hu and Ragauskas, 2014).

Um estudo recente apontou que além da severidade do pré-tratamento, o processo de resfriamento também contribui para a formação dessas esferas na superfície do material (Shinde et al., 2018; Zhuang et al., 2017), e que sob as condições de pré-tratamento hidrotérmico e ácido diluído o furfural e HMF formados, resultantes da desidratação de pentoses e hexoses respectivamente, são intermediários chaves para a formação de pseudo-ligninas pela ligação com polissacarídeos ou polimerização com a lignina (Li et al., 2005; Zeitsch, 2000).

Selig et al., (2007), reportaram que a lignina proveniente do pré-tratamento ácido de sabugo de milho se deposita sobre a superfície da celulose na forma de glóbulos esféricos, o que impactam nas conversões e rendimentos da hidrólise enzimática.

Donohoe et al., (2008) reportaram que essas estruturas seriam esféricas com uma superfície achatada em contato com a parede celular, as quais tendem a se acumular em pits, *corners* e regiões de delaminação, conforme observado nas **Figura 20 -B, C e D**.

As esferas demonstram conter lignina e são formadas durante o pré-tratamento quando as temperaturas atingem valores acima do intervalo para a transição da fase de lignina, momento em que a lignina começa a se unir em massa maiores e migrar para fora das paredes celulares.

Sannigrahi et al., (2011), reportaram ainda que essas microesferas podem ser geradas a partir de carboidratos sem uma contribuição significativa da lignina durante um processo de pré-tratamento ácido, especialmente os realizados sob condições de altas severidades.

As microesferas aumentam com o incremento da temperatura, aumentando em torno de 4 vezes de quanto a temperatura migra de 160 para 180°C (Yang et al., 2015).

Vários pesquisadores reportam a presença dessas esferas (Donohoe et al., 2008; Pingali et al., 2010; Shinde et al., 2018) determinadas como lignina, e uma variedade de biomassas após pré-tratamento hidrotérmico ou ácido diluído. Há a hipótese de que essas esferas seriam resultado da transição da lignina do estado vítreo para o estado fundido (“*ruberry state*”), seguido por coalescência, migração e extrusão da parede celular vegetal.

Entretanto, como a caracterização estrutural mostra que as pseudo-lignina são constituídas principalmente por estruturas carbonílicas e carboxílicas aromáticas e alifáticas, similares as encontradas na lignina, tem-se que essas estruturas poderiam ser provenientes de reações de policondensação e polimerização da própria lignina ou de carboidratos juntamente com produtos de degradação (Hu et al., 2012).

Adicionalmente, tem-se mudanças morfológicas na lignina durante a etapa de pré-tratamento, no qual, sob condições ácidas, íons carbânions intermediários são formados e apresentam elevada afinidade por nucleófilos da própria estrutura do material, podendo ocasionar a despolimerização, enquanto as reações entre os íons carbânion e os nucleófilos resultam na repolimerização e ou condensação (Fengel and Wegener, 1989; Li et al., 2007).

Quebras extensivas da ligação  $\beta$ -O-4 da lignina, sem altas concentrações de monômeros na fração líquida, podem ser atribuídas a despolimerização acompanhada de repolimerização/recondensação (Svenska pappersbruksföreningen. et al., 1985).

### 3.3 Conclusões parciais

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico (140°C; 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15 min) proporcionou 89,1% de solubilização das hemiceluloses, sendo preferencialmente encontrada no hidrolisado na forma de xilose monomérica, enquanto a celulose foi majoritariamente preservada, permanecendo 91% da quantidade inicialmente contida no bagaço de cana *in-natura*, na fração sólida (celulignina).

O hidrolisado hemicelulósico foi caracterizado apresentando 43 g/L de xilose e os inibidores mais proeminentes foram o ácido acético (3,02 g/L) e compostos fenólicos (4,96 g/L). O espectro de RMN identificou extremidades redutoras e não redutoras dos carboidratos, sendo preferencialmente de ligações  $\beta$ -glicosídicas,  $\alpha$  e  $\beta$ - D-xilopiranosídeo e oriundas do ácido 4-o metil glucurônico.

A celulignina também foi caracterizada exibindo uma morfologia mais desorganizada, com maior exposição das fibras, com pequenos poros e rupturas na superfície, além da presença de estruturas esféricas com diâmetro médio de 0,87 nm, que revelam as alterações oriundas do processo de pré-tratamento ácido.

## **CAPÍTULO 4 - Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico**

Muitos processos de destoxificação são reportados na literatura para prover ganhos significativos em rendimento e produtividade em fermentação, tanto de hexoses como de pentoses, os quais são baseados em distintas estratégias para remoção dos principais inibidores microbianos.

O processo de extração líquido-líquido encontra-se escassamente explorado na literatura, sendo avaliado basicamente por meio de solventes orgânicos como acetato de etila. O presente capítulo avalia o potencial de 14 solventes, incluindo cetonas, álcoois e ésteres, no potencial de remoção de furânicos, ácidos orgânicos e fenólicos do hidrolisado hemicelulósico

Além das avaliações de extratibilidade, são mensuradas as perdas/remoções de carboidratos do hidrolisado e paralelamente são reportados os dados composicionais das correntes de entrada e saída do processo de extração, com balanços de massas completo, que são necessários a comunidade científica visto o potencial de empregabilidade posterior em análises de simulação computacional, visando por exemplo a análise econômica e de sustentabilidade do processo.

### **4.1 Materiais e Métodos**

#### **4.1.1 Centrifugação do hidrolisado hemicelulósico**

Previamente ao processo de destoxificação, o hidrolisado hemicelulósico foi centrifugado utilizando uma centrífuga de chão refrigerada de alta velocidade (Thermo Scientific Sorvall RC-6 Plus) a 8000 rpm (11.949 x g) (Fiberlite F10-4 x 1000 LEX Rotor), a 20°C por 15 minutos para remoção de alguns compostos insolúveis ainda presentes no hidrolisado (finos de bagaço e lignina eventualmente precipitada). A centrifugação foi realizada com controle de temperatura para minimizar a perda de compostos voláteis por evaporação.

O hidrolisado hemicelulósico, livre dos compostos insolúveis, teve seu pH e densidade determinada e foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos.

Além disso foi determinado o teor de água e concentração de lignina solúvel no meio.

O teor de água no hidrolisado foi determinada pelo método de Karl Fischer, e a concentração dos compostos fenólicos advindos da lignina por espectrofotometria no UV-Visível, segundo metodologia descrita por (Sluiter et al., 2016).

#### 4.1.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Para a remoção dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos e produtos de degradação liberados na fase líquida durante o processo de pré-tratamento empregou-se o processo de destoxificação previamente otimizado por (Roque et al., 2019).

O processo de destoxificação consiste em uma etapa de evaporação seguido de extração líquido-líquido empregando-se solventes orgânicos. A extração foi realizada utilizando-se três estágios sequenciais.

##### 4.1.2.1 Evaporação

O hidrolisado hemicelulósico (pH 1,67- pH do final da etapa de pré-tratamento) foi concentrado em um rotaevaporar (IKA, HB 10 control, Staufen, Germany) com 470 mbar (80 °C), acordo com metodologia otimizada por (Roque et al., 2019).

A composição do hidrolisado antes de evaporar (corrente de entrada) e hidrolisado após evaporação (corrente de saída) foram quantificadas. A composição do destilado (corrente de saída) foi obtida por diferença. Foram determinados o balanço de massa do processo de evaporação e a eficiência de evaporação.

##### 4.1.2.2 Extração líquido-líquido em Três Estágios

As extrações líquido-líquido foram realizadas separadamente empregando-se 14 distintos solventes para a remoção dos compostos inibitórios fermentativos, sendo realizada em três estágios. Os solventes foram classificados por cores de acordo com o grupo funcional, e ordenados, dentro de cada classe, em ordem crescente de massa molar, conforme apresentado na **Tabela 8**. O padrão de classificação será empregado em todas as tabelas e figuras do trabalho.

O ANEXO C apresenta as estruturas químicas e os respectivos pontos de ebulição dos solventes empregados no processo de extração líquido-líquido.

**Tabela 8.** Identificação dos solventes empregado no processo de extração líquido-líquido e das respectivas purezas, marcas e massas molares.

<b>Grupo funcional dos solventes</b>	<b>Solventes</b>	<b>Massa molar (g/mol)</b>	<b>Pureza/ Marca</b>
Álcool	Butanol	74	Merck, ≥ 99,5 %
	Álcool isoamílico	88	Vetec, ≥ 98,5 %
	2-Etil hexanol	130	Sigma Aldrich, ≥ 99,6 %
	1- Decanol	158	Sigma Aldrich, ≥ 98,0 %
Éster	Acetato de butila	116	Sigma Aldrich, ≥ 99,5 %
	Acetato de isobutila	116	Merck, ≥ 98,0 %
	Acetato de isoamila	130	Merck, ≥ 99,0 %
	Propionato de isoamila	144	Sigma Aldrich, ≥ 98,0 %
	Acetato de heptila	158	Sigma Aldrich, ≥ 98,0 %
Cetona	Metil isobutil cetona (MIBK)	100	Vetec, ≥ 98,5 %
	Diisobutil cetona (DIBK)	142	Rhodia Solvay, ≥ 95,0 %
<i>Biodiesel</i>	Biodiesel de óleo de mamona*	555	-
	Biodiesel de óleo de coco*	927	-
<i>Éter</i>	Metil tert-butil éter (MTBE)	88	Sigma Aldrich, ≥ 99,8 %

\*as amostras de biodiesel foram gentilmente doadas pela Prof. Dra. Maria Regina Wolf Maciel, FEQ/Unicamp (Silva et al., 2006, 2013).

No primeiro estágio, para cada solvente, foram utilizados dois frascos erlenmeyers de 250 mL com tampa sendo adicionado, por meio de uma balança analítica (Mettler Toledo PB3001-L) com precisão de uma casa decimal, 105 g de hidrolisado, 35 g do solvente em cada um dos frascos erlenmeyers. Após a adição, os recipientes foram levados para agitação em um shaker (New Brunswick, modelo EXCELLA E24) por um período de 4 h, a 120 rpm e 25°C.

Após este período, o material foi vertido em um funil de separação de 250 mL e mantido em repouso para separação das fases. Após o período necessário, as fases foram transferidas para um frasco previamente pesado e tiveram suas massas finais (frasco + fase orgânica ou aquosa) determinadas. A fase aquosa foi novamente utilizada para a segunda etapa de extração (segundo estágio), adicionando a este material, 35 g de solvente. O mesmo procedimento, realizado para o primeiro estágio, foi repetido. Um terceiro estágio foi realizado seguindo o mesmo procedimento.

Os ensaios foram realizados em duplicata, para cada um dos solventes, com exceção dos biodieseis. Ao final do último estágio, as amostras da fase aquosa foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de UV-visível. Amostras da fase aquosa e orgânica também tiveram suas densidades e teores de água determinados.

A eficiência de extração dos compostos foi calculada conforme equação 1:

$$\text{Eficiência de extração (\%)} = \left( \frac{m_{\text{in}} - m_{\text{out}}}{m_{\text{in}}} \right) * 100 \quad (1)$$

Onde  $m_{\text{in}}$  é massa do analito antes da extração;  $m_{\text{out}}$  é a massa do analito após extração.

Os balanços de massa dos processos de extração líquido-líquido, eficiência de extração e coeficiente de distribuição foram calculados utilizando os dados obtidos.

#### **4.1.3 Determinação da solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico**

A solubilidade dos 14 solventes utilizados no processo de ELL no hidrolisado hemicelulósico foi determinada utilizando-se uma célula de equilíbrio contendo uma determinada massa de hidrolisado hemicelulósico (aproximadamente 10 g). Uma barra de agitação magnética foi inserida dentro da célula de equilíbrio sendo a mesma vedada com septo de borracha. A célula foi conectada a um banho termostatizado (Tecnal TE-184), sendo a temperatura mantida a 25°C. Após ser conectada ao banho, a célula foi colocada sobre o agitador magnético (Fisatom, modelo 752A), e mantida sob agitação constante.

O solvente foi inserido em uma seringa “brau injekt”, de 5 mL, com agulha hipodérmica de aço inox 50 x 1,2mm. As bolhas de ar da seringa foram retiradas e o sistema foi pesado. O solvente foi adicionado a célula, gota a gota, até que a mistura homogênea se tornasse heterogênea. Atingido o ponto de máxima solubilidade, a seringa com o solvente foi retirada do septo e pesada novamente, para a determinação da massa utilizada. Além disso, com o auxílio de uma outra seringa foi coletada uma amostra da mistura para que a densidade fosse determinada, considerando a mesma temperatura do banho, 25°C. As análises foram realizadas em triplicata, para cada solvente.

## **4.2 Resultados**

### **4.2.1 Concentração do hidrolisado hemicelulósico**

O hidrolisado hemicelulósico utilizado no processo de destoxificação é proveniente do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana, o qual proporciona a remoção preferencial da fração hemicelulósica além da presença de compostos inibitórios como ácido acético, furfural, HMF e ácido fórmico para a fração líquida.

O maior desafio da tecnologia de etanol de segunda geração (2G) é o pleno aproveitamento dos carboidratos presentes na parede celular da biomassa e apesar da presença

de unidades comerciais em operação, como a Raízen e a Granbio, essa tecnologia promissora ainda se encontra no estágio inicial da curva de aprendizagem (Junqueira et al., 2017).

Apesar do extenso estudo em processos para redução da recalcitrância de biomassas vegetais, a extensa maioria reporta baixo teor de sólidos na mistura reacional, resultando então em baixas concentrações de açúcares no hidrolisado e conseqüentemente aumento na demanda de vapor para a prévia concentração para a etapa subsequente de fermentação (Rocha et al., 2015).

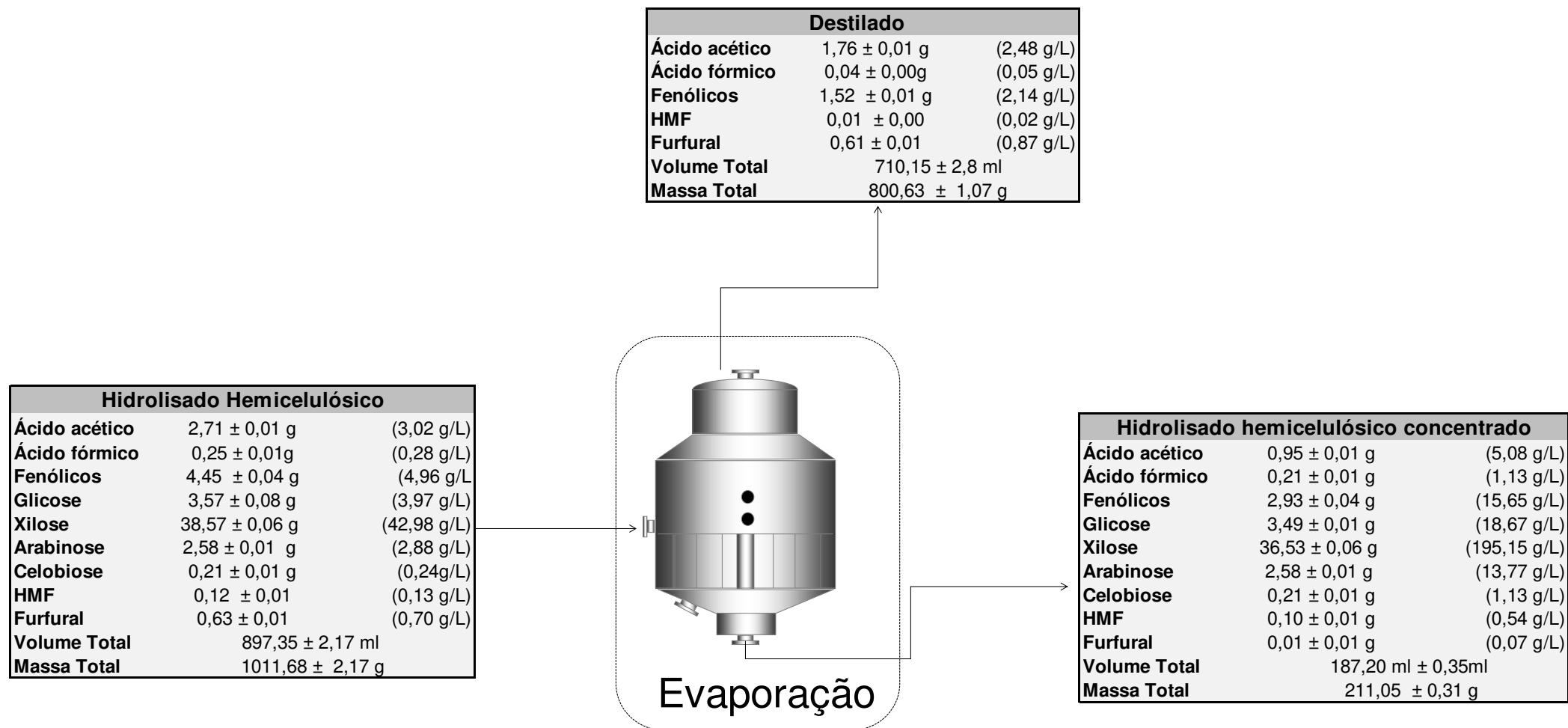
O aumento do teor de sólidos dentro do reator de pré-tratamento, como em reatores contínuos por exemplo, auxilia no aumento da concentração de açúcares e também diminui o investimentos de capital e de operação de uma unidade de etanol de segunda geração (E2G) (Junqueira et al., 2017).

Com base nesse preceito, uma etapa de concentração foi realizada previamente ao processo de destoxificação, visando a remoção prévia de inibidores voláteis e obtenção de concentrações de carboidratos adequadas a etapa fermentativa, buscando uma maior adequação aos processos industriais de E2G.

O processo de evaporação do hidrolisado hemicelulósico foi previamente otimizado por (Roque et al., 2019) no qual tem-se que a evaporação do hidrolisado hemicelulósico em pH 1,7 (pH final da etapa de pré-tratamento) e que proporciona maior eficiência na remoção de inibidores em relação ao pH 3 ou 5. O balanço de massa do processo de evaporação na condição otimizada pH 1,7 é reportado na **Figura 21**.



**Figura 21.** Balanço de massa do processo de concentração do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar.



De acordo com os dados da **Figura 21** tem-se que o processo de evaporação resultou na remoção de  $16,0 \pm 0,8\%$  de ácido fórmico,  $65,0 \pm 1,0\%$  de ácido acético,  $13,0 \pm 0,5\%$  de HMF,  $98,0 \pm 0,9\%$  do furfural e  $34,0 \pm 0,77\%$  do teor de compostos fenólicos inicialmente presentes no hidrolisado.

Larsson et al., (1999), observaram a remoção de 90% de furfural e 4% de HMF na evaporação a vácuo de hidrolisado de madeira, enquanto Rodrigues et al., (2001), reportaram que o furfural e HMF foram majoritariamente removidos do hidrolisado hemicelulósico após evaporação em distintos valores de pH's (0,92; 4,76 e 9,5).

Após a etapa de concentração, o hidrolisado de trabalho apresentou um total de açúcares de aproximadamente 230 g/L, com uma proporção de 11:1 de xilose e glicose e um pH final de 1,7.

#### **4.2.2 Extração líquido-líquido**

O processo de evaporação permite a remoção de alguns compostos voláteis como ácido acético, furfural e vanilina do hidrolisado hemicelulósico. Entretanto, retém compostos com alta toxicidade como extrativos e fragmentos aromáticos derivados de lignina (Chandel et al., 2011). O processo de destoxificação empregando extração líquido-líquido é estratégico para remoção seletiva dos inibidores, sem redução do teor de carboidratos. Ademais, apresenta a possibilidade de recuperação e reutilização do solvente, com uma simples etapa de evaporação.

Os valores de solubilidade dos solventes orgânicos no hidrolisado hemicelulósico evaporado foram determinados através da densidade da mistura no ponto de máxima solubilidade. A **Tabela 9** apresenta os dados obtidos.

**Tabela 9.** Solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico evaporado, empregados na etapa de destoxificação por extração líquido-líquido.

Solventes	Solubilidade [ $\text{g}_{\text{solv}}/\text{L}_{\text{sol}}$ ]
Butanol	$37,91 \pm 0,58$
Álcool isoamílico	$11,68 \pm 0,61$
2 Etil hexanol	$0,88 \pm 0,06$
1-decanol	$0,74 \pm 0,02$
Acetato de butila	$2,61 \pm 0,10$
Acetato de isobutila	$3,54 \pm 0,22$
Acetato de isoamila	$1,80 \pm 0,02$
Propionato de isoamila	$0,93 \pm 0,05$
Acetato de heptila	$1,05 \pm 0,08$
MIBK	$0,93 \pm 0,08$
DIBK	$0,76 \pm 0,08$
Biodiesel de óleo de mamona	$1,00 \pm 0,05$
Biodiesel de óleo de coco	$1,05 \pm 0,07$
MTBE	$19,17 \pm 0,19$

Entre os álcoois utilizados na etapa de extração, o butanol e o álcool isoamílico apresentaram as maiores solubilidades no hidrolisado, com valores de  $37,91 \pm 0,58$  g/L e  $11,68 \pm 0,61$  respectivamente, conforme reportado na **Tabela 9**.

Apesar da solubilidade, o álcool isoamílico se mostra como um solvente promissor para aplicação em processos de destoxificação, pois apresenta baixa toxicidade ao microrganismo fermentativo empregado neste trabalho (dados que poderão ser observados no capítulo 5 de fermentação), além do seu potencial de integração com as usinas de etanol de primeira geração (E1G). Durante a etapa de destilação do vinho, para a obtenção do etanol, um dos subprodutos do processamento é o óleo fúsel, o qual possui 38 % de álcool isoamílico em sua composição. Sendo assim, para cada 1000 L de etanol hidratado produzidos, aproximadamente, 2,5 L de óleo fúsel são produzidos e conseqüentemente 0,95 mL de álcool isoamílico poderiam ser obtidos para aplicação no processo de extração (rendimentos teóricos).

Assim como os álcoois de cadeia longa (1-decanol e 1-hexanol), as cetonas (MIBK e DIBK), apresentam solubilidade inferior a 1 g/L

O único éter entre os solventes avaliados, MTBE, apresentou a segunda maior solubilidade no meio com 19,17 g/L. Os ésteres encontram-se em uma faixa de solubilidade intermediária (1 a 3 g/L), tendo o acetato de isobutila como o mais solúvel (3,54 g/L) e o propionato de isoamila como o menos solúvel no hidrolisado (0,93 g/L).

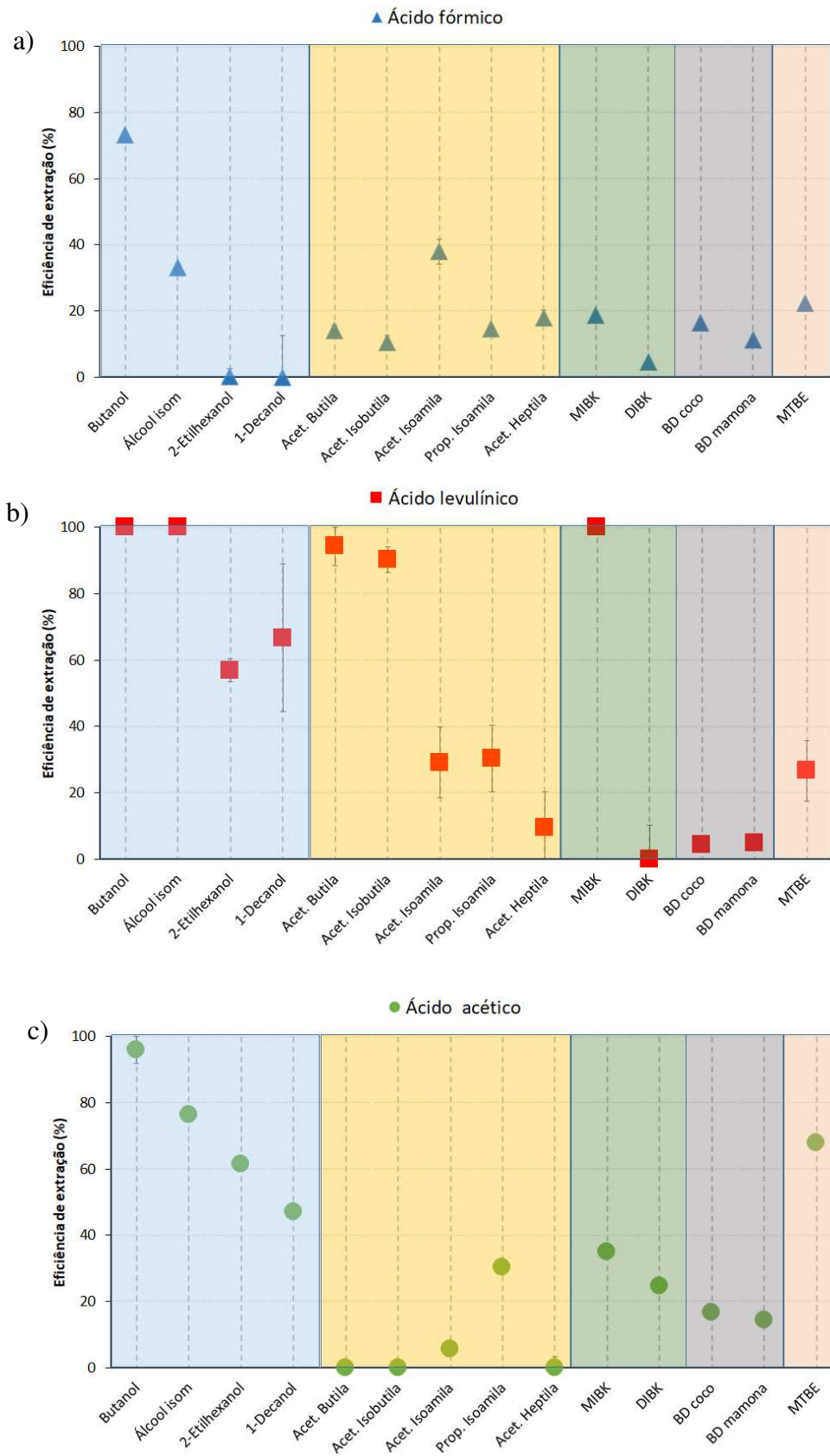
A maioria dos solventes apresentaram solubilidade no hidrolisado hemicelulósico próximo de 1 g/L.

A avaliação da solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico é importante para o processo de extração líquido-líquido. O processo consiste na transferência de um soluto de um solvente para outro e a alta solubilidade do solvente extratante pode resultar em perdas do composto de interesse, do próprio solvente e custos adicionais na sua recuperação e reutilização no processo (e.g solventes com baixa solubilidade resultam em maior taxa de recuperação do solvente e menor necessidade de complementação do volume de extração em um novo ciclo). Além disso, solventes com alta solubilidade no hidrolisado, como é o caso do butanol, podem impactar negativamente no processo fermentativo, etapa subsequente ao processo de destoxificação, devido a maior concentração de solvente residual no hidrolisado.

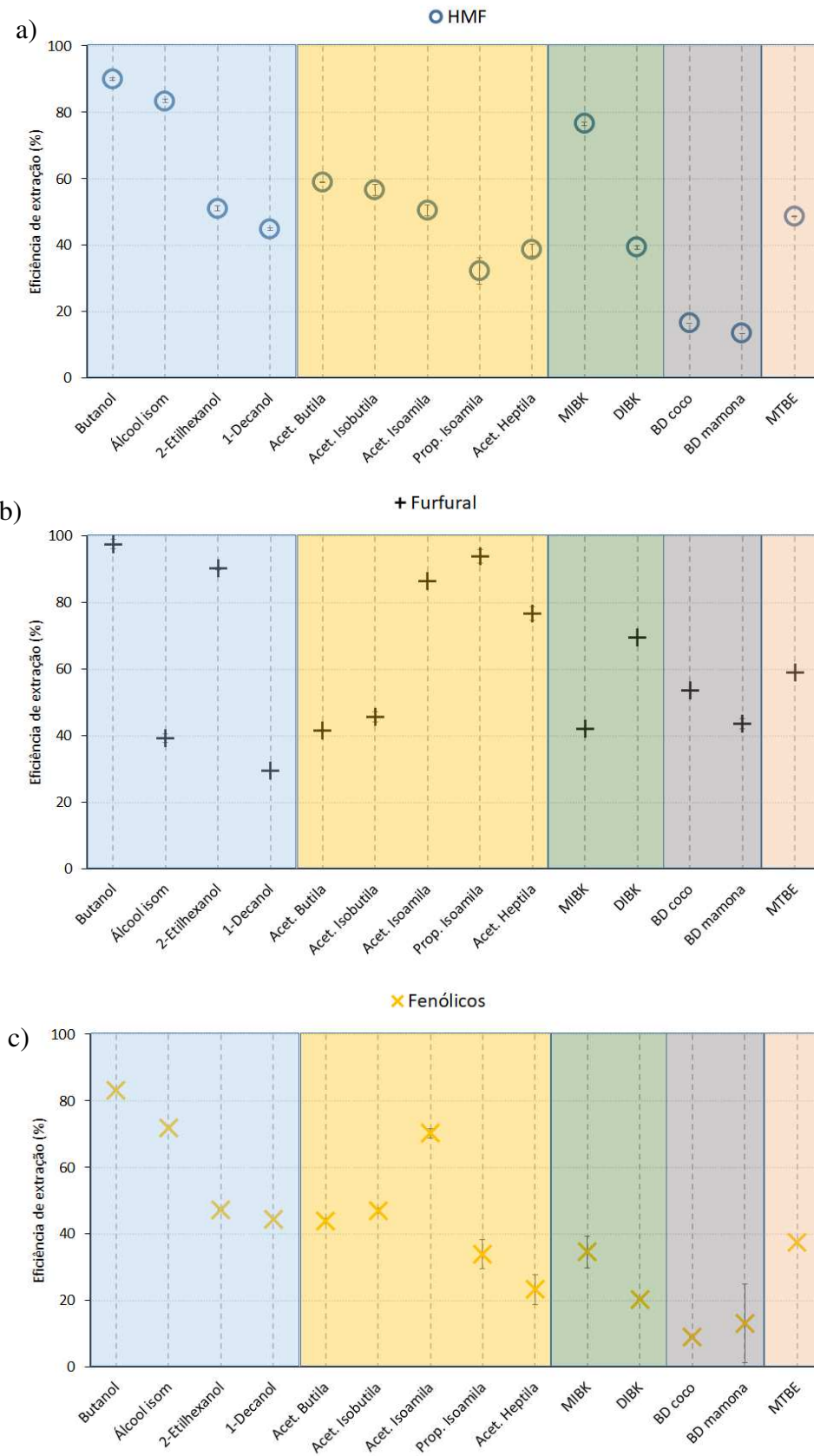
Entretanto, para solventes orgânicos com maior miscibilidade em água tem-se a possibilidade da adição de uma solução concentrada de sal. A adição do sal resulta na diminuição da solubilidade do composto a ser extraído na fase aquosa, com a migração para a fase orgânica (efeito *salting out*) (Lan et al., 2019).

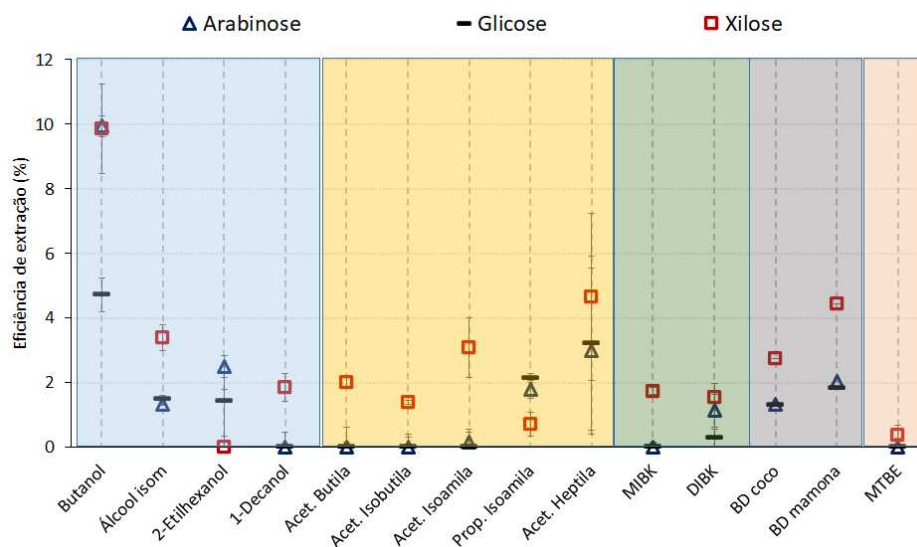
As Figuras **22**, **23** e **24** apresentam a eficiência global de extração dos ácidos orgânicos, furânicos, fenólicos e carboidratos presentes no hidrolisado hemicelulósico, considerando os quatorze solventes avaliados no estudo.

**Figura 22.** Eficiência de extração líquido-líquido para os ácidos orgânicos: a) ácido fórmico, b) ácido levulínico e c) ácido acético.



**Figura 23.** Eficiência de extração líquido-líquido para os furanos e fenólicos: a) HMF, b) furfural e c) fenólicos.



**Figura 24.** Eficiência de extração líquido-líquido para carboidratos.

Analisando a **Figura 22-a** é possível observar, de modo geral, que os álcoois apresentaram maior eficiência na extração dos ácidos orgânicos. Para o ácido fórmico, a maior eficiência de extração de ácido fórmico foi observada para o butanol, com  $73,3 \pm 0,6\%$ , seguido do acetato de isoamila, com  $37,9 \pm 3,6\%$ . Um decréscimo da eficiência de extração de ácido fórmico é observado com o aumento da massa molar do álcool empregado no processo de extração líquido-líquido. Comportamento este, não observado para as demais classes de solventes.

De acordo com a literatura, a remoção de ácido fórmico do hidrolisado não é um processo trivial (Brouwer et al., 2017). Silva et al., (2020) observaram por meio de simulações que o ácido fórmico apresentou maior afinidade pela fase aquosa em relação aos solventes acetato de butila, hexano e 2-metiltetraidrofurano (coeficientes de partição calculados menores que 1 para todos os extratantes).

Para o ácido levulínico (**Figura 22-b**), os álcoois butanol e álcool isoamílico e a cetona MIBK extraíram totalmente a concentração inicialmente presente no hidrolisado. Os ésteres acetato de butila e acetato de isobutila também apresentaram altas eficiências de extração com  $94,2 \pm 5,8 \%$  e  $90,2 \pm 3,9 \%$ , respectivamente. Uma tendência de decréscimo nas eficiências de extração foi observada para os álcoois, ésteres e cetonas, com o aumento da massa molar dos solventes extratantes utilizados.

Para o ácido acético (**Figura 22-c**), destaca-se as maiores eficiências de extrações para butanol ( $95,9 \pm 4,1 \%$ ), álcool isoamílico ( $76,4 \pm 1,4 \%$ ) e MIBK ( $34,9 \pm 0,2 \%$ ). O aumento de massa molar também apresentou impacto negativo na extração do ácido acético

pelos álcoois avaliados neste trabalho. Em contrapartida, para o esteress, foi observado um aumento nas eficiências de extração com aumento da massa molar. Para as cetonas e os biodieseis avaliados, foram observados leves decréscimos nas eficiências de extração com aumento da massa molar.

Devido ao baixo pH do hidrolisado hemicelulósico (pH ~1,7) foi observada a hidrólise de alguns acetatos, com a formação do álcool e ácido correspondentes. Os valores de ácido acético não foram considerados para a determinação das eficiências de extração para os solventes acetato de butila, isobutila e heptila.

Em termos de eficiência de extração dos furanos (**Figura 23-a, b**), destaca-se o butanol ( $90,1 \pm 0,4 \%$ ), álcool isoamílico ( $83,4 \pm 0,5 \%$ ) e o MIBK ( $76,5 \pm 0,5 \%$ ) para o HMF e os solventes butanol ( $97,6 \pm 0,1 \%$ ), 2-etilhexanol ( $90,2 \pm 2,0 \%$ ), acetato de isoamila ( $86,5 \pm 1,5 \%$ ), e propionato de isoamila ( $94,0 \pm 2,0 \%$ ), para furfural. Em geral para o HMF, observa-se que a eficiência de extração é inversamente proporcional a massa molar do extratante.

Os fenólicos, representados por fragmentos aromáticos de lignina e possivelmente de extrativos da biomassa (**Figura 23-c**), tiveram melhor eficiência de extração com os solventes butanol, álcool isoamílico e acetato de isoamila, com percentuais na faixa de 75-85%. Em geral, assim como o observado para o HMF, a eficiência de extração apresenta relação inversamente proporcional com o aumento de massa molar do solvente extratante (exceto para o acetato de isoamila).

Os biodieseis de óleo de coco e de óleo de mamona foram os que apresentaram os menores desempenhos em termos de extração dos inibidores, possivelmente devido ao tamanho da cadeia carbônica.

Mateo et al., (2013), realizaram a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico obtido do pré-tratamento de poda de oliveira empregando-se clorofórmio, hexano e acetato de etila e verificaram que o acetato de etila foi o solvente com maior eficiência removendo 94% de furfural, 40% 5-HMF e 49% de compostos fenólicos de baixa massa molar.

Uma das vantagens do processo de extração líquido-líquido frente a outros processos de destoxificação é a conservação dos carboidratos presentes no hidrolisado. Pode-se observar (**Figura 24**) que as eficiências de extrações de carboidratos foram na faixa de 0 – 9,9 g/L para arabinose; 0- 4,7 g/L para glicose e 0- 9,8 g/L para glicose. O butanol apresentou as maiores eficiências de extração com  $9,9 \pm 0,3 \%$  para arabinose,  $9,8 \pm 1,4 \%$  para xilose e  $4,7 \pm 0,5 \%$  para glicose.

Considerando os percentuais de perda de carboidratos comumente apresentados na literatura, referente ao processo de destoxificação *overliming* (uso de ácido fosfórico e



hidróxido de cálcio para arraste de compostos) (aproximadamente 20 %) esse percentual não é considerado significativo (Zhang et al., 2018).

A extração de inibidores empregando n-butanol e acetato de etila reportam decréscimos significativos na concentração de inibidores fermentativos, entretanto a miscibilidade na fase aquosa resulta em desafios de separação como formação e emulsão e floculação, tornando a ampliação de escala um desafio adicional (Tesfaw and Assefa, 2014).

Zhu et al., (2011), reportaram a remoção de 73,3% de ácido acético do hidrolisado de palha de milho empregando triálquilamina como extratante.

A literatura reporta que o uso de membranas extratoras para remoção de inibidores podem apresentar desempenhos superiores em relação a extração por solventes, entretanto a possibilidade de reutilização do solvente torna o processo com maior potencial de aplicação para escalas industriais (Tesfaw and Assefa, 2014).

O processo de extração líquido-líquido apresentou perdas não significativas e intrínsecas a operação unitária, com balanços de massa com rendimentos superiores a 99%. O ANEXO D apresenta a média dos rendimentos de extrações e as tabelas com os balanços de massa da extração do hidrolisado hemicelulósico com todos os solventes empregados na etapa de destoxificação.

### 4.3 Conclusões parciais

O hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído do bagaço de cana-de-açúcar, foi submetido a um processo de destoxificação envolvendo sua concentração, visando a remoção prévia de inibidores voláteis e obtenção de concentrações de carboidratos adequadas a etapa fermentativa, e uma etapa de extração líquido-líquido empregando 14 distintos solventes.

A concentração, realizada sob condição otimizada a pH 1,67, resultou na remoção de  $16 \pm 0,8$  % de ácido fórmico,  $65 \pm 1,0$ % de ácido acético,  $13 \pm 0,5$ % de HMF,  $98 \pm 0,9$ % do furfural e  $34 \pm 0,77$ % do teor de fenólicos inicialmente presentes no hidrolisado, não ocasionando arrastes expressivos de carboidratos para o destilado.

A eficiência de extração dos inibidores fermentativos e a solubilidade no hidrolisado hemicelulósico foram avaliadas.

Dentre os álcoois utilizados na etapa de extração, o butanol e o álcool isoamílico apesar de apresentarem altas eficiências de extração (com remoção de  $97,57 \pm 0,02$ % de furfural,  $90,06 \pm 0,35$ % de HMF,  $95,94 \pm 4,06$ % de ácido acético e  $83,21 \pm 0,76$ % dos

compostos fenólicos para o butanol e  $76,37 \pm 1,43\%$  de ácido acético;  $83,40 \pm 0,55\%$  HMF e  $72,02 \pm 0,31\%$  de compostos fenólicos para o álcool isoamílico), apresentaram as maiores solubilidades no hidrolisado, com valores de  $37,91 \pm 0,58$  e  $11,68 \pm 0,61$  g/L, respectivamente.

Os álcoois de cadeia longa (1-decanol e 1-hexanol), as cetonas (MIBK e DIBK), apresentam solubilidade inferior a 1 g/L, com destaque para o MIBK com remoção de  $34,9 \pm 0,2\%$  de ácido acético e  $100 \pm 0,1\%$  de ácido levulínico e para o 1-decanol que resultou na remoção de  $46,9 \pm 0,1\%$  de ácido acético.

O único éter entre os solventes avaliados, MTBE, apresentou a segunda maior solubilidade no meio com 19,2 g/L, e o terceiro maior rendimento de extração de ácido acético com  $67,8 \pm 0,1\%$  e para os acetatos empregados na etapa de destoxificação tem-se que apesar dos altos rendimentos de extração, com  $58,9 \pm 0,2\%$  de extração de HMF para o acetato de butila, a presença de pH baixos no hidrolisado resultou na hidrólise do acetato com a formação dos álcoois e ácidos correspondentes.

## **CAPÍTULO 5 - Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados**

A xilose, açúcar de cinco carbonos proveniente da fração hemicelulósica, é o segundo carboidrato de maior abundância nos materiais lignocelulósicos e representa uma significativa parcela de matéria-prima que pode ser convertida à combustíveis e bioprodutos. Apesar de esforços na adaptação e desenvolvimentos de leveduras geneticamente modificadas, a presença de inibidores oriundos da etapa de pré-tratamento no meio fermentativo ainda é um grande desafio tecnológico.

Uma variedade de fatores influencia na fermentação de pentoses, incluindo pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, teor inicial de açúcares redutores totais, concentração celular, dentre outros (Ferreira et al., 2011; Nakanishi et al., 2017; Santos et al., 2016). Com base nesse preceito, esse capítulo visa avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados previamente destoxificados pelo método de evaporação seguido de extração líquido-líquido. A extração dos inibidores por meio de solventes pode ser uma alternativa promissora para o aumento do rendimento fermentativo de pentoses, visto que este pode ser recuperado e retornado ao sistema. Além disso, paralelamente pode-se ter o emprego dos inibidores removidos em aplicações que viabilizem o gasto energético do sistema.

### **5.1 Materiais e Métodos**

#### **5.1.1 Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados em shaker**

Para a avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos foram utilizadas as leveduras *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907, ambas capazes de metabolizar pentoses. Salienta-se que as linhagens empregadas nesse projeto foram adquiridas do banco *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL), não pertencem ao patrimônio genético brasileiro e, portanto, não requerem o cadastro junto ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN).

##### **5.1.1.1 Propagação das células**

Os pré-inóculos foram realizados em meio YPX (Extrato de levedura – Peptona – Xilose), preparado conforme descrito no ANEXO E. Os meios foram preparados em frascos erlenmeyers de 250 mL. Três alçadas da cepa, previamente estriada em Agar YPX, foram

transferidas para o meio YPX que foi incubado em shaker (New Brunswick, modelo EXCELLA E24) por 24 h a 200 rpm e 30°C.

Após o período de 24 h, os inóculos foram propagados utilizando os meios descritos nas Tabelas E.2, para a *S. stipitis*, e E.3, para a *S. passalidarum*. Os inóculos foram preparados em frascos erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio. Os inóculos foram incubados por 24 h a 200 rpm e 30°C (Nakanishi et al., 2017).

Após o tempo de inóculo, todo o volume foi centrifugado de forma estéril a 8.000 rpm a 4°C, por 20 min em centrífuga (Eppendorf Centrifuge, 5810R) e as células foram ressuspendidas em 120 mL de água estéril (10% do volume final do reator). Os inóculos foram transferidos para biorreatores (New Brunswick BioFlo 115) de 3 L, sendo utilizado um volume de trabalho de 1,2 L. Nesta etapa do processo, o oxigênio dissolvido (% OD) foi mantido em 50% para evitar a limitação de oxigênio e garantir o crescimento da levedura. A fermentação ocorreu a 30°C, agitação e aeração iniciais de 150 rpm e 0,1 volume de ar/volume de meio, por minuto (vvm), respectivamente, sendo o sistema controlado para manter uma OD de 50%. A Tabela E.4 apresenta o meio de cultura para o crescimento da levedura no biorreator.

Após o consumo de toda fonte de carbono, monitorada em tempo real por infravermelho médio (MIR) e relação absorvância versus massa seca, a alimentação continua foi acionada, mantendo uma corrente de 3 g ART.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para manter o crescimento linear para ambas as leveduras (Santos et al., 2016). Neste instante também foram realizados um pulso de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mL) e outro de uréia (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O, 60 mL), a fim de se evitar a limitação destes nutrientes. A propagação teve uma duração total de 24 h, sendo de aproximadamente 16 h para a fase em batelada e cerca de 8 h para a fase de alimentação contínua.

### **5.1.1.2 Fermentação**

Para a etapa de fermentação batelada em shaker foram utilizados os hidrolisados hemicelulósicos destoxificados e não-destoxificados, além de um meio sintético de xilose contendo distintos percentuais dos solventes orgânicos. Os solventes orgânicos foram adicionados aos meios de xilose de acordo com as respectivas solubilidades determinadas experimentalmente no hidrolisado desde trabalho. Os hidrolisados destoxificados foram esterilizados a 111°C por 15 min, em autoclave (Phoenix).

Após esterilização, os hidrolisados foram centrifugados a 8.000 rpm (11,50 g) por 20 min em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5810R). Considerando a solubilização de cada um

dos solventes no meio, determinados através do teste de solubilidade descrito no item 3.4.3, concentrações de solventes foram adicionadas em um meio sintético de xilose comercial, sendo os mesmos submetidos ao processo de fermentação, empregando as duas leveduras. Estes testes foram realizados com o propósito de avaliar, isoladamente, a influência do resíduo de solvente no processo fermentativo.

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio, que foram incubados em shaker (New Brunswick, modelo EXCELLA E24) a 30°C, a 150 rpm e 72 h. Amostras de 3 mL foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h para realização de análises de massa seca e determinação da composição química do meio por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os ensaios foram realizados em triplicata. Os meios utilizados nas fermentações estão apresentados no (ANEXO E).

O rendimento em etanol (%), (Equação (2) baseado na conversão estequiométrica de xilose em etanol de 0,511 g/g, a produtividade volumétrica em etanol (g/L.h) (Equação(3) e a produtividade específica em etanol ( $g_{EtOH} g_{DCW}^{-1} h^{-1}$ ) foram calculados. Ambos os valores foram reportados para os tempos considerados ótimos na fermentação.

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{E_f - E_0}{S_0 - S_f} \times \frac{100}{0,511} \quad (2)$$

Sendo:  $E$ : concentração de etanol em g/L;  $S$ : concentração de açúcares em g/L. Os subíndices  $f$  e  $0$  se referem a final e inicial.

$$\text{Produtividade volumétrica (g.L.h}^{-1}\text{)} = \frac{E_f - E_0}{t_f} \quad (3)$$

Sendo:  $E$ : concentração de etanol em g/L;  $t$ : tempo de fermentação em horas. Os subíndices  $f$  e  $0$  se referem a final e inicial, respectivamente.

$$\text{Produtividade específica (g}_{EtOH} \cdot g_{DCW}^{-1} \cdot h^{-1}\text{)} = \frac{M_{EtOH} - M_{EtOH_i}}{M_X h} \quad (4)$$

Sendo:  $M_{EtOH_i}$  é a massa inicial de etanol e  $M_{EtOH}$  e  $M_X$  são as massas de etanol e de célula em um determinado tempo de experimento, respectivamente.

## 5.2 Resultados e Discussão

### 5.2.1 Biocompatibilidade dos solventes empregados na etapa de destoxificação para *S. passalidarum* e *S. stipitis*

A biocompatibilidade dos extratantes utilizados no processo de destoxificação é um parâmetro necessário ser avaliado, considerando o teor de solvente residual na fração aquosa após a etapa de extração líquido-líquido e a separação de fases (orgânica e aquosa). Com base nesse preceito, a proposta de um processo de destoxificação empregando extração líquido-líquido com solventes orgânicos deve englobar não somente uma eficiente retirada dos compostos potencialmente inibitórios, com baixa perda de carboidratos, como apresentar baixa solubilidade no hidrolisado e ser economicamente viável e permitir sistemas de ciclos de extratante.

A **Tabela 10** apresenta os valores de solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico obtidos experimentalmente por meio da densidade da mistura no ponto de máxima solubilidade, e as Figuras **25** e **26** apresentam a avaliação da fermentabilidade por *S. stipitis* e *S. passalidarum* para os meios preparados, acrescido dos teores de solvente orgânico de acordo percentual de solubilidade no hidrolisado hemicelulósico.

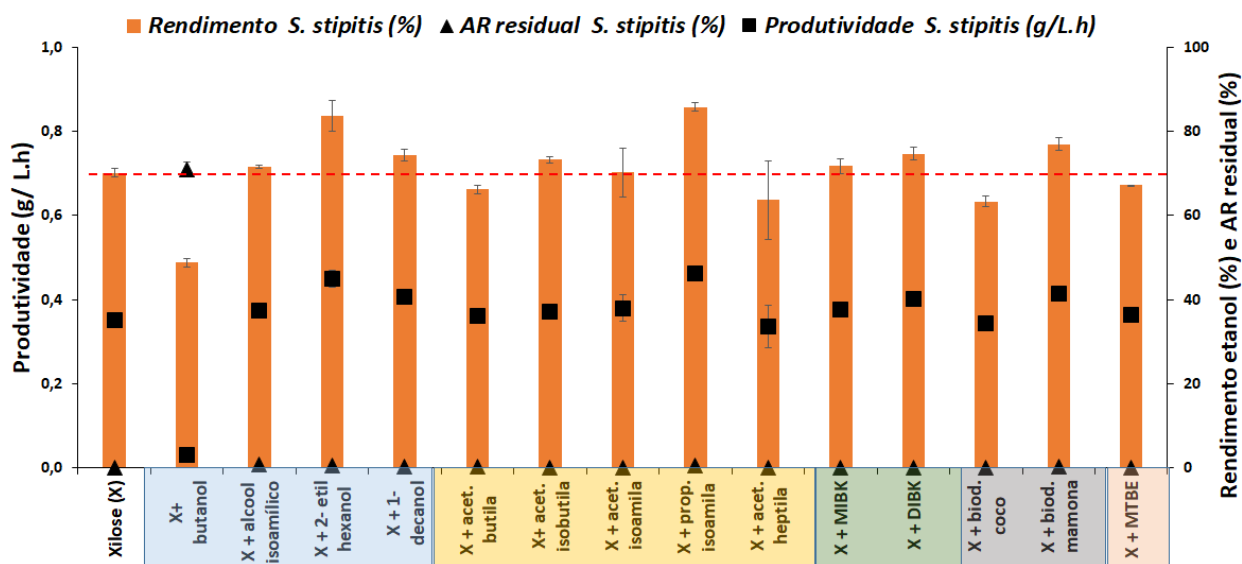
O tempo ótimo de fermentação para *S. stipitis* e *S. passalidarum* foram definidos como 48 h e 24 h respectivamente, com base nos valores máximos de rendimento e produtividade.

A avaliação da solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico é de fundamental importância, pois solventes com alta solubilidade, podem impactar negativamente no processo fermentativo.

**Tabela 10.** Propriedades físicas dos solventes investigados para a destoxificação.

Grupo funcional dos solventes	Solventes	Solubilidade* [g <sub>solv</sub> /L <sub>sol</sub> ]	Massa molar (g/mol)	Log P <sub>oct/água</sub> **
Álcool	Butanol	37,91 ± 0,58	74	0,88
	Álcool isoamílico	11,68 ± 0,61	88	1,02
	2-Etil hexanol	0,88 ± 0,06	130	2,20
	1- Decanol	0,74 ± 0,02	158	3,12
Éster	Acetato de butila	2,61 ± 0,10	116	1,35
	Acetato de isobutila	3,54 ± 0,22	116	1,21
	Acetato de isoamila	1,80 ± 0,02	130	1,60
	Propionato de isoamila	0,93 ± 0,05	144	1,99
	Acetato de heptila	1,05 ± 0,08	158	2,52
Cetona	Metil isobutil cetona (MIBK)	0,93 ± 0,08	100	1,31
	Diisobutil cetona (DIBK)	0,76 ± 0,08	142	2,65
Biodiesel	Biodiesel de óleo de mamona	1,00 ± 0,05	555	-
	Biodiesel de óleo de coco	1,05 ± 0,07	927	-
Éter	Metil tert-butil éter (MTBE)	19,17 ± 0,19	88	1,43

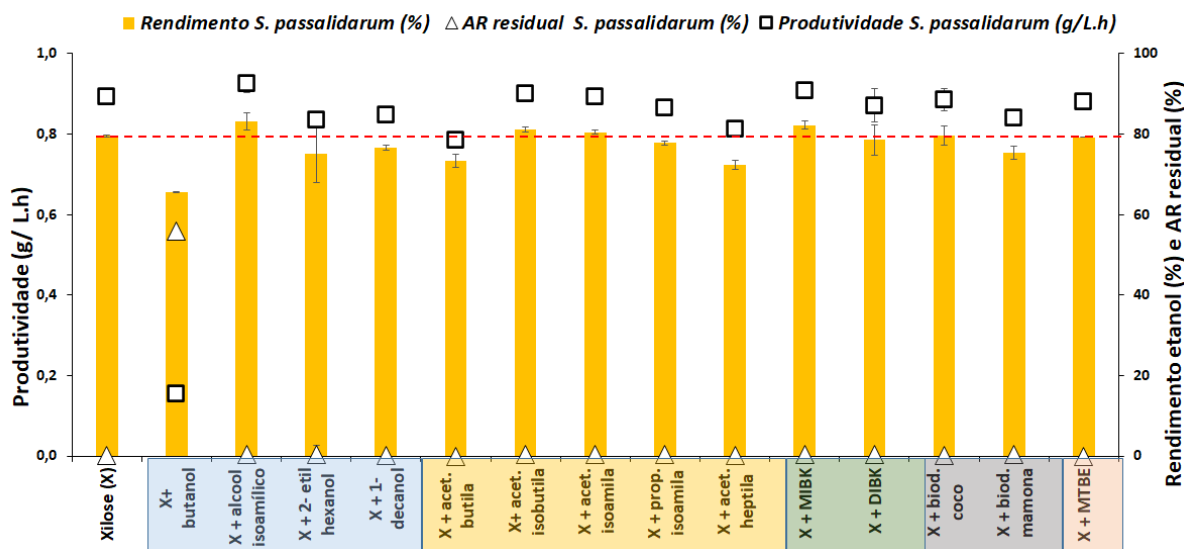
Fonte: Handbook of Chemistry and physics weast, 1972; \* Solubilidade dos solventes no hidrolisado hemicelulósico; \*\*Coeficiente de partição utilizando como referência a mistura octanol e água.

**Figura 25.** Valores de rendimento (%), AR residual (%) e produtividade volumétrica na fermentação utilizando *S. stipitis* de xilose e xilose acrescida de volumes de solvente orgânico

de acordo percentual de solubilidade no hidrolisado hemicelulósico (evaporado).

Fermentação em shaker com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio, que foram incubados em shaker a 30°C, a 150 rpm e 72 h, ~50g/L inicial de xilose, ~ 5g/L de células iniciais. Volume de solventes de acordo com percentual de solubilidade no hidrolisado concentrado. Rend e produtividade em 48h e ART em 72 h.

**Figura 26.** Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade em 24 h de fermentação utilizando *S. passalidarum* no meio preparado acrescido de teores de solvente orgânico de acordo percentual de solubilidade no hidrolisado hemicelulósico (evaporado).



Fermentação em shaker com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio, que foram incubados em shaker a 30°C, a 150 rpm e 72 h, ~50g/L inicial de xilose, ~5g/L de células iniciais. Volume de solventes de acordo com percentual de solubilidade no hidrolisado concentrado. Rend e produtividade em 24 h, ART em 72h.

De acordo com a **Tabela 10**, dentre os álcoois empregados no processo de destoxificação, destaca-se o butanol e o álcool isoamílico com elevadas solubilidades no hidrolisado hemicelulósico, com valores de 37,9 g/L e 11,68 g/L, respectivamente.

O butanol ocasionou inibição no crescimento celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*, de acordo com as Figuras 25 e 26, resultando em  $70,9 \pm 1,7$  % e  $56,0 \pm 2,3$  % de açúcares redutores residuais em 48 h de fermentação para *S. stipitis* e 24 h para *S. passalidarum* respectivamente.

A avaliação da fermentabilidade de xilose padrão por *S. stipitis* resulta em consumo de  $71,0 \pm 0,1$  % da xilose inicial em 24 h, enquanto a presença de butanol (no percentual de solubilidade) juntamente com a xilose resulta em consumo de somente  $13,2 \pm 0,7$  % da xilose inicial, nas mesmas 24 h. A presença do butanol correspondeu a um decréscimo em torno de  $90,0 \pm 1,5$  % na produtividade da fermentação.

O butanol também ocasionou inibição da *S. passalidarum* no processo fermentativo, entretanto com um menor decréscimo na produtividade correspondendo a  $70,0 \pm 0,1$  % ( $0,89 \pm 0,00$  g/L h para xilose padrão e  $0,16 \pm 0,01$  g/Lh para xilose acrescida de butanol).

Burk, (2010), reportou uma redução na faixa entre 85 a 53% na concentração de células de *E. coli* e *S. cerevisiae* respectivamente, ao variar concentrações acima de 2,5% (v/v)



de 2-butanona. Já os efeitos inibitórios dos isômeros do butanol em *S. cerevisiae* foram reportados em concentrações acima de 1,2% (v/v) (Ghiaci et al., 2013; González-Ramos et al., 2013).

Brink and Tramper, (1985), relataram que a toxicidade de solventes puros aumenta proporcionalmente ao decréscimo das massas molares. Sugere-se nessa teoria que moléculas pequenas apresentariam maior área de contato e conseqüentemente estariam em maior concentração ao redor da membrana celular em relação a moléculas maiores.

O álcool isoamílico, apesar de apresentar alta solubilidade no hidrolisado hemicelulósico ( $11,68 \pm 0,61$  g/L), não ocasionou uma inibição expressiva quanto o butanol, levando a um residual de açúcares de  $0,70 \pm 0,06\%$  e  $0,45 \pm 0,01\%$  para *S. stipitis* (48 h de fermentação) e *S. passalidarum* (24 h de fermentação), respectivamente.

O MTBE, apesar de apresentar alta solubilidade no meio (19,2 g/L), resultou no total consumo dos açúcares redutores para ambas as leveduras, apresentando um rendimento em etanol de  $67,3 \pm 0,04\%$  para 48 h de fermentação com a *S. stipitis* e  $79,2 \pm 0,56\%$  para 24 h com a *S. passalidarum*.

A levedura *S. passalidarum*, em geral, apresentou melhor tolerância aos solventes empregados na etapa de destoxificação em relação a *S. stipitis*, com reduções dentro da faixa de desvio do erro operacional (menores que 5%) em rendimento e produtividade para a maior parcela dos solventes empregados em relação a xilose padrão. A literatura reporta que a levedura *S. passalidarum* apresenta em geral melhor desempenho fermentativo que a *S. stipitis* (Nakanishi et al., 2017).

Segundo Zaldivar and Ingram, (1999), a inibição ocasionada por alguns solventes/compostos aos microrganismos pode estar correlacionada com a hidrofobicidade, pressupondo que apresentariam facilidade de permeação nas membranas microbianas, exibindo assim aumento de toxicidade.

O coeficiente de partição decresce à medida que o  $\log P_{\text{oct/água}}$  aumenta, como reportado previamente por Zautsen et al., (2009), e a partir desse valores pode-se inferir o grau de hidrofobicidade de um composto em solução.

Sendo assim o DIBK é o solvente que apresenta o comportamento mais hidrofóbico, visto que o  $\log P_{\text{oct/água}}$  é maior obtido em relação a todos os solventes, e o butanol e o álcool isoamílico como menos hidrofóbicos, apresentando os menores valores de  $\log P_{\text{oct/água}}$ , 0,78 e 1,02, respectivamente, corroborando com os resultados de inibição de crescimento celular observado para ambas as leveduras.

Para as fermentações de xilose acrescida de 2-etilhexanol e propionato de isoamila (**Figura 25**) observou-se rendimentos em etanol ( $83,6 \pm 3,6\%$  e  $85,8 \pm 1,0\%$  respectivamente) e produtividades volumétricas ( $0,45 \pm 0,02$  g/L.h e  $0,46 \pm 0,01$  g/L.h superiores aos observados para xilose ( $70,2 \pm 1,1\%$  e  $0,35 \pm 0,01$  g/L.h ). O fato de alguns microrganismos conseguirem metabolizar alguns solventes, aumenta a tolerância microbiana a esses inibidores e resulta em acréscimos de produtividades e rendimentos (Caspeta et al., 2015).

De acordo com Grazinoli-Garrido and Sola-Penna, (2004), a inativação do crescimento celular pode estar relacionada a ligação das moléculas de solvente a estrutura das enzimas presentes nos microrganismos. Tendo que a efetividade da inativação aumenta com a hidrofobicidade do solvente, pode-se inferir então que solventes com maior hidrofobicidade tenderiam a ter uma maior afinidade as enzimas que regulam o metabolismo celular em relação ao menos hidrofóbicos.

Com base nos solventes empregados no estudo e os resultados reportados, o butanol apresenta a menor biocompatibilidade para o processo de destoxificação e subsequente fermentação de hidrolisado hemicelulósico, considerando as duas leveduras empregadas no estudo.

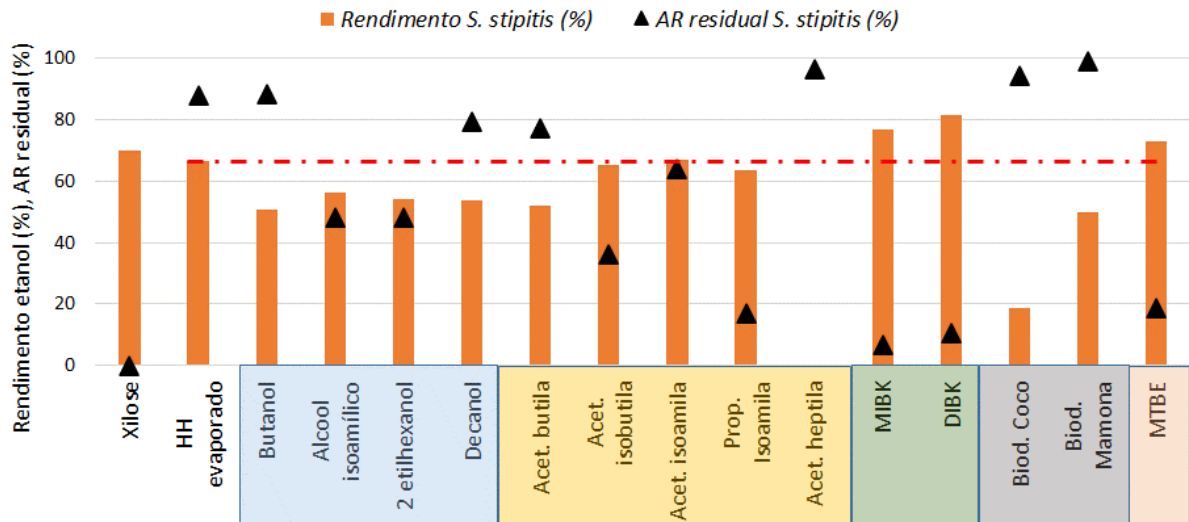
### **5.2.2 Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124**

O processo de destoxificação pelo método de evaporação seguido de extração líquido-líquido empregando-se os solventes descritos na **Tabela 10**, foi avaliado utilizando a levedura *S. stipitis*. A **Figura 27** apresenta os resultados de rendimento, produtividade volumétrica e açúcar residual do meio empregando o hidrolisado após evaporação e os hidrolisados após o processo de destoxificação. Ensaio utilizando a xilose também foram realizados.

A **Figura 28** apresenta o perfil de consumo de açúcar redutor total (glicose, xilose e arabinose) e produção de etanol, xilitol e biomassa por *S. stipitis*, para o hidrolisado hemicelulósico após evaporação, xilose (meio sintético) e os hidrolisados hemicelulósicos após destoxificação.

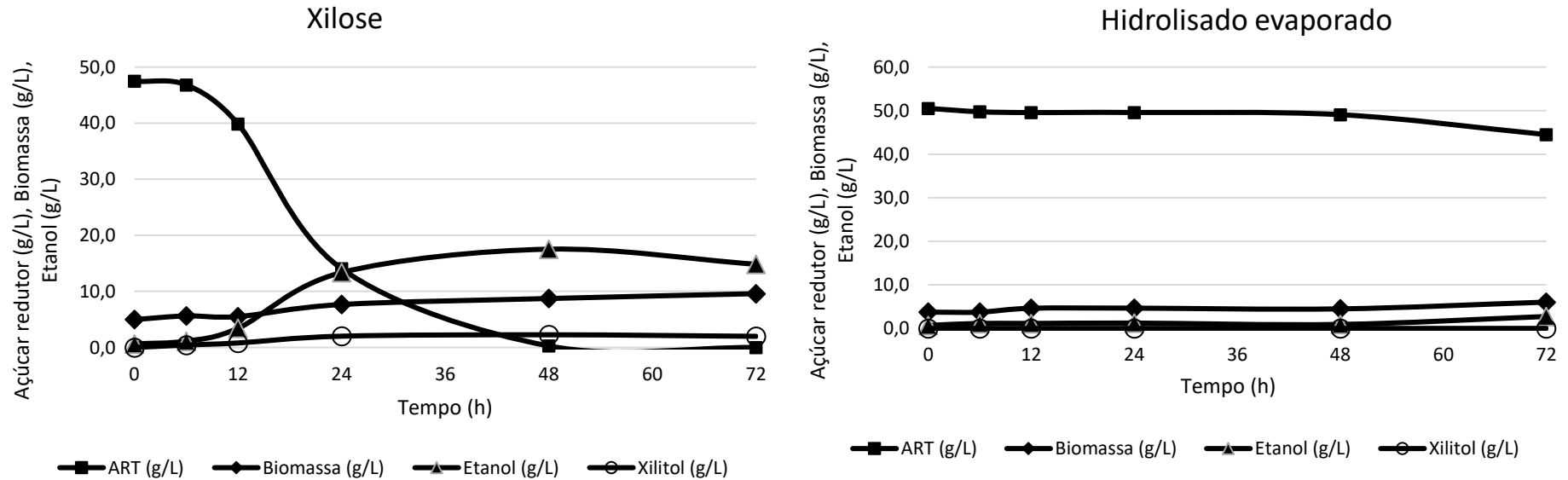
Os dados são reportados considerando 48 h de fermentação para xilose e 72 h de fermentação para o hidrolisado evaporado e hidrolisados destoxificados. As concentrações residuais dos principais inibidores presentes no ponto inicial da fermentação por *S. stipitis* e os valores de produtividade específica e volumétrica em etanol estão apresentadas no ANEXO F.

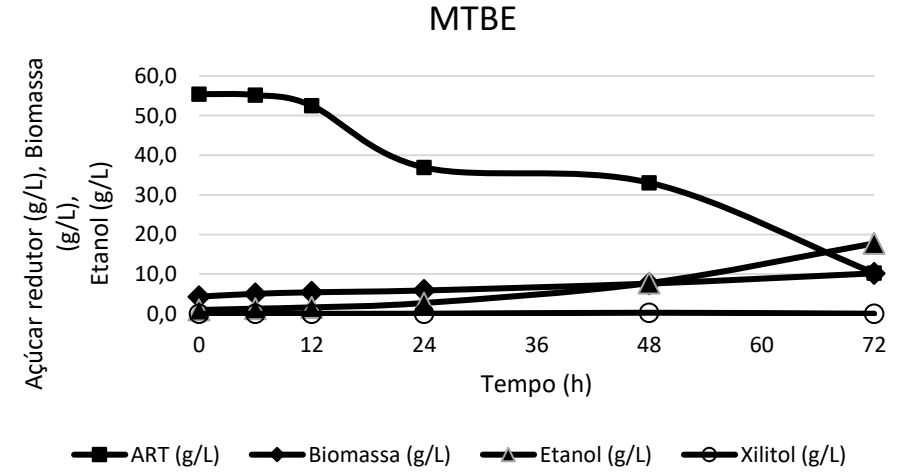
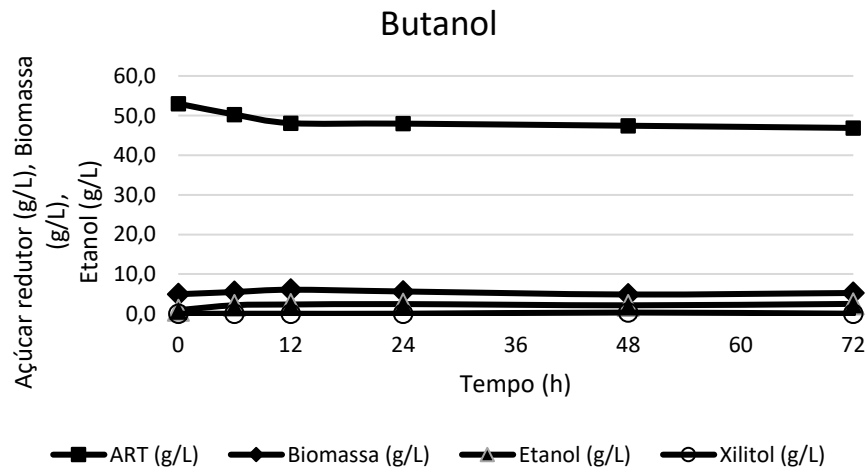
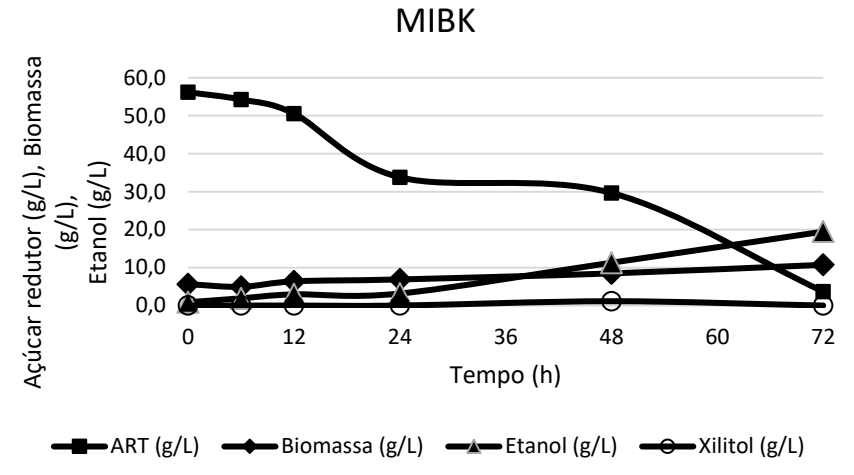
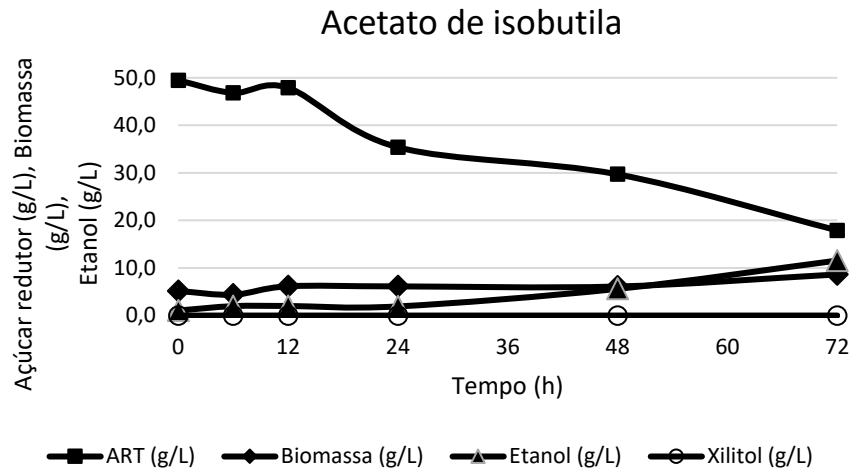
**Figura 27.** Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade em 48 h de fermentação por *S. stipitis* do meio preparado (xilose), e 72 h de fermentação para os hidrolisados evaporado e após processo de destoxificação.

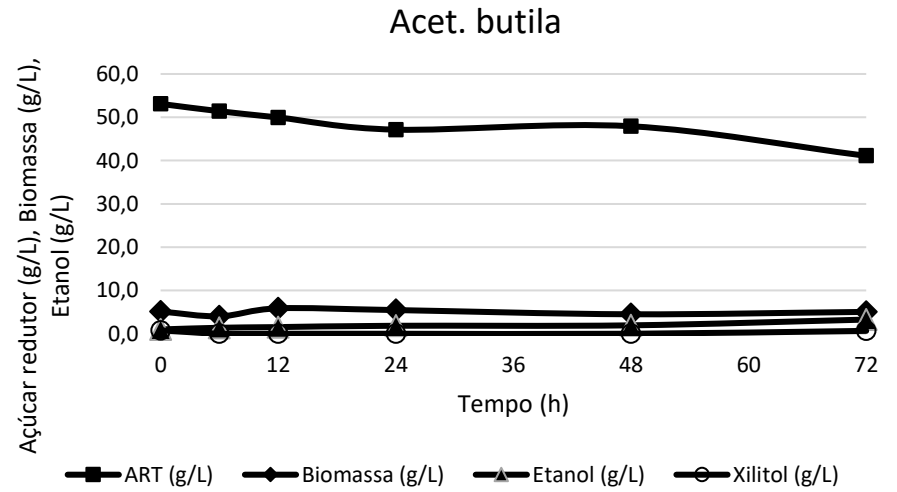
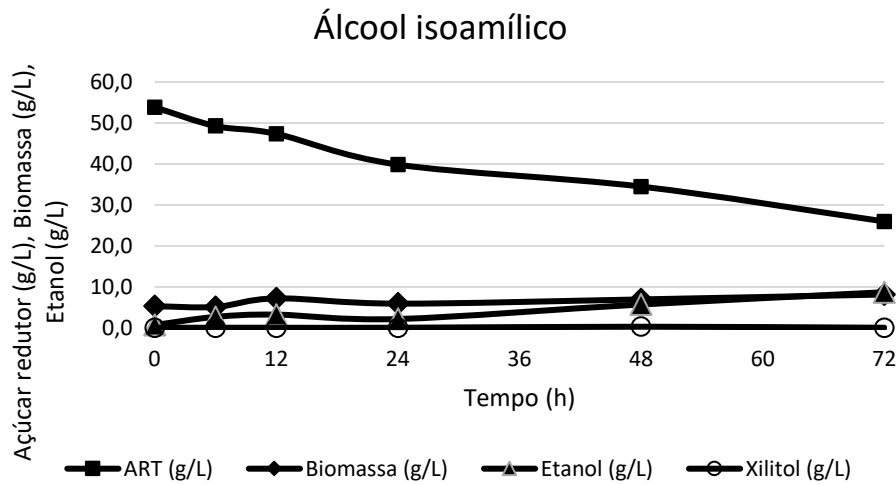
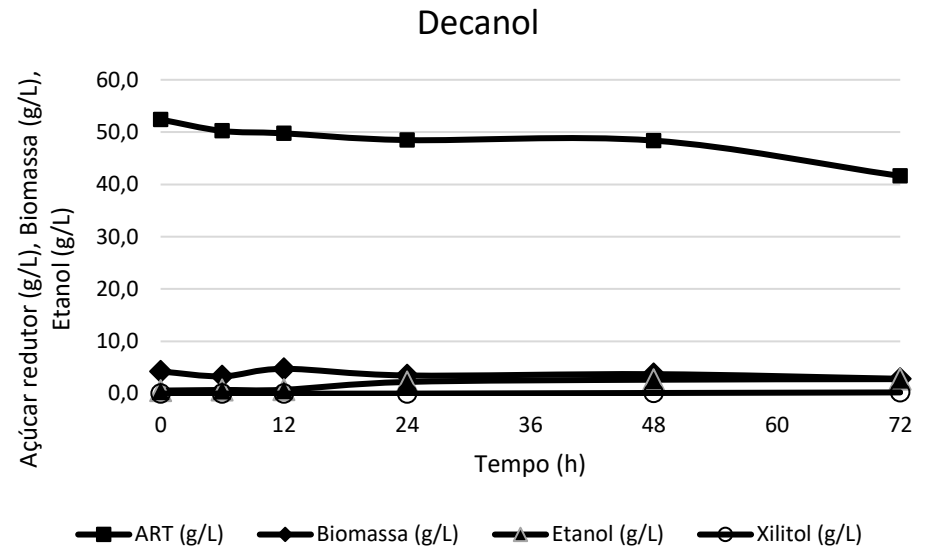
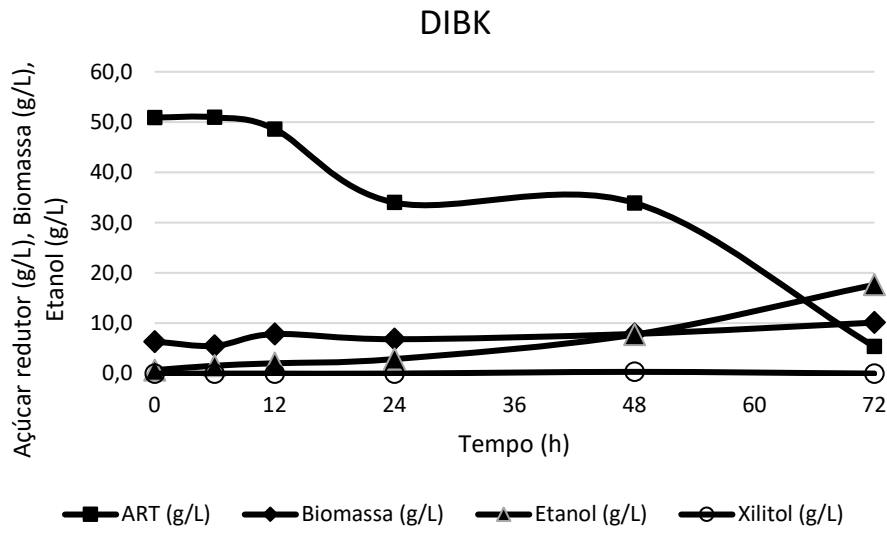


Fermentação em shaker com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio, que foram incubados em shaker a 30°C, a 150 rpm e 72 h, ~50g/L inicial de xilose, ~ 5g/L de células iniciais. Rend etanol (%): xilose (48 h); HHevap (72h), HH detox (72h), ART 72 h.

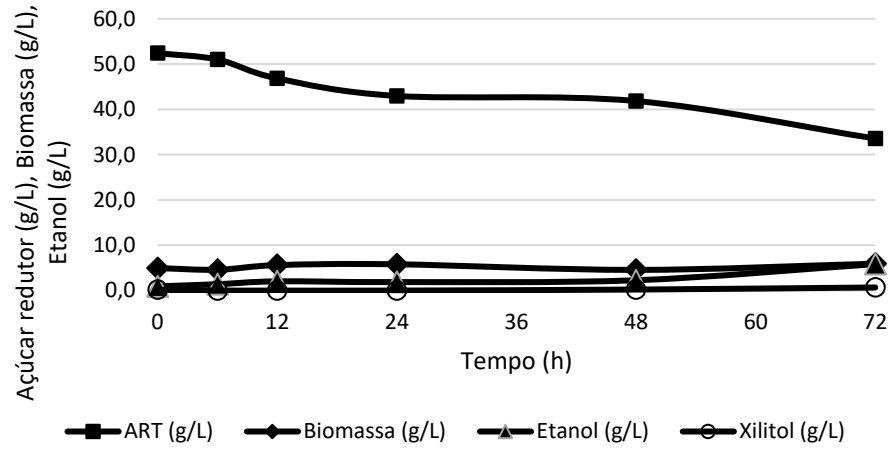
**Figura 28.** Perfil de consumo de açúcar redutor total (g/L), e produção de etanol (g/L), biomassa (g/L) e xilitol (g/L) na fermentação por *S. stipitis* de xilose (meio sintético), do hidrolisado evaporado e dos hidrolisados antes (hidrolisado evaporado) e após a etapa de destoxificação empregando os solventes acetato de isobulita, MIBK, Butanol, MTBE, DIBK, decanol, álcool isoamílico, acetato de butila, acetato de isoamila, propionato de isoamila, 2 etil-hexanol, biodiesel de óleo de mamona, biodiesel de óleo de coco, acetato de heptila.



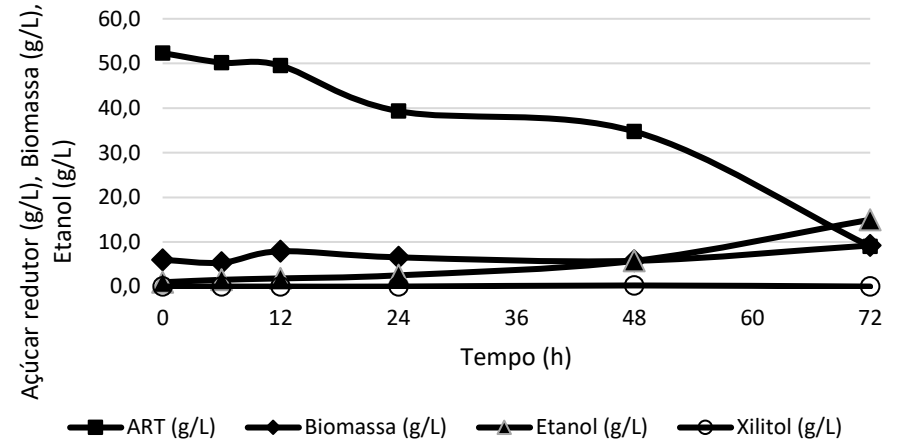




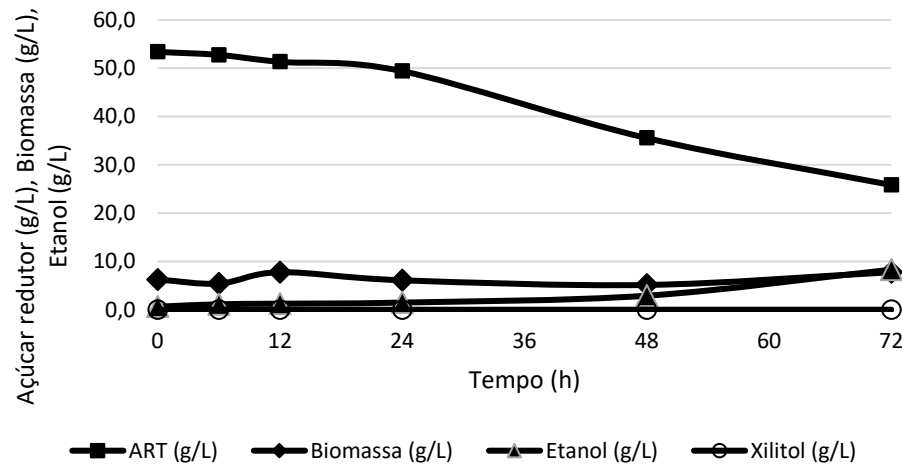
Acet. isoamila



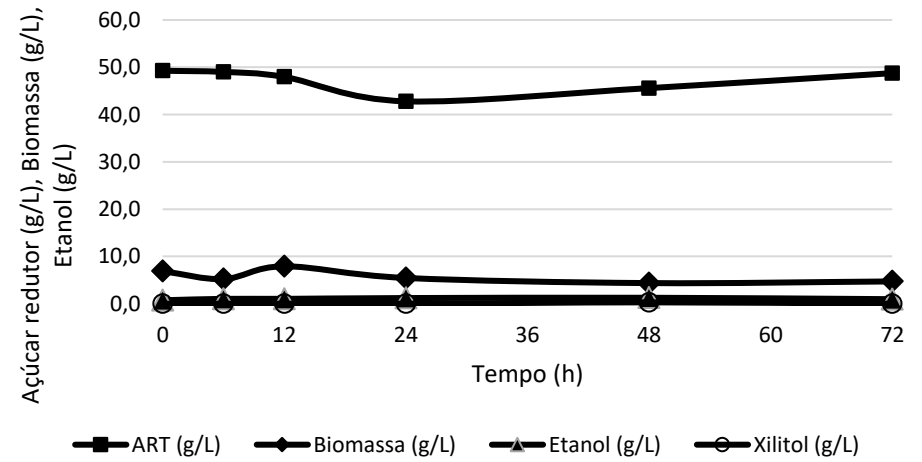
Prop. isoamila



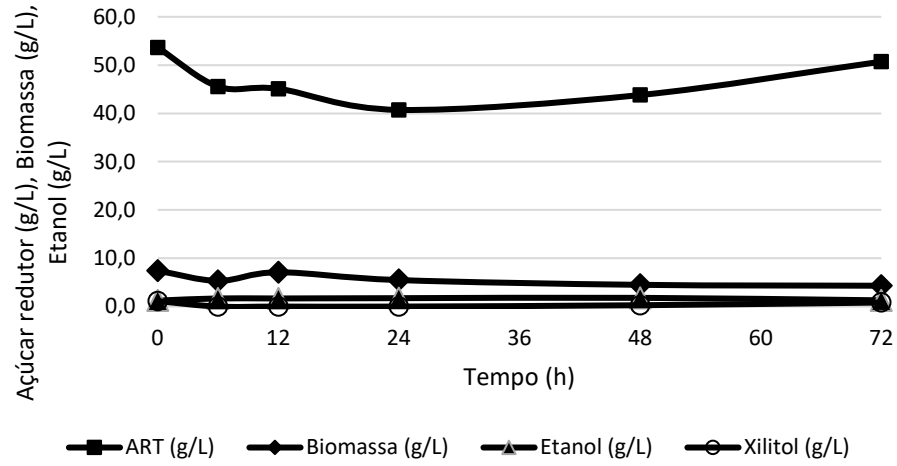
2- etilhexanol



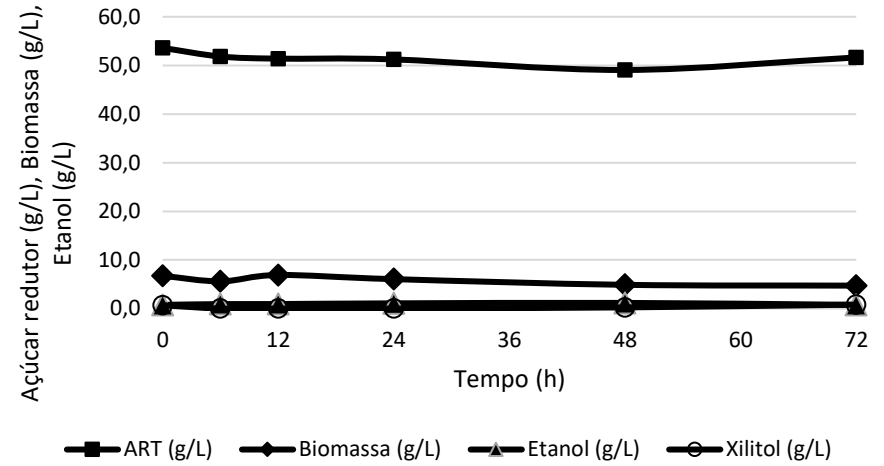
Biodiesel de óleo de mamona



Biodiesel de óleo de coco



Acetato de heptila





*S. stipitis* é uma levedura haplóide com divisão celular realizada por brotamento multilateral, com capacidade de metabolizar a maior parcela de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico como xilose, glicose, manose, galactose, celobiose e pequenos oligômeros de xilana e manana (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008; Lee et al., 1986).

O desempenho fermentativo de *S. stipitis* tem sido amplamente avaliado em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal, onde a fermentabilidade está intimamente atrelada a condições operacionais empregadas, tais como temperatura, pH, aeração, concentração inicial de substrato e suplementação, bem como da cepa avaliada (Silva et al., 2010).

A partir das figuras **27** e **28** tem-se que para o meio de xilose padrão, após 48 h de fermentação, toda a xilose (48 g/L) foi consumida, enquanto que para o hidrolisado evaporado apenas 12% do açúcar redutor inicial, composto majoritariamente por xilose, foi consumido após 72 h de fermentação.

Toda a glicose inicial presente no hidrolisado evaporado, aproximadamente 4,7 g/L, foi consumida nas 72 h de fermentação, enquanto as concentrações de arabinose e xilose permaneceram praticamente inalteradas.

A glicose é considerada como fonte de carbono universal para a grande maioria dos microrganismos, sendo então preferencialmente metabolizado mesmo em meios com alto teor de inibidores, como o caso do hidrolisado sem prévia etapa de destoxificação.

Segundo Schirmer-Michel et al., (2008), nas primeiras 24 h de cultivo as hexoses (glicose e maltose) são esgotadas, seguidas por xilose e posteriormente arabinose. Esta ordem de consumo para monossacarídeos foi relatada também por Parajo et al., (1997).

Os hidrolisados destoxificados com butanol, decanol, acetato de butila e biodiesel de óleo de mamona, resultaram em um baixo consumo de açúcares, com rendimentos em etanol próximos a 50%.

O hidrolisado destoxificado com biodiesel de óleo de mamona resultou no menor consumo de açúcar, menos que 1,0%, seguido do acetato de heptila com 3,6%, biodiesel de óleo de coco com 5,5%, butanol com 11,5%, decanol com 20,6% e acetato de butila com 22,5%.

Diversos fatores, além da presença de inibidores, podem afetar a bioconversão de xilose em etanol, visto que o meio de crescimento é complexo e está sujeito a variações nas concentrações de nutrientes (Horisawa et al., 2019).

Klinner et al., (2005), reportam que *S. stipitis* inicia a atividade fermentativa em resposta a uma limitação de oxigênio, sendo a atividade ótima alcançada em condições microaerofílicas (1-15% de O<sub>2</sub>).

A levedura *S. stipitis* tem sido reportada como uma das espécies naturais mais eficientes para a bioconversão de xilose, por apresentar características únicas que permitem minimizar a produção de xilitol, favorecendo, desta forma, a produção de etanol (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008). Entretanto, a bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* também é influenciada pela concentração de ácido acético no meio fermentativo.

De acordo com a **Figura 27**, a produtividade obtida para a fermentação de *S. stipitis* em meio preparado de xilose foi de 0,35 g/L.h e o processo de evaporação e extração líquido-líquido, apesar de reduzir significativamente a presença de ácido acético nos hidrolisados, ainda resultou em concentrações residuais superiores a 1,5 g/L do ácido.

A presença de ácido acético no meio fermentativo ocasionou reduções expressivas na produtividade volumétrica de etanol, com percentuais de redução de até 80% em relação ao meio preparado contendo xilose. A destoxificação com 1-decanol, por exemplo, resultou em rendimento de extração de ácido acético de 46,9%, entretanto foi obtida uma produtividade de apenas 0,040 g/L.h.

O resultado está de acordo com o observado por Bellido et al., (2011), no qual avaliaram o efeito da concentração inicial de ácido acético (0,5 a 3,5 g/L) sobre a fermentabilidade de *S. stipitis* DSM 3651 em meio semissintético (pH 5,0) contendo 35 g/L de glicose e 20 g/L de xilose. Nas menores concentrações estudadas, foi verificada uma redução sobre a produtividade volumétrica em etanol inferior a 30%. Entretanto, ao cultivar a levedura em presença de 2,5 g/L do ácido, a queda neste parâmetro atingiu aproximadamente 60%.

Zeferino, (2013) estudou o efeito do ácido acético durante o cultivo de *S. stipitis* NRRL Y-7124 em meio semissintético contendo 55 g/L de açúcares totais (glicose + xilose) e pH inicial do meio de 5,5. O autor reportou que na presença de 1,5 g/L de ácido acético, a produtividade volumétrica em etanol decresceu em 28%, atingindo redução de até 77% com concentrações de 4,5 g/L do ácido no meio.

Segundo Kilian and Uden, (1988), a glicose e a xilose são transportadas por dois sistemas de simporte de prótons, um de baixa afinidade, compartilhado pelos dois açúcares, e um de alta afinidade, o qual transporta apenas a pentose. A presença de um ácido fraco como o ácido acético pode prejudicar o funcionamento destes sistemas e ocasionar acúmulo de substrato ao final da fermentação, como pode ser observado para os solventes biodiesel de óleo de mamona e coco, e os acetatos de heptila e butila, cujo acúmulo de açúcares residuais ao final do processo foram de 98,9%; 94,5%; 96,4% e 77,8%, respectivamente.

Apesar das concentrações residuais acentuadas de ácido acético nos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados, tem-se que a toxicidade dos hidrolisados se deve ao efeito

sinérgico dos compostos presentes no meio, ou seja, pela combinação dos inibidores frente aos seus potenciais individuais (Zaldivar and Ingram, 1999).

Fato esse observado nos resultados de fermentabilidade oriundos do hidrolisado destoxificado com acetato de isobutila, que apesar de apresentar inicialmente teores de ácido acético superiores a 1,4 g/L, resultou em 65,3% de rendimento em etanol e 0,146 g/L.h de produtividade volumétrica.

Díaz et al., (2009), observaram que o ácido acético, na concentração de 3,0 g/L, quando em combinações binárias com furfural ou ácido fórmico, produziram inibições totais do crescimento de *S. stipitis* CECT No. 1922. Os autores atribuíram este evento ao efeito sinérgico de inibição entre os compostos, pois o crescimento celular havia sido detectado mesmo na presença de 6,0 g/L de ácido acético, quando empregado o composto individualmente.

Delgenes et al., (1990), empregaram o éter para promover a extração dos compostos inibitórios do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, para posterior fermentação do meio por *S. stipitis* Y7124. Os autores obtiveram uma remoção total do furfural presente no meio e extração de 15% do ácido acético, resultando em incrementos de 30% no fator de conversão de substrato em produto.

A literatura reporta que a presença dos aldeídos furânicos, como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados hemicelulósicos, pode ocasionar inibição das enzimas álcool desidrogenase (ADH), piruvato-desidrogenase (PDH) e aldeído-desidrogenase (ALDH), bem como as enzimas glicolíticas como a hexoquinase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Banerjee et al., 1981; Modig et al., 2002).

Os hidrolisados destoxificados pelos diferentes solventes apresentaram teores de furfural e HMF abaixo de 0,15 g/L. De acordo com Roberto et al., (1991) em avaliação da produção de etanol por *S. stipitis* CBS 5773 em meio semissintético contendo 30 g/L de xilose, concentrações de furfural acima de 2,0 g/L inibiram completamente o crescimento celular e o consumo do açúcar pela levedura, entretanto, em concentrações abaixo de 0,5 g/L, o aldeído atuou como fonte de carbono, com efeito positivo na formação de biomassa, sendo verificado também o mesmo consumo de xilose quando comparado ao meio sem o composto.

Modig et al., (2002), ao realizarem um estudo fermentativo *in vitro*, verificaram que a bioconversão do acetaldeído em etanol foi inibida por ambos os furanos contidos nos hidrolisados hemicelulósicos. Os autores verificaram que o furfural atuou diretamente nas enzimas álcool-desidrogenase e aldeído-desidrogenase, apresentando reduções superiores a 60 e 80% em suas atividades, respectivamente, quando empregado 0,12 g/L do furano.

O processo de remoção de inibidores pelo método de evaporação seguido por extração líquido-líquido mostrou-se eficiente em relação a fermentabilidade por *S. stipitis*, com incrementos na produtividade de até 90% em relação ao hidrolisado evaporado, apesar do sistema de avaliação em shaker não permitir controle de microaeração que permitiria um melhor desempenho da levedura.

Os solventes MIBK, MTBE, DIBK e propionato de isoamila apresentaram-se como potenciais solventes a serem empregados no processo de destoxificação para remoção de compostos inibitórios, resultando em incrementos de produtividade volumétrica e específica em etanol na faixa de 85 a 90%.

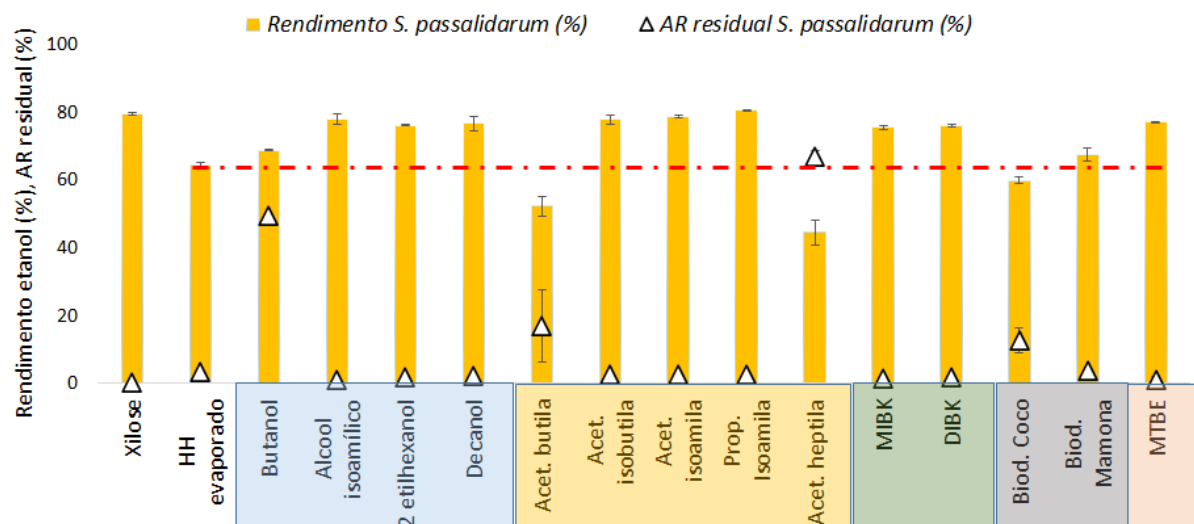
### 5.2.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado destoxificado com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y- 27907

O processo de destoxificação pelo método de evaporação seguido de extração líquido-líquido empregando-se os solventes descritos na **Tabela 10**, foi avaliado utilizando a levedura *S. passalidarum*. A **Figura 29** apresenta os resultados de rendimento, produtividade e açúcar residual do meio empregando o hidrolisado evaporado e os meios obtidos após o processo de destoxificação empregando os diferentes solventes. Ensaio utilizando a xilose padrão também foram realizados.

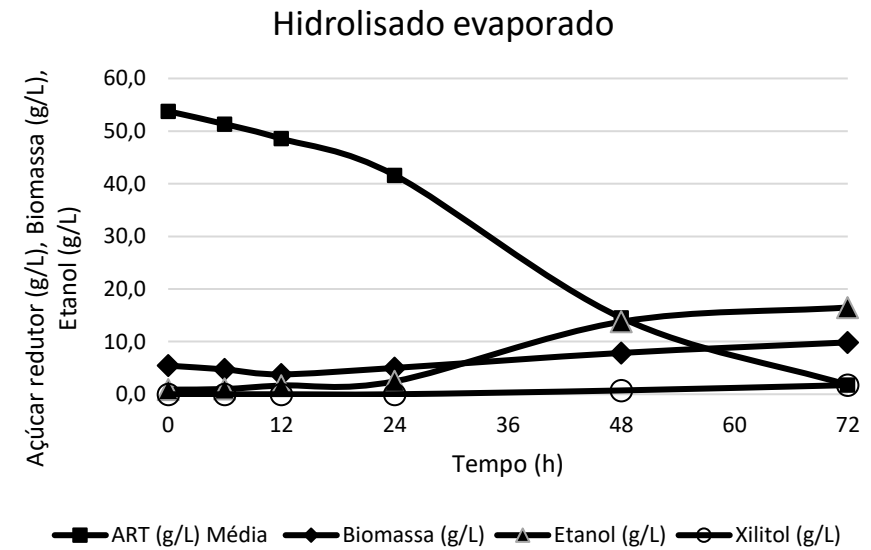
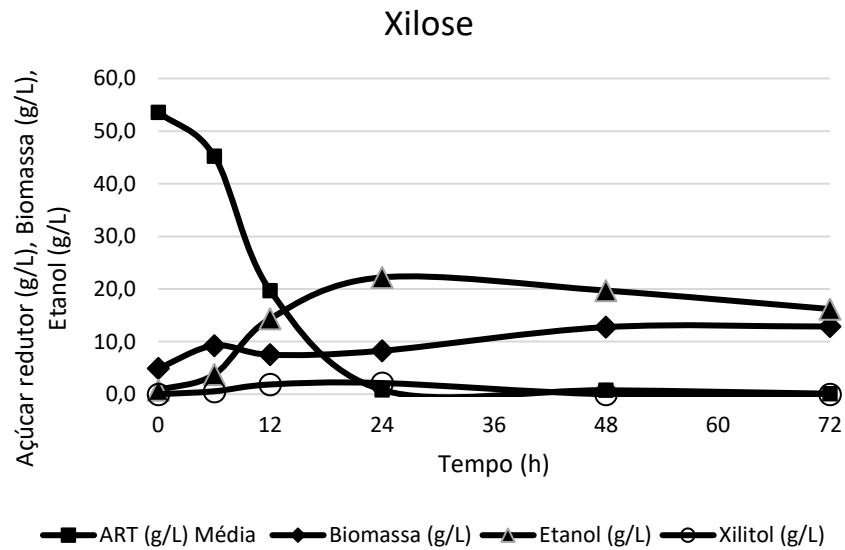
O tempo ótimo de fermentação para *S. passalidarum* foram definidos como 48 h, com base nos valores máximos de rendimento e produtividade. As concentrações residuais dos principais inibidores presentes no ponto inicial da fermentação por *S. stipitis* e os valores de produtividade específica e volumétrica em etanol estão apresentadas no ANEXO F.

A **Figura 30** apresenta o perfil de consumo de açúcar redutor total (glicose, xilose e arabinose) e produção de etanol, xilitol e glicerol por *S. passalidarum*, respectivamente para o hidrolisado evaporado, meio sintético padrão (xilose) e hidrolisados após destoxificação por extração líquido-líquido.

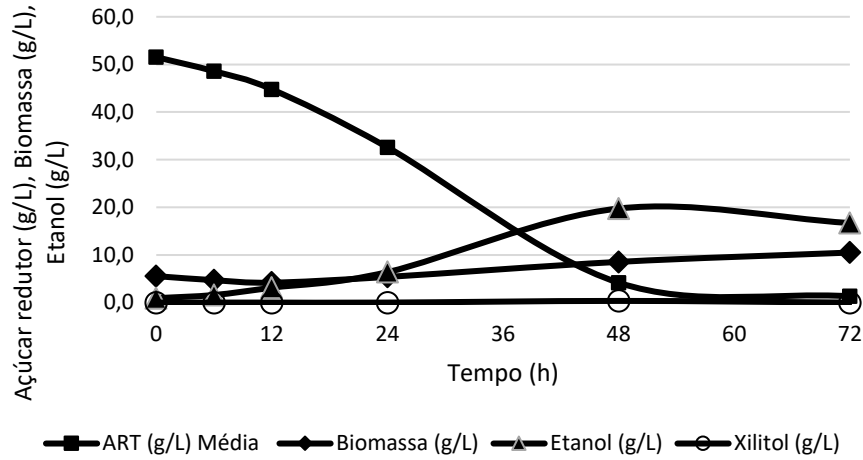
**Figura 29.** Valores de rendimento (%), xilose residual (g/L) e produtividade de etanol em 48 h de fermentação por *S. passalidarum* do meio preparado (xilose), hidrolisado evaporado e hidrolisados após processo de destoxificação.



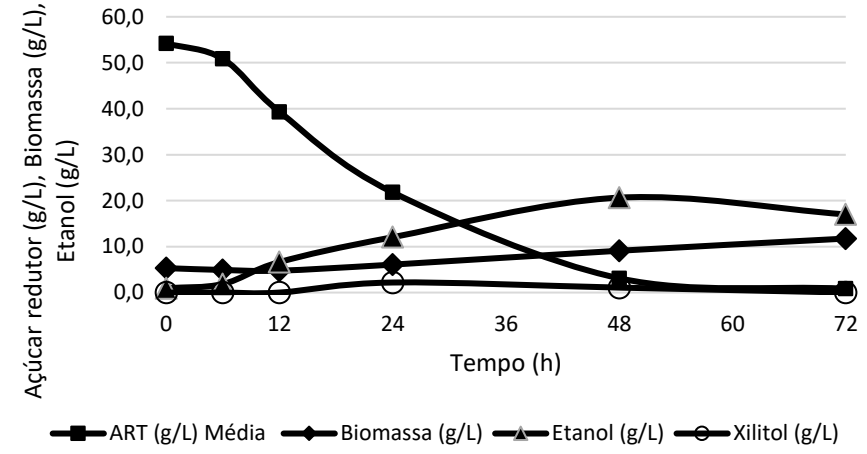
**Figura 30.** Perfil de consumo de açúcar redutor total (g/L), e produção de etanol (g/L), biomassa (g/L) e xilitol (g/L) para fermentação com *S. passalidarum* do meio preparado (xilose) e dos hidrolisados evaporado e após destoxificação empregando extração líquido-líquido.



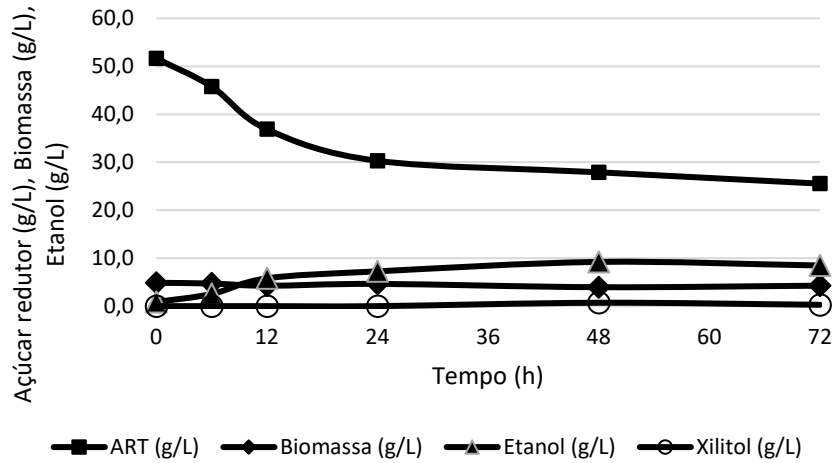
Acetato de isobutila



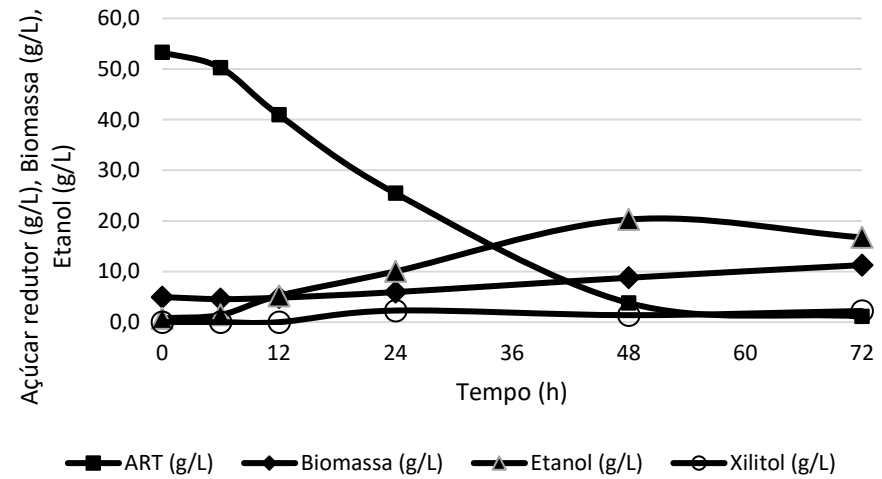
MIBK



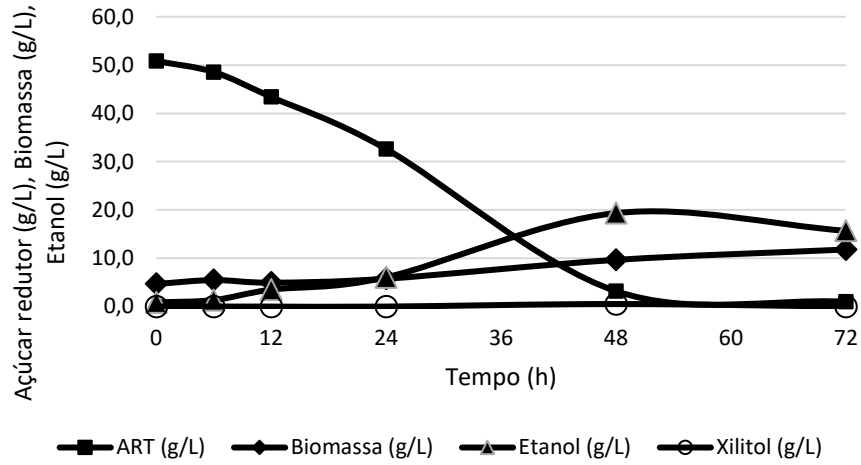
Butanol



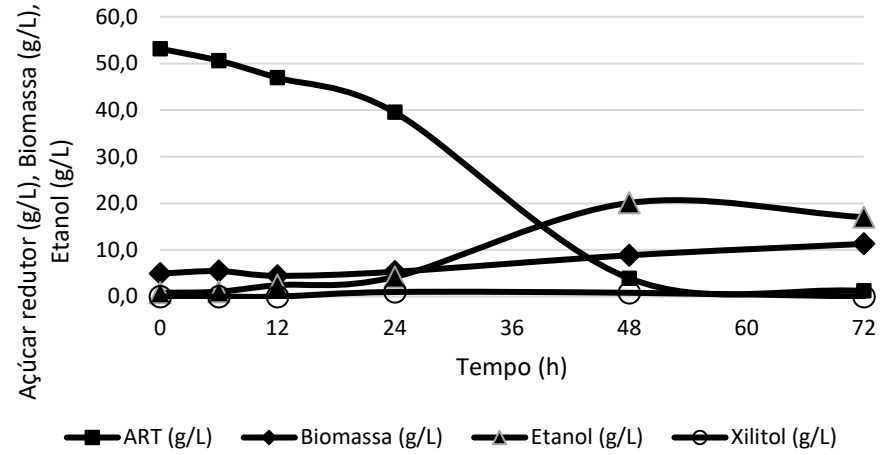
MTBE



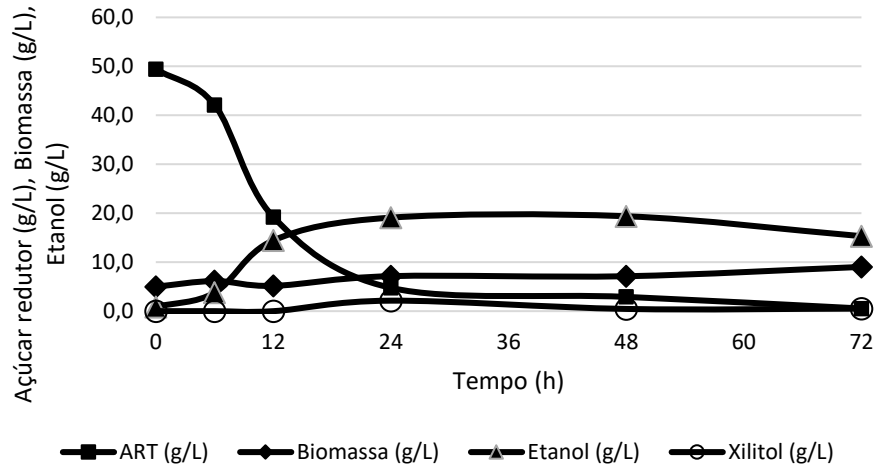
DIBK



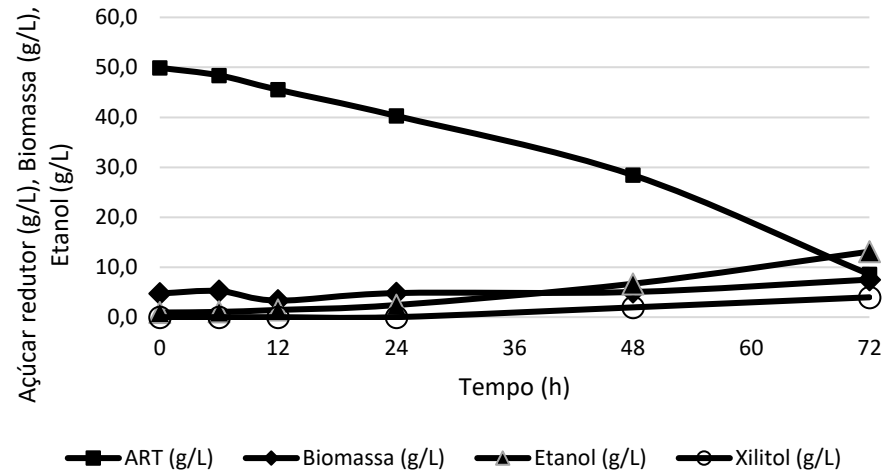
Decanol



Álcool isoamílico

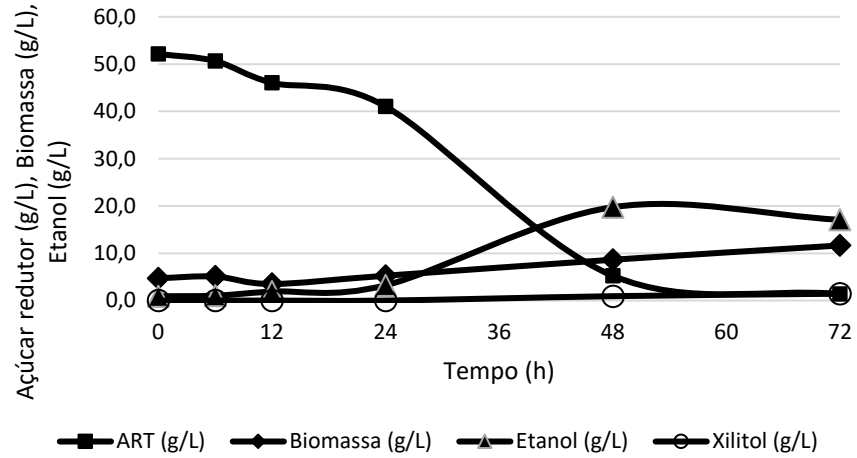


Acet. butila

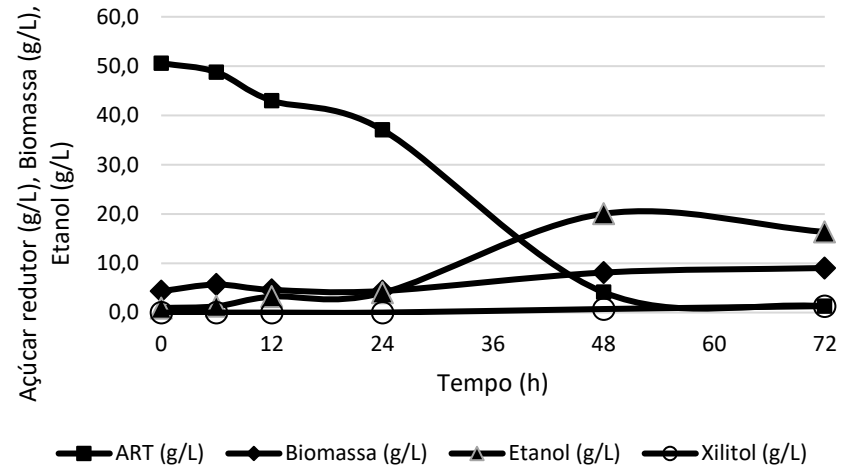




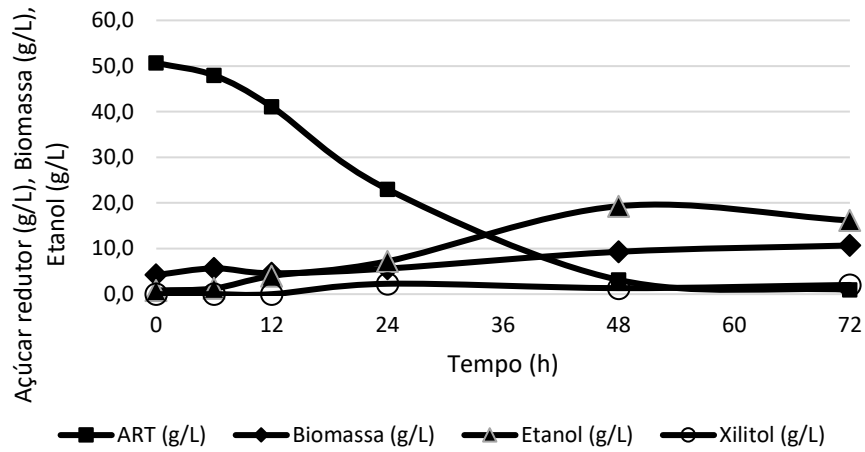
Acet. isoamila



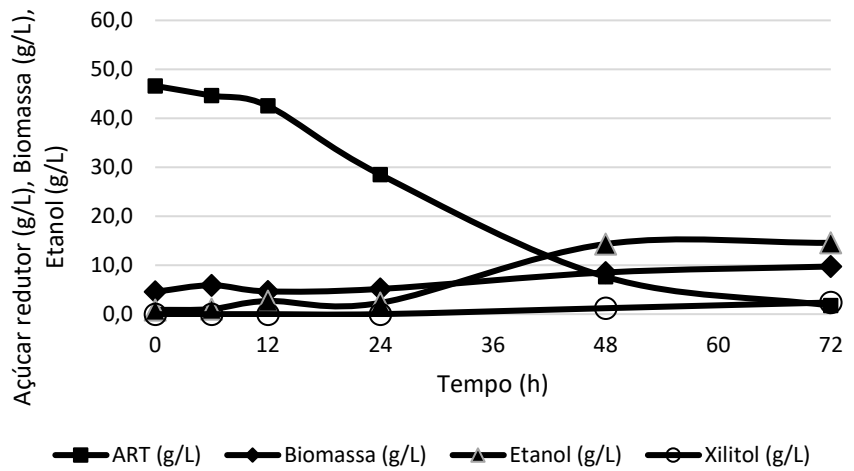
Prop. isoamila



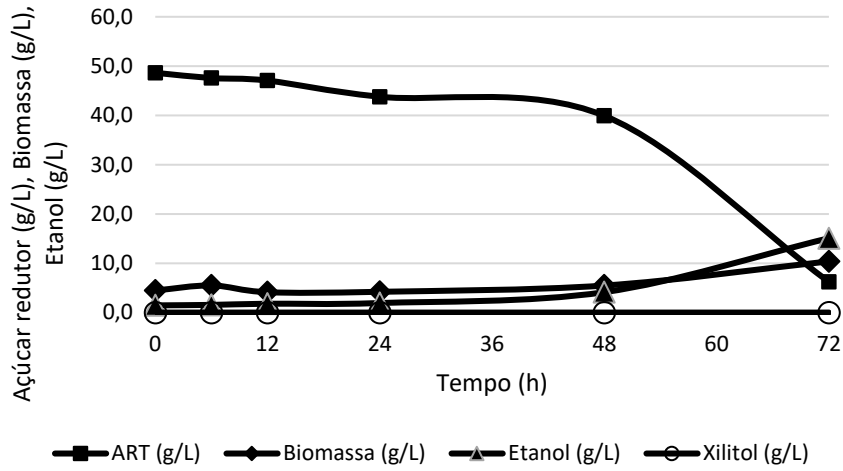
2- etilhexanol



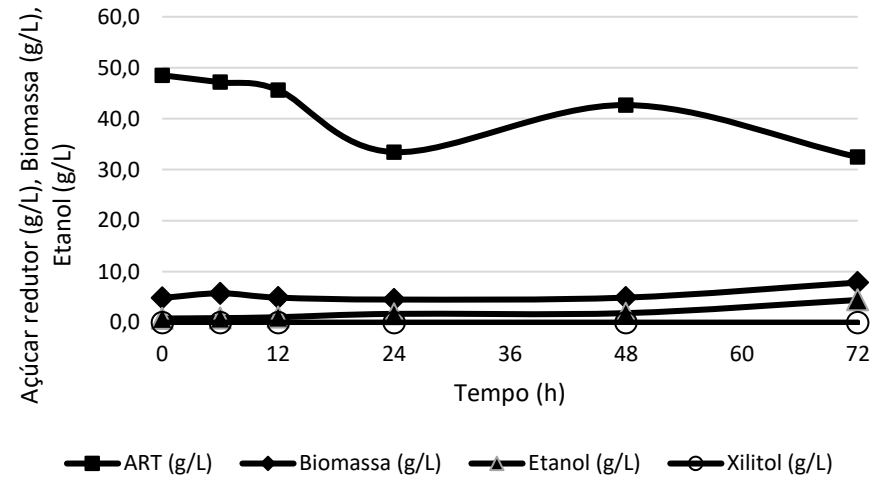
Biodiesel de óleo de mamona



Biodiesel de óleo de coco



Acetato de heptila



*S. passalidarum* é uma das linhagens promissoras para fermentação de pentoses, no qual apresenta potencial para metabolizar xilose com uma taxa superior a glicose, e co-utilizar glicose, xilose e celobiose como fontes de carbono (Hou, 2012; Nakanishi et al., 2017). Uma das principais vantagens dessa levedura frente a outras fermentadoras de pentoses é a habilidade de produzir etanol em condições estritamente anaeróbicas (Hou, 2012).

*S. stipitis* e *S. passalidarum* são similares tanto taxonomicamente como ambientalmente, sendo ambas isoladas do intestino de besouros e pertencentes a mesma clado CUG (citosina, uracila e guanina) (Wohlbach et al., 2011).

A fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados foi avaliada e de acordo com as figuras 29 e 30, os processos empregando acetato de butila, biodiesel de óleo de coco e de óleo de mamona e acetato de heptila não resultaram em ganhos na fermentação, com percentuais de rendimento e produtividade menores aos observados para a fermentação do hidrolisado evaporado.

O hidrolisado destoxificado por extração com acetato de heptila resultou em  $44,55 \pm 3,78$  % rendimento em etanol e produtividade de  $0,048 \pm 0,002$  g/L.h, apresentando um consumo de apenas  $13,3 \pm 0,1$ % do açúcar inicial em 48 h. Não foi observada a produção de xilitol e o máximo de teor de glicerol foi observado em 48 h, correspondendo a  $0,8 \pm 0,1$  g/L.

De acordo com a **Figura 29**, o acetato de butila apresentou uma fase *lag* de 24 h, sem aumento significativo de biomassa ou consumo de xilose ( $12 \pm 3$ %), com rendimento de  $52,7 \pm 2,9$ % e produtividade de  $0,120 \pm 0,018$  g/L.h. Já para o hidrolisado extraído com o biodiesel de óleo de coco, a fermentação mostrou-se prolongada, com uma fase *lag* de 48 h, com baixo consumo do substrato nas primeiras horas, correspondendo a  $6,0 \pm 1,0$ % do teor de xilose inicial.

A concentração média de xilose no hidrolisado foi em torno de 40- 45 g/L, seguido de glicose com valores próximos a 5 g/L e arabinose com 3,5 g/L. As quantidades observadas de subprodutos da fermentação de xilose, como xilitol e glicerol, em todas as fermentações foram baixas, sendo o etanol o principal produto formado com concentrações de 4,5 a 20 g/L.

Na fermentação do hidrolisado evaporado foram encontrados valores de produtividade volumétrica de etanol de  $0,269 \pm 0,015$  g/L.h e rendimento de  $64,41 \pm 0,64$ %, com a produção máxima de  $16,0 \pm 0,9$  g/L de etanol em 72 h.

O rendimento oriundo dos hidrolisados destoxificados com acetato de isobutila, álcool isoamílico, MIBK, MTBE, DIBK, decanol, acetato de isoamila, propionato de isoamila, e 2 etil hexanol apresentaram rendimentos em etanol próximos ao obtido a na fermentação com xilose ( $79, 59 \pm 0,26$ %).

Conforme já observado nos ensaios de avaliação de biocompatibilidade dos solventes empregados na etapa de remoção de inibidores, o butanol apresenta efeito inibitório frente a levedura, resultando em  $68,83 \pm 0,16\%$  de rendimento em etanol, representando um incremento de somente de 6% em relação ao hidrolisado evaporado ( $64,41 \pm 0,64\%$ ).

De acordo com a **Figura 29**, a destoxificação com acetato de heptila não se mostrou eficaz como método para destoxificação de hidrolisado hemicelulósico, resultando em uma fase *lag* de 48 h, seguido do consumo de apenas  $33,1 \pm 1,7 \%$  do açúcar inicial, em 72 h de fermentação.

Ao contrário do observado para *S. stipitis* (consumo de 11% do açúcar inicial em 72 h), o hidrolisado hemicelulósico destoxificado por butanol apresentou uma maior fermentabilidade por *S. passalidarum*, apresentando um consumo de  $28,2 \pm 0,5\%$  do açúcar inicial nas primeiras 12 h com posterior estagnação da metabolização dos açúcares, representando  $50,5 \pm 0,4 \%$  dos açúcares iniciais em 72 h.

Assim como observado para *S. stipitis*, a *S. passalidarum* também é influenciada por uma variedade de fatores, e o ácido acético também se apresenta como um dos inibidores mais importantes (Costa, 2016; van Zyl et al., 1991).

A literatura reporta que concentração em torno de 2–5 g/L pode inibir a maior parcela das leveduras fermentadoras de xilose, e hidrolisados podem resultar em teores acima de 10 g/L, ressaltando a importância de métodos de pré-tratamento e destoxificação apropriados (du Preez, 1994).

Costa, (2016), reportou que as leveduras consumidoras de xilose *S. passalidarum* HMD14.1, *S. arborariae* HMD19.1 e *S. stipitis* NRRL Y-7124 foram inibidas completamente em 2 g/L de ácido acético e 1,5 g/L de ácido fórmico, isoladamente; e inibidas parcialmente em 6 g/L de ácido levulínico, 1 g/L de furfural e 2 g/L de 5-HMF, isoladamente.

A levedura *S. passalidarum* destacou-se em relação a *S. stipitis* no cultivo em meio contendo hidrolisado lignocelulósico, apresentando rendimentos e produtividades superiores para os mesmos destoxificados, além de um período de adaptação inferior. Além disso, Hou, (2012) demonstrou que mesmo em condições anaeróbias, a levedura *S. passalidarum* atingiu um alto grau de rendimento de produção de etanol e um rápido crescimento celular, superior à levedura *S. stipitis*. Em condições aeróbias, ao co-fermentar glicose e xilose, a levedura foi capaz de consumir toda a xilose após a total metabolização da glicose. Outro dado relevante é que a levedura *S. passalidarum* possui uma enzima, xilose redutase, com afinidade maior por NADH, o que favorece a total metabolização de xilose e produção de etanol em ambiente anaeróbico (Hou, 2012).

Considerando que os hidrolisados possuem a mesma composição após processo de destoxificação, a levedura *S. passalidarum* apresentou limites de tolerância similares e ou superiores aos observados a *S. stipitis*. Entretanto, vale salientar que a produtividade volumétrica de etanol proveniente do hidrolisado evaporado foi de  $0,028 \pm 0,001$  g/L.h para *S. stipitis* e  $0,269 \pm 0,015$  g/L.h para *S. passalidarum*. Ou seja, o desempenho da *S. passalidarum* foi superior mesmo no hidrolisado antes da extração líquido-líquido. Sendo assim, os dados reportados na literatura e deste trabalho reforçam o melhor desempenho das leveduras do clado *Spathaspora* e sua potencial aplicação em fermentações em escala industrial de hidrolisados hemicelulósicos da biomassa lignocelulósica (Nakanishi et al., 2017)

Os solventes MIBK, MTBE e DIBK também foram destacados como potenciais solventes a serem empregados no processo de destoxificação para remoção de compostos inibitórios, resultando em incrementos na produtividade volumétrica de etanol na faixa de 34 % em relação ao hidrolisado evaporado.

### 5.3 Conclusões parciais

A biocompatibilidade dos extratantes utilizados no processo de destoxificação foi avaliada por meio da fermentação do meio xilose padrão acrescido de percentuais dos solventes de acordo com as respectivas solubilidades no hidrolisado hemicelulósico. O butanol foi o solvente com menor biocompatibilidade para o processo de destoxificação e subsequente fermentação, ocasionando inibição no crescimento celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*, e resultando em  $70,9 \pm 1,70\%$  e  $56,0 \pm 2,3\%$  de açúcares redutores remanescentes ao final de 48 h de fermentação, respectivamente.

A levedura *S. passalidarum* apresentou, em geral, melhor tolerância aos solventes empregados na etapa de destoxificação em relação a *S. stipitis*. Comportamento esse observado também para o meio somente com xilose.

A fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados foi avaliada tendo que os solventes destoxificados com butanol, decanol, acetato de butila e biodiesel de óleo de mamona, resultaram em um pequeno consumo de açúcar redutor por *S. stipitis* com rendimentos em etanol próximos a 50%.

Já para *S. passalidarum*, os hidrolisados hemicelulósicos destoxificados por extração com acetato de heptila e acetato de butila não resultaram em desempenhos satisfatórios, apresentando um consumo de apenas  $12 \pm 3\%$  do açúcar inicial em 48 h de fermentação, e uma fase *lag* de 24 h, respectivamente. Já o rendimento oriundo dos hidrolisados

destoxificados com acetato de isobutila, álcool isoamílico, MIBK, MTBE, DIBK, decanol, acetato de isoamila, propionato de isoamila, e 2 etil-hexanol apresentaram rendimentos em etanol próximos ao obtido a amostra padrão de xilose, com  $79,59 \% \pm 0,26$ .

Os solventes MIBK, MTBE e DIBK resultaram em hidrolisados destoxificados com melhor desempenho fermentativo, resultando em incrementos de produtividade volumétrica de etanol na faixa de 85% a 90%, quando a *S. stipitis* foi empregada, e na faixa de 34%, quando a *S. passalidarum* foi utilizada, em relação ao hidrolisado evaporado.

Considerando-se que os hidrolisados possuem a mesma composição após processo de destoxificação, a levedura *S. passalidarum* apresentou limites de tolerância similares e/ou superiores aos observados a *S. stipitis*, salientando-se a produtividade volumétrica de etanol proveniente do hidrolisado hemicelulósico evaporado foi de  $0,028 \pm 0,001$  g/L.h para *S. stipitis* e  $0,269 \pm 0,015$  g/L.h para *S. passalidarum*.

## **CAPÍTULO 6 - Obtenção e caracterização dos compostos fenólicos**

A formação e liberação de inibidores, desde o ácido acético oriundo dos grupos acetila da xilana, passando pelos produtos de degradação de carboidratos como furfural e HMF, até frações fenólicas de distintas composições está diretamente relacionado a etapa de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos. Apesar dos esforços na elucidação dos principais causadores da diminuição dos valores de rendimento e produtividade fermentativa dos hidrolisados hemicelulósicos e dos mecanismos envolvidos, os compostos fenólicos ainda são relativamente pouco estudados, devido, principalmente, a sua heterogeneidade.

O presente capítulo tem como objetivo apresentar uma caracterização sistemática dos compostos fenólicos oriundos dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados, baseados em tamanho de cadeia, ramificações, grupos funcionais, tipos de ligações e massa molar, como forma de fornecer atributos para o desenvolvimento de tecnologias que visem a melhor adaptação dos microrganismos frente aos seus inibidores e direcionamento de pré-tratamentos buscando a menor geração possível desses compostos.

### **6.1 Materiais e Métodos**

#### **6.1.1 Recuperação dos compostos fenólicos do hidrolisado hemicelulósico**

Após as extrações líquido-líquido, as fases orgânicas foram concentradas utilizando-se um rotaevaporador (IKA modelo RV10) acoplado a um banho termostático (Huber HB10 Control), permanecendo posteriormente por 24 h em um sistema de evaporação, a temperatura ambiente, acoplado a uma bomba de alto vácuo (Edwards-MPC105T) para total remoção dos solventes residuais.

As frações fenólicas provenientes das extrações com butanol, acetato de isoamila e propionato de isoamila tiveram que ser previamente solubilizadas em acetona e evaporadas em destilador Kugelrohr (Aldrich- Z683485) a 50°C e pressão entre 5-10 mmHg, devido aos seus altos pontos de ebulição. Após a total evaporação dos solventes, as frações permaneceram por 24 h em bomba de alto vácuo, para garantir uma total secagem do material.

As frações obtidas foram armazenadas sob refrigeração e submetidas a caracterizações físico-químicas.

## 6.1.2 Caracterização dos compostos fenólicos

### 6.1.2.1 Distribuição de massa molar média e polidispersividade por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para a análise, foi empregado o GPC (Jasco do Brasil) equipado com interface LC-NetII/ADC e detector por índice de refração RI-2031Plus, duas colunas PolarGel-M de dimensões (300 × 7,5 mm) e duas colunas de guarda PolarGel-M.

As amostras foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) com 0,1% (v/v) de brometo de lítio. A mesma fase foi empregada como eluente, visando a não agregação das partículas fenólicas. O fluxo utilizado foi de 0,7 mL/min e as análises foram realizadas a 40°C. Padrões de poliestireno (Sigma-Aldrich) na faixa entre 266 a 700 000 g. mol<sup>-1</sup> foram utilizados para a calibração.

A partir da curva de distribuição de massa molares obtêm-se a massa molecular média em número (M<sub>n</sub>) e a massa molecular média em massa (M<sub>w</sub>). A partir desses parâmetros a polidispersividade (PD) pode ser calculada pela Equação (5).

$$PD = \frac{M_w}{M_n} \quad (5)$$

### 6.1.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier na região Infravermelho Próximo (FTIR/NIR)

As análises de FTIR foram realizadas em equipamento Spectrum 400, série FTIR/NIR (Perkin Elmer) acoplado ao acessório de reflexão total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco. A resolução espectral utilizada foi de 4,0 cm<sup>-1</sup>. Para cada amostra, 16 varreduras foram acumuladas na região espectral de 650–4000 cm<sup>-1</sup>.

Para uma melhor discussão e comparação dos sinais e correspondentes atribuições, foram realizadas as análises em celulose microcristalina (Avicel PH 101 - Fluka Analytical); xilose 97% (SAFC - Sigma); hidrolisado hemicelulósico proveniente de pré-tratamento com ácido diluído sem concentrar; e lignina obtida pelo método de extração Pepper (Pepper et al., 1959), onde é possível preservar a estrutura da lignina de forma mais intacta.



### 6.1.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As transições térmicas e estabilidades das frações fenólicas foram determinadas empregando o equipamento de calorimetria de varredura diferencial (DSC) (SDT Q600, TA Instruments), com um fluxo de nitrogênio de 100 mL/min.

Aproximadamente 10 mg das amostras fenólicas foram colocadas no suporte constituído de alumina e as análises foram realizadas empregando-se uma taxa de aquecimento de 10°C/min da temperatura ambiente até 900°C. A perda mássica foi registrada visando a avaliação dos diversos estágios de degradação.

### 6.1.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (HSQC)

Os espectros de HSQC foram adquiridos utilizando o espectrômetro Agilent Inova pertencente ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio- CNPEM), operando a uma frequência Larmor de 499,726 MHz a 25°C em um instrumento equipado com uma sonda de tripla ressonância. Os parâmetros para aquisição de dados foram: largura de pulso de 10.250, janela espectral de 8000 Hz e 256 incrementos de tempo foram gravados. Os espectros foram calibrados com base no sinal de TMS.

Cerca de 35 mg das amostras foram dissolvidos em 0,65 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) (Aldrich, 99,8 atom % D, contendo 0,03% (v/v) tetrametilsilano (TMS), adicionado como estabilizante) e foram colocados em tubos de RMN de 5mm e submetidos a análise em solução de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$  NMR) e correlação heteronuclear de quantum simples (HSQC).

Os deslocamentos químicos para os prótons foram reportados em partes por milhões (ppm) de acordo com o padrão tetrametilsilano (TMS, 0  $\delta$ ) e foram referenciados pelo sinal de próton do solvente residual (DMSO- $d_6$ : 2,50 ppm). O espectro de ressonância do carbono foi registrado em 125,655 MHz e os deslocamentos químicos foram reportados em partes por milhões (ppm) de acordo com o padrão tetrametilsilano (TMS, 0  $\delta$ ), e referenciados pelo sinal do carbono do solvente residual (DMSO- $d_6$ : 39,5 ppm). As estruturas dos compostos fenólicos foram analisadas com auxílio das correlações em duas dimensões 2D NMR (HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

Os experimentos de HSQC foram adquiridos com janelas espectrais de 8012,8 Hz (de 16 a 0 ppm) e 25.133 Hz (de 165 a 0 ppm) para as dimensões de hidrogênio  $^1\text{H}$  e carbono  $^{13}\text{C}$  respectivamente. O número de pontos coletados foi de 1202 para a dimensão  $^1\text{H}$  com atraso

de relaxamento de 1,5 s. O número de transiente foi de 48, e 256 incrementos de tempo foram registrados para a dimensão  $^{13}\text{C}$ -dimension. O  $^1J_{\text{CH}}$  utilizado foi de 146 Hz.

O processamento foi realizado empregando apodização gaussiana na dimensão do hidrogênio  $^1\text{H}$  e uma função *squared cosine-bell* na dimensão do carbono  $^{13}\text{C}$ . Previamente a transformada de Fourier, as matrizes com os valores foram preenchidas de zero para obtenção de 1202 pontos na dimensão do carbono  $^{13}\text{C}$ .

Os picos de correlação do HSQC foram atribuídos conforme dados da literatura e uma análise semiquantitativa foi realizada com base no volume das integrais dos picos correspondentes, por meio da utilização do software NMRViewJ.

Na região aromática/insaturada, as correções  $\text{C}_2\text{-H}_2$  para unidades G ( $\text{G}_2$ ), ferulatos ( $\text{F}_2$ ) e  $\text{C}_{2,6}\text{-H}_{2,6}$  para as unidades H e S da lignina foram utilizados para estimar as relativas abundâncias (as integrais correspondentes a sinais  $\text{C}_{2,6}\text{-H}_{2,6}$  foram logicamente divididas pela metade). Ressalta-se que a quantificação relativa das unidades *p*-cumarato e ferulato da lignina são superestimadas devido ao longo período de relaxação dessas unidades em relação ao rápido tempo de relaxação do polímero e em relação aos tempos de pulso empregados no experimento.

#### 6.1.2.5 Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (Py-GC/MS)

A pirólise das frações fenólicas (aproximadamente 0,20 mg) foi conduzida a  $500^\circ\text{C}$  em um microforno pirolisador EGA/PY-3030S (Frontier Laboratories Ltd.) acoplado a um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG2010Plus usando uma coluna capilar Ultra alloy (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme) e um detector de massa seletivo Shimadzu QP-2010. A temperatura do forno foi programada de  $45^\circ\text{C}$  (4 min) para  $300^\circ\text{C}$  (20 min) a uma taxa de aquecimento de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ . Hélio foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ .

Para a pirólise na presença de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), foi utilizado aproximadamente 0,1 mg de amostra, sendo a mesma misturada com  $1\mu\text{l}$  de TMAH (25 % m/m em metanol).

Os compostos foram identificados por comparação dos seus espectros de massa com os das bibliotecas Wiley e NIST. As áreas molares dos picos foram calculadas para os produtos de degradação da lignina, as áreas somadas foram normalizadas e os dados para a média da duplicata das análises foram calculados e expressos como percentagens molares.

### 6.1.2.6 Análise de Raio-X de baixo Ângulo (SAXs)

A análise SAXs possibilita o acesso às características como forma, tamanho e distribuição de tamanhos de macromoléculas em um estado próximo à sua forma natural.

As análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (small angle X-ray, SAXS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), localizado no Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas/SP.

A técnica de SAXS é amplamente empregada na caracterização estrutural de nanopartículas em solução (Glatter and Kratky, 1982).

Para a análise, as frações fenólicas já previamente secas, foram solubilizadas em solução de hidróxido de sódio 0,1 M a fim de se obter soluções de concentração de 1 mg/mL e 5 mg/mL. O preparo das amostras foi realizado com 7 dias de antecedência da aquisição das análises, devido ao período de estabilização da conformação das estruturas fenólicas após a dissolução (Maziero et al., 2012).

Os padrões de intensidade de dispersão de Raio-X foram coletados usando um feixe de raios-X monocromático com um comprimento de onda de  $\lambda = 1.5 \text{ \AA}$  e um detector bidimensional CCD (MarResearch, USA). O detector da amostra foi setado para 1000 mm, resultando em um vetor de espalhamento variando entre  $0,014 < q < 0.33 \text{ \AA}^{-1}$ , definido como  $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ , onde  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento.

As curvas experimentais de SAXS foram corrigidas e normalizadas pela intensidade do feixe incidente, absorção das amostras e concentração das ligninas. Os ruídos experimentais (espalhamentos parasitas) foram subtraídos da intensidade total de espalhamento.

A curva de dispersão de fundo foi subtraída de cada amostra correspondente, assim como o espalhamento da solução de hidróxido de sódio utilizado na diluição das amostras. A integração dos resultados foi realizada utilizando o software Fit2D (Hammersley, 1997).

As medidas foram realizadas para as amostras diluída em solução de hidróxido de sódio 1 % (m/v) a uma temperatura de 20°C. Um banho térmico foi conectado ao amostrador para garantir o controle de temperatura constante durante as medidas.

O ajuste dos dados das análises foi realizado utilizando o programa SASfit (Kohlbrecher et al., 2006).

As amostras de lignina foram descritas como similares a agregados fractais dos principais precursores. Para a realização das análises foram assumidas duas contribuições para o padrão de dispersão (agregação): uma molécula similar a um fractal correspondendo a

agregados de segundo nível e uma molécula similar a dispersão de disco, correspondendo aos precursores da lignina em solução (primeiro nível).

## **6.2 Resultados**

### **6.2.1 Caracterização das frações fenólicas extraídas no processo de destoxificação**

A caracterização das frações fenólicas extraídas durante o processo de destoxificação por extração líquido-líquido foram realizadas visando avaliar as diferentes características dos compostos extraídos e as possíveis correlações com o processo de inibição do processo fermentativo.

Após a extração líquido-líquido as frações orgânicas foram evaporadas, entretanto, devido ao alto ponto de ebulição de alguns solventes e a presença de carboidratos e ou impurezas, somente as frações provenientes das extrações com acetato de butila, acetato de isoamila, propionato de isoamila, diisobutilcetona (DIBK), acetato de heptila, éter metil-terc-butílico (MTBE), metilisobutilcetona (MIBK), butanol e acetato de isobutila foram passíveis de caracterização.

Devido à complexidade estrutural dos compostos fenólicos uma abordagem multitécnica é necessária para se obter conhecimentos essenciais sobre a estrutura da lignina, composição, distribuição de massa molar e comportamento térmico.

#### **6.2.1.1 Grupos Funcionais**

A presença de distintos grupos funcionais nas frações fenólicas pode estar diretamente relacionada as distintas respostas de inibição de acordo com o pré-tratamento utilizado e os microrganismos empregados no processo fermentativo.

Diversos compostos fenólicos são formados durante o processamento de materiais lignocelulósicos (Wang et al., 2017; Xue et al., 2018), e a composição do hidrolisado obtido pode variar de acordo o método de pré-tratamento e a fonte de material lignocelulósico (Larsson et al., 1999). Em geral os compostos inibitórios presentes no hidrolisado apresentam-se distintos grupos funcionais como ácidos, aldeídos, álcoois e cetonas (Adeboye et al., 2014).

Os compostos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar foram analisados por  $^1\text{H}$  NMR e FTIR para se ter informações comparativas sobre os grupos funcionais presentes.

A **Tabela 11** apresenta os resultados da análise semiquantitativa do espectro  $^1\text{HNMR}$  e os respectivos deslocamentos químicos. Os espectros  $^1\text{HNMR}$  de todos extratos fenólicos são reportados no ANEXO G.

**Tabela 11.** Deslocamentos químicos e atribuições correspondentes para os compostos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico.

Região (ppm)	Grupo funcional	Acetato de butila	Acetato de isobutila	Acetato de isoamila	Propionato de isoamila	Acetato de heptila	MIBK	DIBK	MTBE
0,8-1,5	Alifática não-oxigenada	7,23	11,03	7,18	9,73	12,88	9,37	16,66	6,98
1,8-2,2	Prótons alifáticos acetoxílicos	6,24	5,29	3,05	3,72	4,30	5,53	7,43	3,64
2,2-2,5	Prótons aromáticos acetoxílicos	2,32	2,66	1,98	2,76	2,20	3,21	4,02	2,04
2,5-3,3	Região alifática	5,02	6,19	5,60	4,68	5,32	21,71	5,17	6,97
3,6-3,3	Metoxil	23,04	13,74	30,85	15,97	16,96	17,51	15,38	41,50
4,0-3,6	Região alifática	12,67	16,75	10,82	9,94	11,44	0,08	10,64	9,07
5,2-5,75	Região benzílica cíclica	3,70	3,75	3,54	2,84	3,16	3,86	2,91	3,38
5,75-6,2	Região benzílica não-cíclica	2,64	2,20	2,15	2,25	2,47	2,86	2,45	2,16
6,2-7,9	Região aromática	24,49	25,80	22,70	34,51	27,98	22,94	23,21	14,13
9,0-11	Ácidos carboxílicos e aldeídos	12,66	12,60	12,12	13,61	13,30	12,94	12,13	10,15

Um pico intenso próximo de 1,25 ppm aparece no espectro de  $^1\text{H}$ NMR de todas os extratos fenólicos, correspondente a região de compostos alifáticos não oxigenados, indicando assim a presença de subestruturas não oxigenadas e carbonos alifáticos saturados ( $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ -hidrocarbonetos) é proeminente em todas as amostras.

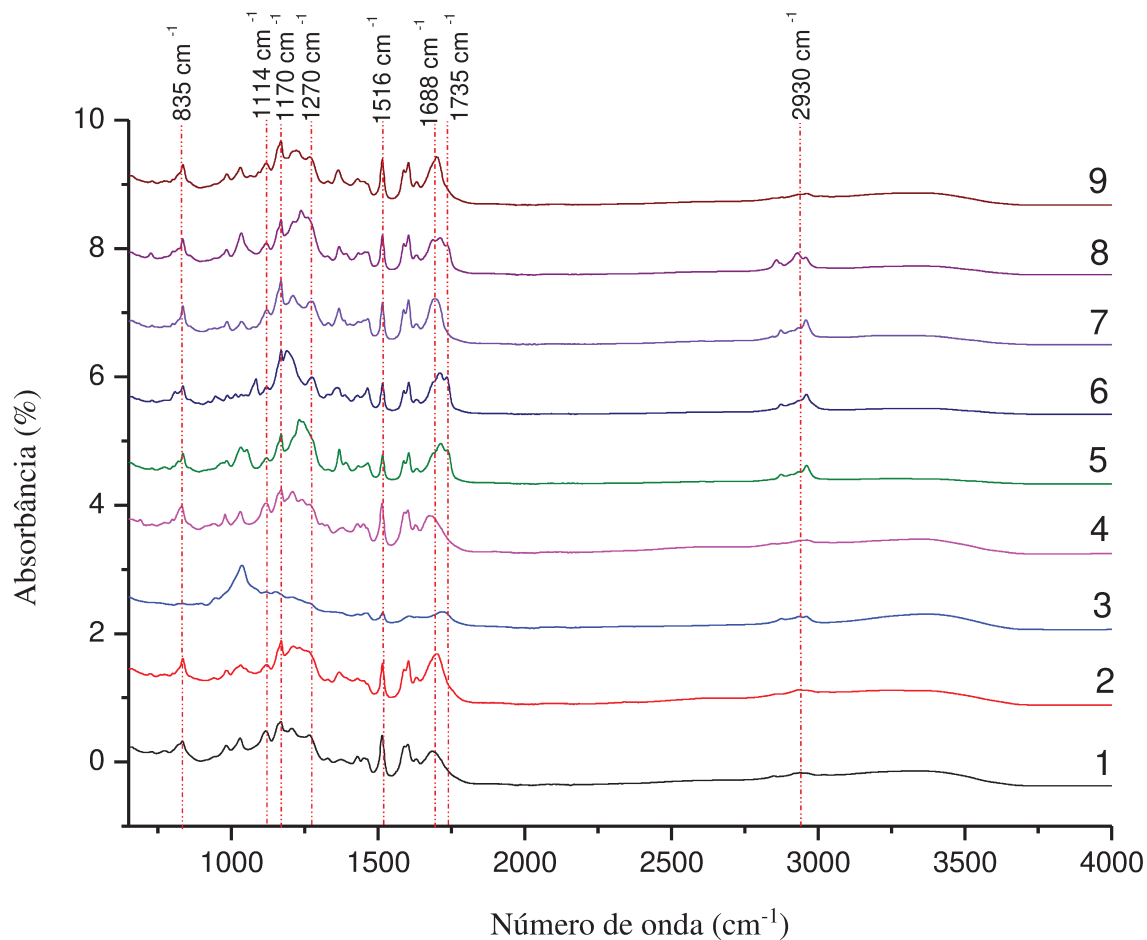
Em relação aos compostos alifáticos acetoxílicos, as frações acetato de isobutila e DIBK apresentaram a remoção de percentuais significativamente maiores que os demais.

Cavka et al., (2015), avaliaram a influência de aldeídos alifáticos como formaldeído, acetaldeído e glicolaldeído na inibição em *S. cerevisiae* empregadas na produção de biocombustíveis. Em concentrações superiores a 1,5 mM, o formaldeído influencia negativamente no consumo de xilose e ocasiona decréscimos de 15 % no rendimento em etanol em relação ao controle, utilizando *S. cerevisiae*. Já para acetaldeído, concentrações entre 5 a 10 mM no meio reduzem o consumo de glicose em 67 % em relação ao controle. Já o glicolaldeído apresenta-se fortemente inibitório em concentrações de 10 mM, reduzindo em 91 % o consumo de açúcares redutores totais.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é outra técnica que permite a identificação dos grupos funcionais presentes nas frações fenólicas. Os espectros de infravermelho são apresentados na **Figura 31** e as respectivas atribuições dos picos são apresentados na **Tabela 12**.

Para efeito de comparação, realizou-se a análise por FTIR do hidrolisado hemicelulósico evaporado proveniente do pré-tratamento ácido, celulose e xilose pura comercial e lignina proveniente da extração pepper. A figura contendo os espectros de infravermelho e as respectivas atribuições encontram-se no ANEXO H.

**Figura 31.** Espectros de infravermelho dos extratos fenólicos provenientes das extrações líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico obtidos na região espectral de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .



1- MIBK; 2- MTBE; 3- Butanol; 4- Acetato de isobutila; 5- Acetato de isoamila; 6- Propionato de isoamila; 7- DIBK; 8- Acetato de heptila, 9- Acetato de butila.



**Tabela 12.** Atribuições do espectro de infravermelho para os extratos fenólicos provenientes das extrações líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico.

Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Frações fenólicas							
	Acetato de butila	Acetato de isobutila	Acetato de isoamila	Propionato de isoamila	Acetato de heptila	MIBK	DIBK	MTBE
3500-3000	3353	3368	-	-	-	3362	-	3358
3000-2800	2935	2953	2958 2868	2963 2866	2926 2850	2911	2958 2868	2918
1800-1700	-	-	1707	1707	-	-	-	-
1700-1600	1689	1697 1602	1603	1602	1687 1601	1678	1687 1601	1692 1601
1600-1550	1598	-	-	-	-	1595	-	-
1550-1500	1511	1513	1513	1513	1514	1512	1516	1513
1500-1450	-	-	1463	1461	-	-	1465	-
1450-1400	1426	1426	1427	-	1448	1445 1425	-	-
1400-1350	1361	1360	1366	1362	1364	1365	1363	1362
1350-1200	-	1220	1228	1266	1233	1251	1260 1205	1202
1200-1150	1166	1169	1167	1186	1170	1161 1198	1167	1167
1150-1050	1111	1114	-	1080	-	1112	-	-
1050-950	1026 975	1026 981	1027	-	1029	1024 976	1029	1024
950-800	825	834	832	835	832	827	833	833

O espectro de infravermelho de macromoléculas de alta massa molar com estruturas irregulares apresenta em média 20 bandas assimétricas de absorção, no qual a diferenciação entre elas é delineada pela intensidade das bandas, com número de bandas e frequências com alta similaridade (Sarkanen and Ludwig, 1971).

As ligninas, em geral, apresentam uma banda de forte intensidade na região espectral de 3500-3100  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a vibrações de alongamento das ligações OH. Essa banda é proveniente da presença de grupos álcool e hidroxil fenólico envolvidos na ligação de hidrogênio (Sarkanen and Ludwig, 1971).

A intensidade dessas bandas aumenta durante reações de demetilação e diminui durante metilações, visto que durante a demetilação a ligação O-CH<sub>3</sub> no grupo metoxil ligados ao carbono 3 e ou carbono 5 do anel aromático são separadas e o CH<sub>3</sub> é substituído por um átomo de hidrogênio, produzindo assim um novo grupo OH.

Durante a metilação, a ligação OH é separada e o hidrogênio é substituído por um grupo CH<sub>3</sub>, resultando então em um decréscimo da intensidade da banda OH (Durie et al., 1960).

As amostras padrões de celulose e xilose apresentaram bandas largas e fortes em 3322  $\text{cm}^{-1}$  e 3207  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, e a amostra de hidrolisado hemicelulósico apresentou banda de absorção larga e forte em 3300  $\text{cm}^{-1}$ , indicando também a atribuição desse estiramento a presença de polissacarídeos (ANEXO H).

As frações fenólicas extraídas apresentaram baixa intensidade nessa região, exceto para acetato de isobutila e MTBE. Esse fator pode ser atribuído a maior solubilidade dos solventes no meio (19,17 g/L para o MTBE e 3,54 g/L para o acetato de isobutila), conforme apresentado previamente na **Tabela 12**, resultando então na remoção parcial de polissacarídeos para a fração orgânica durante o processo de extração líquido-líquido.

Na região espectral de 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ , as amostras de celulose, xilose e lignina apresentaram deformações fracas em 2885, 2887 e 2909  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Para a lignina a banda em 2930  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações de estiramento de C-H de metil e metoxil (An et al., 2017), e observa-se que os extratos fenólicos acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK, e acetato de heptila apresentaram picos com maior intensidade em relação as outras frações mostrando maior eficácia desses solventes na remoção de compostos característicos dessa região.

Os picos característicos atribuídos as vibrações da estrutura da lignina são reportadas entre 1260 -1760  $\text{cm}^{-1}$  (Trajano et al., 2013).

Na região espectral de 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ , as extrações com acetato de butila, acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK, acetato de heptila, MTBE, MIBK, e acetato de isobutila

apresentaram estiramentos pronunciados, que podem ser atribuídos a vibrações de grupos carbonílicas de éster e cetona. A banda em  $1688\text{ cm}^{-1}$  pode estar associada a grupos carbonilas conjugados com anéis aromáticos, provavelmente ligados quimicamente as unidades de ácido ferúlico (FA) e ácido p-cumárico (pCa) (Hoareau et al., 2004).

De acordo com Hergert, (1960), em análise de infravermelho de uma lignina modelo, a banda de absorção localizada em  $1660\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao grupo cetona localizado na posição  $\alpha$ , enquanto a absorção localizada em  $1712\text{ cm}^{-1}$  poderia ser atribuída ao grupo cetona localizado na posição  $\beta$ .

A amostra de hidrolisado apresentou estiramento em  $1630\text{ cm}^{-1}$  e a amostra de celulose apresentou uma leve deformação em  $1620\text{ cm}^{-1}$ , caracterizando as ligações O-H conjugada com vibração da ligação C=O.

Em estudos Hergert and Kurth, (1953), os autores atribuíram as bandas em  $1660$  e  $1720\text{ cm}^{-1}$  aos grupos carbonilas conjugados e grupos carboxila respectivamente, devido ao desaparecimento das bandas após redução com borano de sódio e hidreto de lítio alumínio respectivamente.

De acordo com Adapa et al., (2011), a lignina pura apresentou estiramento na região de  $1599\text{ cm}^{-1}$ , característico das vibrações das ligações C-O e C=O do anel aromático. Todas as frações fenólicas apresentaram bandas entre  $1585$  e  $1603\text{ cm}^{-1}$ , com a acetato de isobutila, MTBE, DIBK, acetato de butila e acetato de heptila apresentando picos mais intensos. A presença de bandas entre  $1600$  e  $1630\text{ cm}^{-1}$  e bandas em  $970\text{ cm}^{-1}$  é um indicativo da presença de ligações C=C nas ligninas.

Na região de  $1500$ - $1450\text{ cm}^{-1}$ , o espectro de lignina mostra um estiramento em  $1459\text{ cm}^{-1}$ , e a lignina pura apresentou banda em  $1467\text{ cm}^{-1}$ , característico das deformações assimétricas das ligações C-H em  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ . As amostras de acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK apresentaram bandas entre  $1461$  e  $1465\text{ cm}^{-1}$ , indicando a remoção de fenólicos.

Na região de  $1450$ - $1400\text{ cm}^{-1}$  o espectro de lignina pepper mostra um estiramento em  $1412\text{ cm}^{-1}$  e a lignina pura apresentou banda em  $1429\text{ cm}^{-1}$ , característico de vibrações da ligação C-H do anel aromático.

As amostras de acetato de butila, acetato de isoamila, acetato de heptila, MIBK e acetato de isobutila apresentaram picos entre  $1425$ - $1448\text{ cm}^{-1}$ . A extração com acetato de isobutila apresentou melhor remoção dos constituintes característicos da região devido à maior intensidade do pico.

Na região de  $1400$ - $1350\text{ cm}^{-1}$  a amostra de celulose apresentou pequena deformação em  $1353\text{ cm}^{-1}$  e a amostra de lignina pepper apresentou estiramento em  $1365\text{ cm}^{-1}$ , característica da ligação C-H. As amostras de acetato de butila, acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK,

acetato de heptila, MTBE, MIBK e acetato de isobutila apresentaram deformações entre  $1360\text{ cm}^{-1}$  e  $1366\text{ cm}^{-1}$ , se assemelhando a região de absorção da lignina. O composto com maior intensidade foi DIBK.

Na região de  $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  a amostra de celulose apresentou deformação em  $1310\text{ cm}^{-1}$ , características de vibrações da ligação  $\text{CH}_2$ . Acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK, acetato de heptila, MTBE, MIBK e acetato de isobutila apresentaram deformações entre  $1202$  e  $1327\text{ cm}^{-1}$ .

O pico localização entre  $1268\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$  é atribuído a derivados de unidades guaiacila que são solubilizados na fase líquida durante o processo de pré-tratamento, entretanto os picos característicos de unidades siringila ( $1325$  e  $1244\text{ cm}^{-1}$ ) não são observados.

Na região de  $1200\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ , as amostras de lignina pepper e lignina pura apresentaram bandas em  $1190$  e  $1157\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Essa deformação caracteriza ligações  $\text{C-O}$  e  $\text{C=O}$  do anel aromático, indicando a remoção de compostos.

Na região de  $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ , a amostra de xilose apresentou estiramento em  $1124\text{ cm}^{-1}$ , característico da ligação glicosídica. A amostra de lignina pepper apresentou deformação em  $1123\text{ cm}^{-1}$  devido a ligação  $\text{C-H}$  do anel, típico de unidades siringila. As extrações com acetato de butila, propionato de isoamila, MIBK e acetato de isobutila apresentaram picos entre  $1080$  e  $1120\text{ cm}^{-1}$ . A banda da extração com acetato de isobutila apresentou maior intensidade, indicando que esses solventes se mostraram eficazes na remoção dos compostos fenólicos, mas possivelmente arrastaram a fração hemicelulósica.

Modificações no anel aromático e quebra de ligações do tipo éster podem ser observadas no pico em  $1115\text{ cm}^{-1}$ . Os distintos formatos e intensidades dessa banda podem ser atribuídas as distintas seletividades dos solventes durante a etapa de extração dos compostos fenólicos do hidrolisado.

Zhang et al., (2015), reportaram modificações no pico em  $1115\text{ cm}^{-1}$  no resíduo sólido proveniente do pré-tratamento com  $0,05\%$  ácido sulfúrico a  $240^\circ\text{C}$  por  $5\text{ min}$ , o qual foi atribuído a quebra de ligações éster durante o pré-tratamento.

A banda próxima a  $1170\text{ cm}^{-1}$  é característica de grupos carbonila em grupos éster, indicando ligações residuais éster-ácidos hidroxicinâmicos, como esterificados a unidades *p*Ca e FA nos extratos fenólicos (Xu et al., 2005).

A região espectral entre  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $800\text{ cm}^{-1}$  fornece informações sobre os polissacarídeos presentes nas amostras. Cada tipo de polissacarídeo apresenta uma banda máxima específica na região de  $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  e é dominada por vibrações de anel aromático sobrepostas

por vibrações de estiramento (C-OH) dos grupos laterais e (C-O-C) de vibração das ligações glicosídicas (Nie et al., 2013).

Na região de 1050-950  $\text{cm}^{-1}$ , as amostras de celulose e xilose apresentaram estiramento forte em 1020  $\text{cm}^{-1}$  e 1032  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, característico da ligação C-O, C=C e C-C-O. A amostra de lignina Pepper apresentou estiramento fraco em 1009  $\text{cm}^{-1}$  característico da ligação C-O proveniente da formação de álcool primário.

Na região de 950-800  $\text{cm}^{-1}$  a amostra de xilose apresentou estiramento forte em 928 e 901  $\text{cm}^{-1}$ . A amostra de lignina Pepper apresentou deformação em 828  $\text{cm}^{-1}$  característica da ligação C-H. As frações apresentaram estiramento entre 812  $\text{cm}^{-1}$  e 835  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a remoção de compostos da lignina, visto que a banda em 835  $\text{cm}^{-1}$  é característica de unidades *p*-hidroxifenila.

### 6.2.1.2 Tamanho e formato dos compostos

A massa molar média (Mw) e a polidispersividade (PD) da macromolécula de lignina são comumente determinadas por cromatografia em permeação em gel (GPC) e dependem muito da configuração experimental utilizada, bem como do método de calibração aplicado (Constant et al., 2016).

Para elucidação de tamanho e forma dos compostos fenólicos extraídos no presente trabalho, a distribuição da massa molar e a polidispersividade foram determinadas utilizando duas técnicas distintas: cromatografia em permeação em gel (Gel Permeation Chromatography - GPC) e espalhamento de raios-X de baixo ângulo (Small Angle X ray Scattering - SAXs).

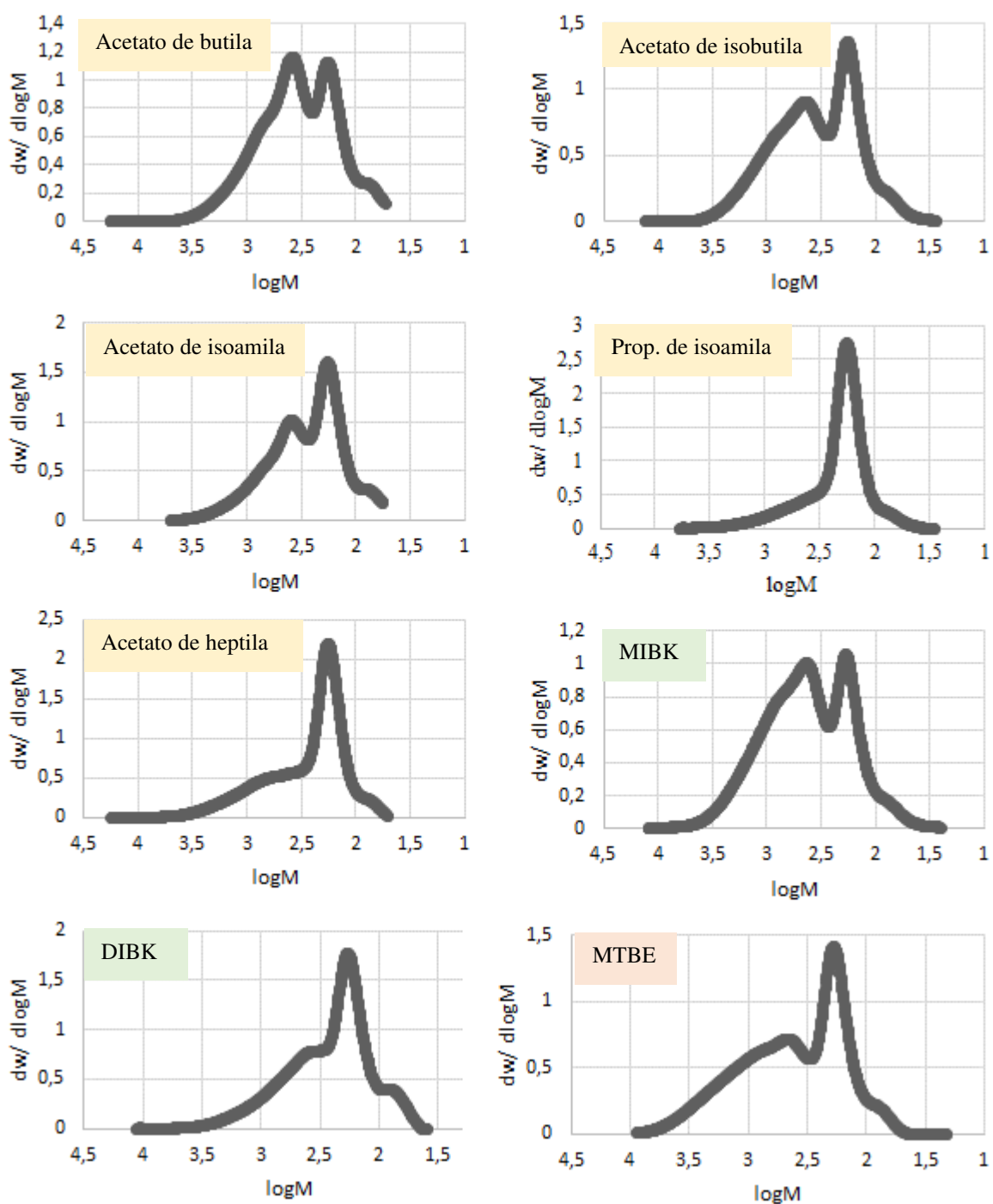
De acordo com Doherty and Mousavioun, (2010), a lignina proveniente do processo alcalino de bagaço (170°C por 1,5 h) possui massa molar média de 2410 Da e a literatura reporta que quanto mais severo o processo para obtenção da lignina, maior a condensação dos compostos de baixa massa molar, resultando em correntes mais recalcitrantes com frações de lignina com maior massa molar (Constant et al., 2016; Ragauskas et al., 2014; Rinaldi et al., 2016). Contudo, a análise feita no presente trabalho leva em consideração as características dos fragmentos fenólicos de lignina solubilizados durante o pré-tratamento ácido diluído e extraídos do hidrolisado hemicelulósico por diferentes solventes orgânicos sendo, certamente, frações de menor massa molar.

A **Tabela 13** apresenta os valores de Mn, Mw e PD obtidos pela análise cromatográfica das frações fenólicas extraídos do hidrolisado hemicelulósico. Os cromatogramas contendo os perfis de polidispersão das frações fenólicas extraídas são reportadas na **Figura 32**.

**Tabela 13.** Médias de massa molar (Mn e Mw) e polidispersividade (PD) para as frações fenólicas extraídos do hidrolisado hemicelulósico definidas por GPC.

<b>Amostras extraídas</b>	<b>Mn (g/mol)</b>	<b>Mw (g/mol)</b>	<b>PD</b>
Acetato de butila	233	480	2,1
Acetato de isobutila	246	523	2,1
Acetato de isoamila	219	405	1,9
Propionato de isoamila	182	290	1,6
Acetato de heptila	213	430	2,0
MIBK	285	652	2,3
DIBK	199	389	2,0
MTBE	276	725	2,6

**Figura 32.** Perfil de polidispersão dos compostos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando-se distintos solventes orgânicos.



O propionato de isoamila resultou na extração de 34% dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico, e de acordo com os dados da **Tabela 13** e **Figura 32**, esses compostos apresentam a maior parcela das moléculas com massa molar em torno de 179 g/mol, sendo a menos polidispersa entre as frações extraídas (PD = 1,6), apresentando perfil de polidispersividade com um pico único de amplitude relativamente baixa.

Os compostos extraídos com acetato de isoamila (PD = 1,9) apresentam perfil de polidispersão (**Figura 32**) com parte das moléculas com massa molar em torno de 179 g/mol e outra parte com massa molar em torno de 386 g/mol. Alguns componentes apresentaram massa molar menor (70 g/mol) e uma curva em forma de ombro indicando outros componentes de maior massa molar (~ 701 g/mol), representando que o acetato de isoamila extraiu um range mais abrangente de compostos fenólicos, dentre os 70% dos fenólicos extraídos do hidrolisado.

Já os compostos extraídos pelo solvente DIBK (PD = 2,0), apresentam perfil de polidispersividade com um pico único, porém apresentando formas de “ombros”. O perfil representa que a maioria das moléculas extraídas por esse solvente tem massa molar em torno de 182 g/mol, com alguns componentes de menor massa molar (70 g/mol) e outros de maior massa molar (389 g/mol), tendo eficiência de extração de apenas 20% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

Com polidispersividade de 2,0, os compostos extraídos com acetato de heptila apresentam perfil de distribuição contendo um pico e um “ombro largo” representando que a maioria das moléculas extraídas por esse solvente tem massa molar em torno de 177 g/mol, com alguns componentes de menor massa molar (68 g/mol) e outros de maior massa molar (com média de ~701 g/mol. Por se tratar de um “ombro” mais arrastado, a massa molar da faixa é variável), tendo extraído 23% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

Os compostos extraídos pelo solvente acetato de butila (PD = 2,1) apresentam perfil de polidispersividade com dois picos de baixa amplitude, mas que se sobrepõem. O perfil representa que uma parte das moléculas extraídas por esse solvente tem massa molar em torno de 179 g/mol e outra parte tem massa molar em torno de 383 g/mol, sendo a parte com maior massa molar com uma dispersão maior, incluindo moléculas de até 701 g/mol indicado por um leve ombro no pico de maior massa molar. O pico de massa molar em torno 179 g/mol é mais bem definido, e a amostra ainda apresenta alguns componentes de menor massa molar (70 g/mol), representado por um pequeno “ombro” ao final do perfil de distribuição de massa molar, tendo o solvente extraído 44% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

O acetato de isobutila (PD = 2,1) apresenta perfil de polidispersividade com dois picos, um de baixa amplitude representando moléculas com massa molar em torno de 179 g/mol



e outro pico menor, representando moléculas maiores com pico de massa molar em torno de 442 g/mol. Além disso é observado um ombro de maior massa molar em torno de 701 g/mol que se arrasta até massas molares maiores. A amostra ainda apresenta alguns componentes de menor massa molar (70 g/mol), representado por um pequeno ombro ao final do perfil de distribuição de massa molar, tendo extraído 47% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

Os compostos extraídos pelo solvente MIBK (PD = 2,3) apresentam perfil de polidispersividade com parte das moléculas com massa molar em torno de 185 g/mol e outra parte com massa molar em torno de 425 g/mol, com alguns componentes de menor massa molar (70 g/mol) e um ombro indicando outros componentes de maior massa molar (~ 701 g/mol), tendo sido extraído 34% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

Já o MTBE (PD = 2,6) apresenta perfil de polidispersividade com parte das moléculas com massa molar em torno de 187 g/mol e outra parte menor com massa molar em torno de 456 g/mol, com alguns componentes de menor massa molar (70 g/mol) e um ombro indicando outros componentes de maior massa molar (~ 701 g/mol), tendo sido extraído 37% dos fenólicos presentes no hidrolisado.

Os distintos solventes empregados na extração dos compostos fenólicos presentes no hidrolisado hemicelulósico resultaram em distintas seletividades quanto a massa molar dos compostos extraídos. O propionato de isoamila resultou na extração dos compostos preferencialmente de menor massa, em relação aos demais solventes, apresentando a menor polidispersividade. Um comportamento oposto foi observado para o MTBE com extração de compostos com massa molar média em torno de 725 g/mol e polidispersividade de 2,6.

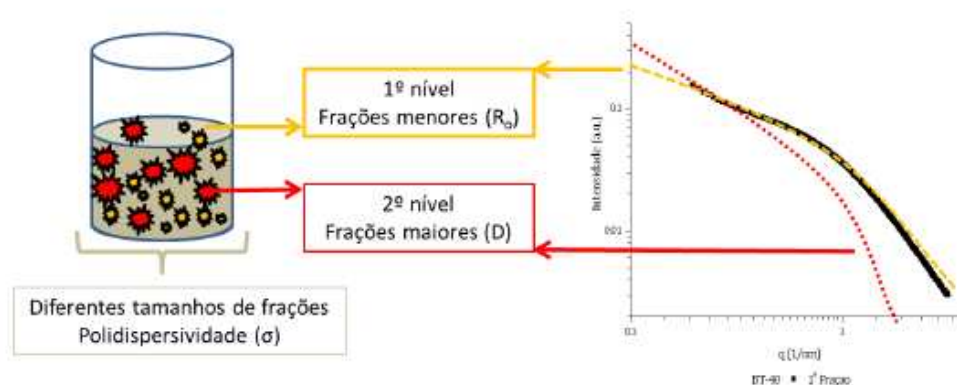
A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é uma técnica analítica não destrutiva empregada para analisar a forma e o tamanho de partículas de dimensões nanométricas, através da análise da forma com que a radiação é espalhada pelo objeto. A radiação ( $\lambda$ ) é emitida da fonte e incide paralelamente sobre a amostra, onde ocorre o espalhamento ( $\lambda'$ ), que será coletado por um detector. A técnica opera baseada no princípio de interferência construtiva considerando o espalhamento completamente elástico ( $\lambda = \lambda'$ ).

O SAXS é uma técnica amplamente usada para caracterização estrutural de nanopartículas em solução, principalmente proteínas, entretanto tem sido utilizada para possibilitar o acesso a características da lignina como forma, tamanho, distribuição de tamanho em um estado próximo a sua forma natural (em solução) (Maziero et al., 2012)(Maziero et al., 2012).

De acordo com a **Figura 33**, a lignina em solução apresenta duas populações de tamanhos distintos, consistindo em moléculas isoladas de baixa massa molar (1 nível) e um

cluster molecular formado por agregados fractais (2° nível), envoltos por um solvente de densidade eletrônica homogênea (Negrão, 2015).

**Figura 33.** Representação esquemática das duas populações de lignina e suas contribuições para o espalhamento de raios- X.



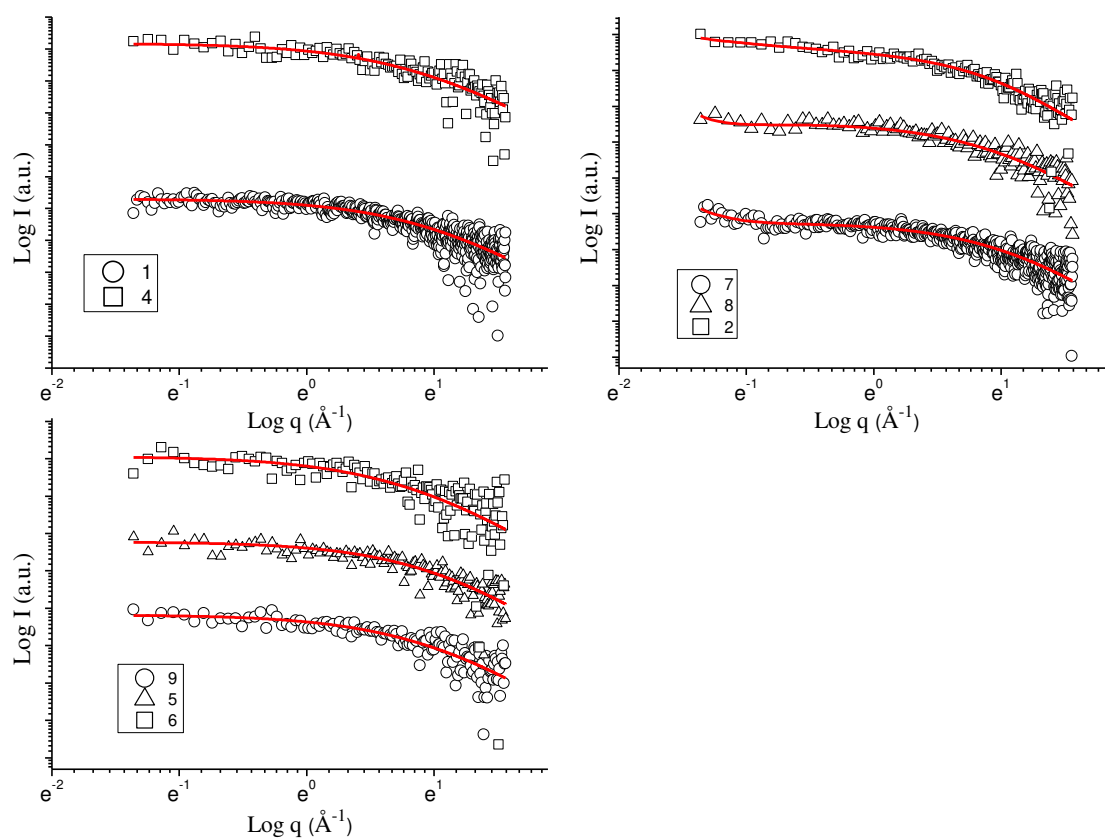
Fonte: (Negrão, 2015).

Brenelli et al., (2016) e Negrão, (2015), reportam que as moléculas de lignina são descritas como discos de diferentes larguras e possuem uma distribuição radial caracterizada por uma distribuição lognormal.

É possível observar pela **Figura 33** que a curva de espalhamento possui duas regiões de “inclinação” características. A primeira correspondendo a moléculas de maior massa molar que formam agregados fractais, devido a tendência de aumento na intensidade de espalhamento na região de baixo  $q$  (2° nível), enquanto a segunda região abrange as moléculas de lignina de baixa massa molar, com contribuições de 1° nível na região de espalhamento de alto  $q$ .

A **Figura 34** apresenta os ajustes dos dados de espalhamento de raio-X de baixo ângulo para as frações fenólicas extraídas do hidrolisado hemicelulósico por distintos solventes orgânicos. Nesta figura as curvas experimentais são representadas por símbolos, enquanto as curvas simuladas pelo SASfit são representadas por linhas sólidas vermelhas.

**Figura 34.** Dados de SAXs normalizados em log (I) versus log (q) para os distintos extratos fenólicos do hidrolisado hemicelulósico.



1- MIBK; 2- MTBE; 4- Acetato de isobutila; 5- Acetato de isoamila; 6- Propionato de isoamila; 7- DIBK; 8- Acetato de heptila, 9- Acetato de butila.

A **Tabela 14** apresenta os parâmetros estruturais para os extratos fenólicos provenientes do hidrolisado hemicelulósico.

**Tabela 14.** Parâmetros estruturais obtidos através de espalhamento de SAXs para os compostos fenólicos.

Parâmetros	Acetato de butila	Acetato de isobutila	Acetato de isoamila	Propionato de isoamila	Acetato de heptila	MIBK	DIBK	MTBE
<b>R<sub>g</sub></b> (Å)	-	-	-	-	27,80	-	18,53	133,48
<b>D</b>	-	-	-	-	3,50	-	3,50	1,50
<b>σ</b>	0,52	0,51	0,47	0,54	0,44	0,47	0,42	0,33
<b>r</b> (Å)	0,30	0,35	0,34	0,32	0,40	0,37	0,39	0,58
<b>ρ</b>	0,056	0,037	0,048	0,037	0,042	0,05	0,045	0,031
<b>χ<sup>2</sup></b>	2,00	2,02	1,67	1,90	2,18	2,32	2,16	2,23

R<sub>g</sub> (Å): raio de giro dos agregados, representando então um parâmetro relacionado as contribuições de segundo nível e estando relacionado a forma da molécula de acordo com a sua liberdade de rotação.

D: dimensão fractal dos agregados, tendo que o valor igual a 4 corresponde a uma esfera perfeita contendo uma superfície lisa. Quanto menor e mais distante o valor desse parâmetro, assume-se que a amostra possui uma estrutura mais rugosa e ramifica na solução empregada para análise.

σ: polidispersividade.

r (Å): parâmetro atrelado as contribuições de primeiro nível e reporta o raio das moléculas menores no qual assume-se possuem formatos de discos.

ρ: parâmetro global que reporta a densidade eletrônica entre a amostra e o solvente,

χ<sup>2</sup>: ajuste de dados.

De acordo com a **Tabela 14** a discrepância relativa entre o ajuste teórico e os valores experimentais (parâmetro  $\chi^2$ ) foi similar para as amostras, tendo o acetato de isoamila com menor valor e mais próximo de 1 (curvas idênticas teriam um  $\chi^2$  igual a 1), e o MIBK com a maior discrepância.

Assim como reportado por Brenelli et al., (2016), moléculas maiores apresentam um modelo de fractal enquanto as moléculas pequenas são ajustadas como discos.

De acordo com a **Tabela 14** somente os extratos fenólicos oriundos da extração do hidrolisado hemicelulósico com MTBE, DIBK e acetato de heptila apresentam uma população de moléculas com tamanhos maiores e menores, possuindo então estruturas com contribuição de fractal e de discos.

De acordo com os valores do parâmetro D, no qual avalia a dimensão fractal das amostras e obtém-se informações sobre a ramificação das partículas (tendo que quanto mais lisas mais próximo de 4 encontra-se o parâmetro), os compostos fenólicos extraídos com MTBE apresentaram maior tendência de terem fragmentos maiores e com ramificações, enquanto o parâmetro D para DIBK e acetato de heptila apontam a presença de fragmentos maiores, preferencialmente sem ramificações ou com baixo percentual de ramificações.

A presença de ramificações nas estruturas fenólicas é um parâmetro pouco estudado na literatura, entretanto apresenta-se de extrema importância, visto que a presença de ramificações com distintos grupos funcionais pode resultar em acréscimo nas interações fenólicas-membrana celular.

Em relação ao raio médio das moléculas pequenas ( $r$  (Å)), considerando discos achatados, tem-se que dentre a parcela das moléculas pequenas (contribuição de 1º nível) o MTBE possui moléculas com estruturas de raios médios maiores em relação as demais extraídas por outros tipos de solvente. Em ordem crescente de grandeza tem-se acetato de butila < propionato de isoamila < acetato de isoamila < acetato de isobutila < MIBK < DIBK < acetato de heptila < MTBE.

A técnica de SAXs também permite a avaliação da polidispersividade dos extratos fenólicos em solução, entretanto em ordem numérica não coincidem com a polidispersão reportada pela técnica de GPC (**Tabela 13**). Ao analisarmos os perfis de polidispersão é possível observar que os compostos que apresentam contribuição de moléculas maiores são os que apresentam ombros largos no perfil de GPC (**Figura 32**) e quando se observa perfis contendo dois ou mais picos distintos (ainda que sobrepostos) pelo SAXS são apresentados pela técnica de SAXS como com menor polidispersão.

Em ordem decrescente de polidispersividade determinado por GPC tem-se MTBE > MIBK > acetato de isobutila > acetato de butila > acetato de heptila > DIBK > acetato de isoamila > propionato de isoamila, e já para os valores determinados por SAXS: MTBE > DIBK > acetato de heptila > acetato de isoamila = MIBK > acetato de isobutila > acetato de butila > propionato de isoamila.

### 6.2.1.3 Ligações interunidades e razão S:G:H

A literatura reporta que a toxicidade dos compostos geralmente não segue um padrão básico de classificação, entretanto os grupos ligados aos anéis podem ser direcionadores do grau de toxicidade (Adeboye et al., 2014).

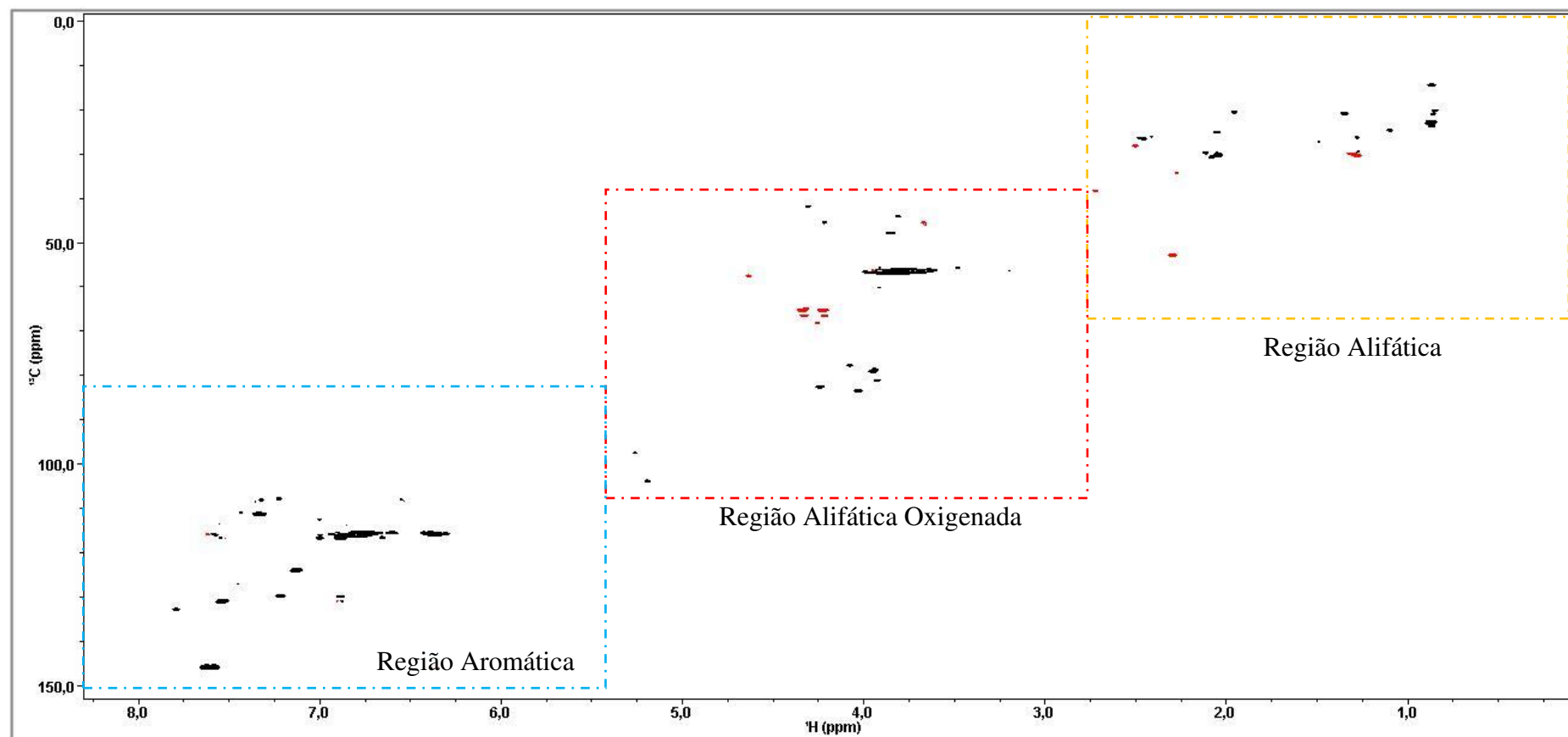
Larsson et al., (2000), reportaram que o efeito inibitório de hidroximetóxi-benzaldeídos, no qual conclui-se que a posição dos grupos substituintes está intimamente ligada ao efeito inibitório.

Com base nesse preceito, os extratos fenólicos foram caracterizados quanto as ligações interunidades, quanto aos presentes e quanto a classificação percentual em termos dos padrões de substituição dos anéis aromáticos das unidades percussoras siringila (S), guaiacil (G) e *p*-hidroxifenila (H).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (HSQC) é uma ferramenta poderosa na análise qualitativa e quantitativa das estruturas da lignina, no qual promove a superposição dos sinais do RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e revela as unidades aromáticas e as distintas ligações interunidades presentes na lignina (Mansfield et al., 2012).

O espectro pode ser dividido em três regiões: a região alifática, a região alifática oxigenada e a região aromática, conforme reportado na **Figura 35**.

**Figura 35.** Mapa de contorno completo 2D HSQC de frações fenólicas de bagaço de cana-de-açúcar extraídas de hidrolisado hemicelulósico (evaporado) com MIBK.



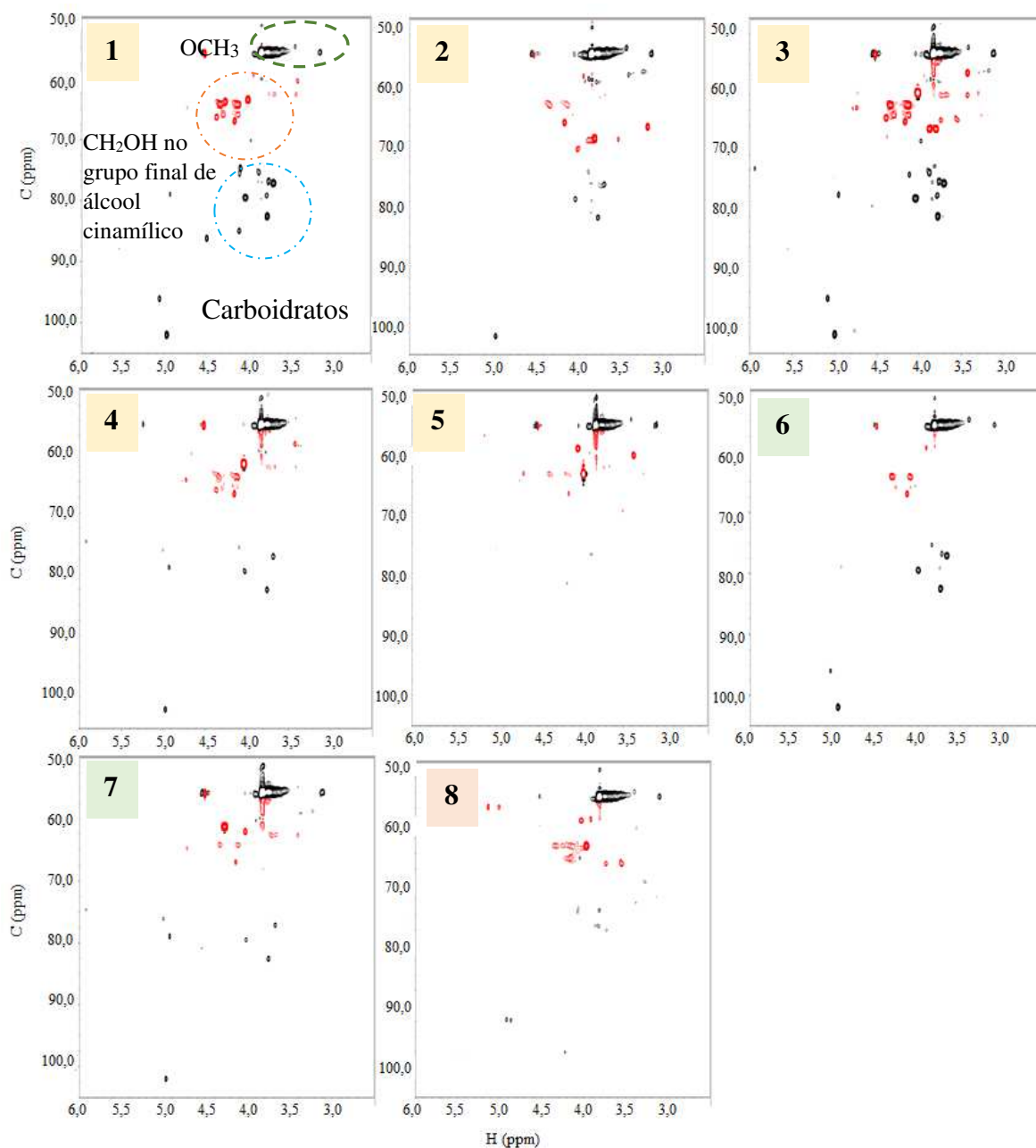
A região alifática não fornece informações estruturais da lignina, enquanto a região alifática oxigenada é marcada pela presença de sinais correspondentes aos grupos acetil ligados aos polímeros da lignina, bem como os grupos acetil ligados aos componentes hemicelulósicos.

A fração fenólica proveniente da extração L-L com butanol não foi reportada devido a sobreposição dos sinais atrelado a presença de um percentual elevado de carboidratos.

A região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$  50–90/2.5–6.0) e a região aromática/insaturada ( $\delta_C/\delta_H$  90–150/6.0–8.0) do espectro de HSQC são reportados nas Figuras **36** e **37** respectivamente.



**Figura 36.** Região alifática oxigenada ( $\delta_C/\delta_H$  50–105/ 2,5– 6,0) no espectro de RMN 2D HSQC dos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes acetato de butila (1); acetato de isobutila (2); acetato de isoamila (3); propionato de isoamila (4); acetato de heptila (5), MIBK (6), DIBK (7); MTBE (8).

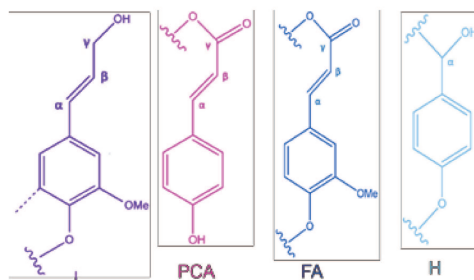
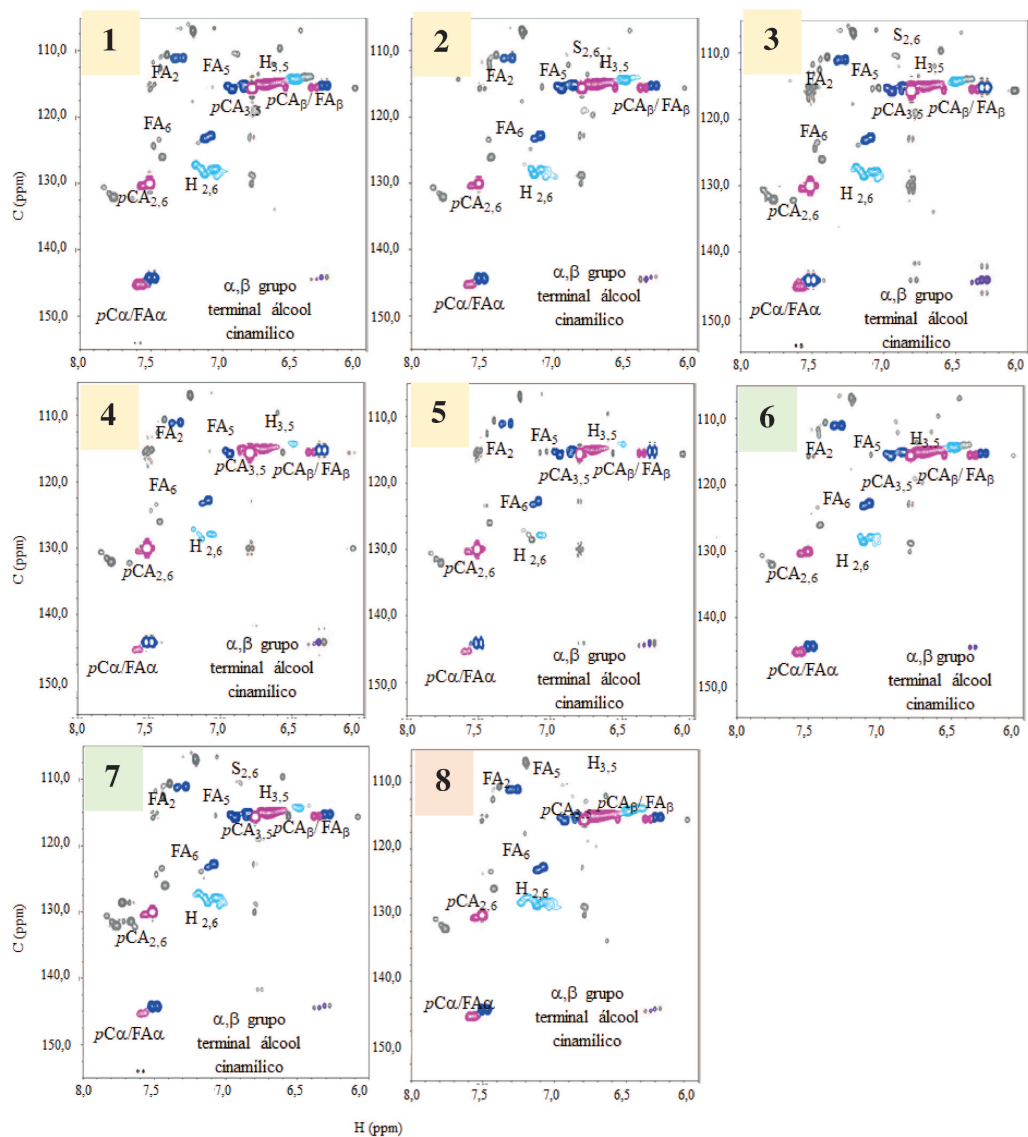


Os picos de correlação dos grupos metoxil são os sinais mais proeminentes dentro do espectro da região alifática oxigenada em  $\delta_C/\delta_H$  5,7/3,83 (**Figura 36**). Os sinais de carboidratos são detectados para todas as amostras em uma faixa de  $\delta_C/\delta_H$  75–85/3,5–4,0 ppm, bem como correlações anoméricas bem resolvidas na região do espectro entre  $\delta_C/\delta_H$  92–101/4,8– 5,1 ppm (Rencoret et al., 2009), enquanto o CH<sub>2</sub>OH no grupo terminal do álcool cinamílico foi detectado na região entre  $\delta_C/\delta_H$  64-67/ 4,3-4,1 ppm.

Os principais picos de correlações de aromáticos do espectro de HSQC são reportados na **Figura 37**. Esses picos são correspondentes aos anéis aromáticos e cadeias laterais insaturadas das distintas unidades da lignina e hidroxinamatos (del Río et al., 2015).

Os fragmentos fenólicos liberados no hidrolisado hemicelulósico apresentam sinais típicos e correspondentes as estruturas *p*-cumarato (*p*Ca) e ferulato (FA).

**Figura 37.** Região aromática/insaturada ( $\delta_C/\delta_H$  105–155/ 6,0–8,0) do espectro de RMN 2D HSQC dos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes: acetato de butila (1); acetato de isobutila (2); acetato de isoamila (3); propionato de isoamila (4); acetato de heptila (5), MIBK (6), DIBK (7); MTBE (8);



De acordo com a **Figura 37**, a região aromática do espectro de HSQC apresenta correlações de estruturas H, S, *p*-cumaratos (*p*Ca) e ferulatos (FA).

A unidade S é representada por um sinal proeminente das correlações C<sub>2,6</sub>-H<sub>2,6</sub> em  $\delta_C/\delta_H$  109,65- 6,58. A correlação FA<sub>5</sub> sobrepõe as correlações *p*CA<sub>3,5</sub> e H<sub>3,5</sub>. Os sinais de ácido ferúlico (FA) e do ácido *p*-cumárico (*p*Ca) são bem intensos em todas as amostras, representado pelo sinal *p*Ca  $\alpha$ / FA $\alpha$ .

Acetato de heptila, DIBK, acetato de isoamila e propionato de isoamila apresentam sinais FA $\alpha$  com intensidade bem mais significativa do que para *p*Ca $\alpha$ .

Em gramíneas, o complexo lignina-carboidrato (LCC) é formado por pontes de ligações entre unidades ferulato (FA) com a lignina por ligações  $\beta$ -X, 4-O-X ou 5-X e ligadas a hemiceluloses por meio de ligações do tipo éster (Ralph et al., 1995).

Sinais provenientes das ligações C $\alpha$ H $\alpha$  e C $\beta$ H $\beta$  de grupos terminais do álcool cinâmico são separadamente distribuídos na região  $\delta_C/\delta_H$  144,0-144,3/6,3-6,2 ppm, no espectro de HSQC. As atribuições das correlações <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H dos picos do 2D HSQC para os fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar são reportados na **Tabela 15** e as integrações dos picos são reportados na **Tabela 16**.

**Tabela 15.** Atribuições dos picos de correlação de lignina  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  nos espectros 2D HSQC de frações fenólicas extraídas de hidrolisado hemicelulósico.

Identificação	$\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Atribuições
-OCH <sub>3</sub>	55,6/3,75	C–H na metoxila
	61,3/4,08	CH <sub>2</sub> OH em grupo terminal do álcool cinâmico ( <b>I</b> )
FA <sub>2</sub>	111,0/7,32	C <sub>2</sub> –H <sub>2</sub> em ácido ferúlico (FA)
<i>p</i> Ca <sub><math>\beta</math></sub> /FA <sub><math>\beta</math></sub>	115,6/6,4 e 115,2/6,27	C <sub><math>\beta</math></sub> –H <sub><math>\beta</math></sub> em ácido <i>p</i> -cumárico livre ( <b>pCa</b> ) e C <sub><math>\beta</math></sub> –H <sub><math>\beta</math></sub> em ácido ferúlico livre (FA)
H <sub>3,5</sub>	115,13/6,70	C <sub>3,5</sub> –H <sub>3,5</sub> em unidades <i>p</i> -hidroxifenila ( <b>H</b> )
FA <sub>5</sub>	115,13/6,87	C <sub>5</sub> –H <sub>5</sub> em ácido ferúlico (FA)
<i>p</i> CA <sub>3,5</sub>	115,5/6,77	C <sub>3</sub> –H <sub>3</sub> e C <sub>5</sub> –H <sub>5</sub> em ácido <i>p</i> -cumárico ( <b>pCa</b> )
FA <sub>6</sub>	122,3/7,08	C <sub>6</sub> –H <sub>6</sub> em ácido ferúlico (FA)
H <sub>2,6</sub>	127,5/7,16	C <sub>2,6</sub> –H <sub>2,6</sub> em unidades <i>p</i> -hidroxifenila ( <b>H</b> )
<i>p</i> CA <sub>2,6</sub>	129,8/7,50	C <sub>2</sub> –H <sub>2</sub> e C <sub>6</sub> –H <sub>6</sub> em ácido <i>p</i> -cumárico ( <b>pCa</b> )
<i>p</i> Ca <sub><math>\alpha</math></sub>	143,9/7,48	C <sub><math>\alpha</math></sub> –H <sub><math>\alpha</math></sub> em <i>p</i> -cumárico ( <b>pCa</b> )
FA <sub><math>\alpha</math></sub>	144,46/7,50	C <sub><math>\alpha</math></sub> –H <sub><math>\alpha</math></sub> em ácido ferúlico (FA)
<u>Sinais de polissacarídeos</u>		
X <sub>5</sub>	63,2/3,26 e 3,95	C <sub>5</sub> –H <sub>5</sub> em $\beta$ -D-xilopiranosídeo
X <sub>2</sub>	72,9/3,14	C <sub>2</sub> –H <sub>2</sub> em $\beta$ -D-xilopiranosídeo
X <sub>3</sub>	74,1/3,32	C <sub>3</sub> –H <sub>3</sub> em $\beta$ -D-xilopiranosídeo
X <sub>4</sub>	75,6/3,63	C <sub>4</sub> –H <sub>4</sub> em $\beta$ -D-xilopiranosídeo

De acordo com os dados do 2D NMR, tanto o acetato de isoamila quanto o propionato de isoamila resultam em extração preferencial de unidades *p*Ca (versus FA). Entretanto, os dados de pirólise analítica Py (TMAH) -GC/MS indicam que o propionato de isoamila apresenta-se melhor (*p*Ca/FA=20,04 versus 3,7).

MIBK e acetato de isobutila apresentaram preferencial extração de unidades *p*Ca versus FA.

O espectro de 2D HSQC mostra que o pré-tratamento com ácido diluído solubiliza preferencialmente unidades *p*-hidroxicinamatos. O pré-tratamento com ácido diluído também resulta em redução das unidades siringila (S) presente no material pré-tratado, liberando fragmentos na fase líquida (Cao et al., 2012).

A parede celular de gramíneas contém ácido ferúlico esterificado a arabinoxilanas com participação na rota de acoplamento oxidativo dos monômeros da lignina para gerar complexos ferulato-polissacarídeo-lignina os quais são ligados a parede celular (Buanafina, 2009), enquanto o ácido *p*-cumárico é covalentemente ligado aos polissacarídeos (menor percentual) e a lignina (maior percentual).

**Tabela 16.** Características estruturais (unidades aromáticas, razão S/G, teor de cinamatos e razão *p*-cumaratos/ferulatos) das integrações dos picos de correlação  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  para o espectro de HSQC das frações fenólicas.

	Acetato de butila	Acetato de isobutila	Acetato de isoamila	Propionato de isoamila	Acetato de heptila	MIBK	DIBK	MTBE
Unidades aromáticas da lignina <sup>a</sup>								
H (%)	82,5	80,5	86,0	83,3	81,4	86,6	78,9	89,4
S (%)	17,5	19,5	14,0	16,7	18,6	13,4	21,1	10,6
<i>p</i> -Hidroxicinamatos <sup>b</sup>								
<i>p</i> -Cumaratos (%)	72,2	64,6	93,0	96,1	89,3	62,0	83,9	75,6
Ferulatos (%)	23,6	34,7	5,5	2,9	9,3	26,6	9,4	17,9
Razão <i>p</i> -cumaratos/ferulatos	3,1	1,9	16,8	32,7	9,6	2,3	8,9	4,2

<sup>a</sup>Expressa como 100 unidades aromáticas (H+G+S=100)

<sup>b</sup>*p*-Cumarato e ferulato expressos como 100 unidades aromáticas (H+G+S+*p*CA+FA = 100)

O bagaço de cana-de-açúcar contém 1,76% *p*Ca e 1,29% de FA bem como menor quantidades de unidades fenólicas, com conteúdo predominantemente constituídos de *p*Ca (69,5–76,4%) ligados por ligações éster aos componentes da parede celular vegetal, principalmente a lignina, enquanto metade do FA (44,0 – 55,0%) é esterificado a parede celular pelas hemiceluloses (Xu et al., 2005).

Sob condições de pré-tratamento ácido as reações majoritárias associadas a lignina são fragmentação das ligações aril éter por acidólise e reações de recondensação catalisadas por ácido, enquanto as ligações do tipo resinol e subunidades fenilcumarana são estáveis.

De acordo com a literatura, as ligações do tipo  $\beta$ -O-4 da lignina apresentam maior susceptibilidade a hidrólise ácida e geralmente a celulignina proveniente do pré-tratamento apresenta menores percentuais dessa ligação, além de um aumento no teor dos grupos OH fenólicos da lignina extraída, supostamente atribuída a quebra das ligações aril éter (Cao et al., 2012).

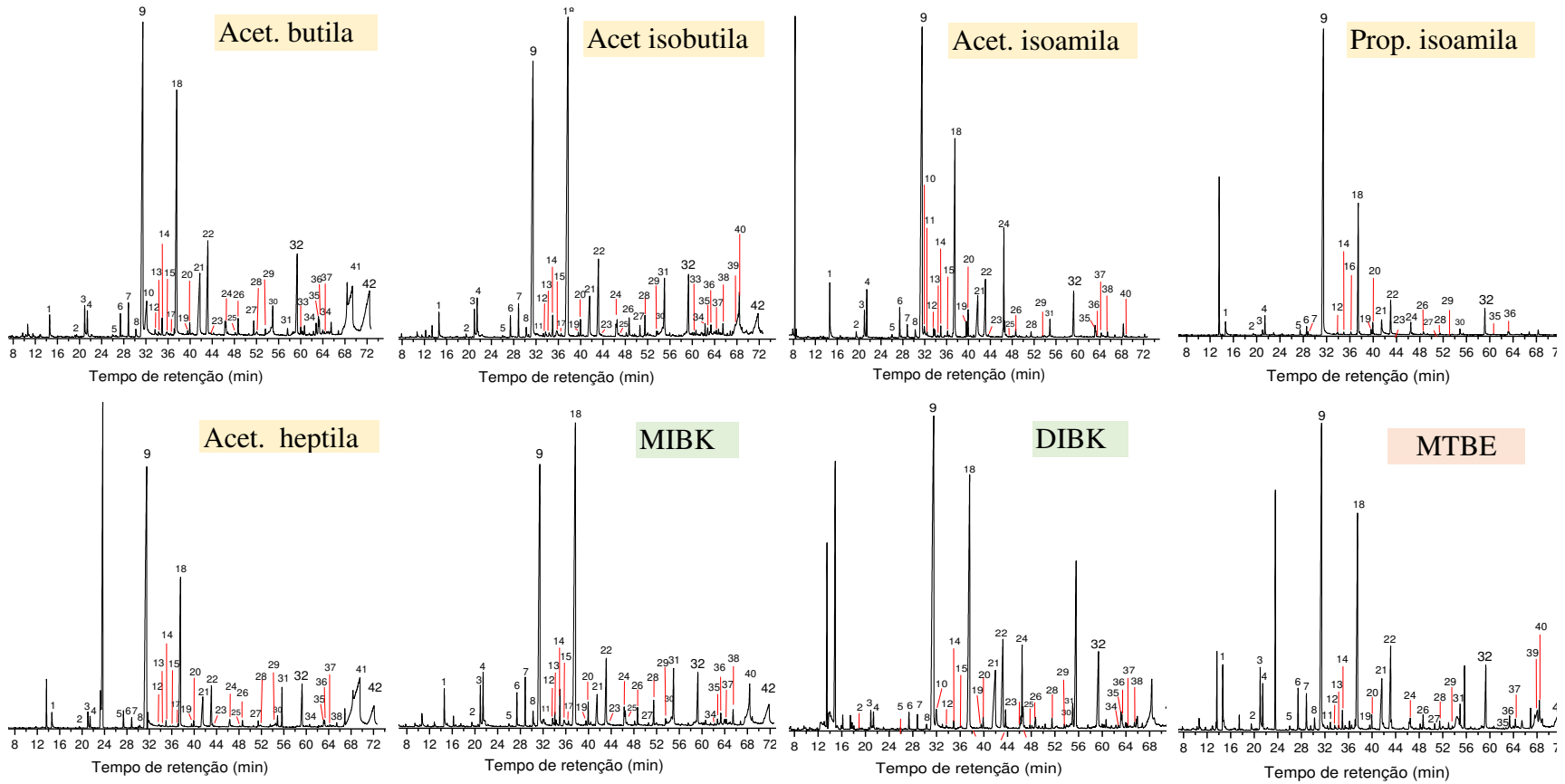
Zhang et al., (2015), reportaram a caracterização da lignina solúvel proveniente do pré-tratamento com 0,05 % (m/m) ácido sulfúrico de madeira no qual era composto majoritariamente por vanilina, benzaldeído, hidrobenzaldeído, 2-metóxi-4-vinilfenol, 2,6-dimetóxi-4-vinilfenol, 4-hidroxi 3,5-dimetóxi-benzaldeído e ácidos benzóicos. Esses compostos indicam a possível oxidação na posição C $\alpha$  e quebra de ligações  $\beta$ -O-4.

A pirólise analítica (Py-GC/MS), também fornece informações sobre a composição da lignina, além de auxiliar na distinção entre produtos derivados de carboidratos e das subunidades principais (guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenila).

Durante a degradação térmica tem-se a quebra de ligações e de substituições de grupos alquil, ligações éter,  $\beta$ -O-4 e C-C, gerando produtos fenólicos derivados das três unidades básicas (S, G, H) e subunidades aromáticas associadas com a quebra de ligações  $\alpha$ - $\beta$  e  $\beta$  (Lou et al., 2010).

Os pirogramas dos extratos fenólicos são apresentados na **Figura 38**. As atribuições e abundâncias molares relativas para os compostos identificados são apresentados na **Tabela 17**. Os compostos aromáticos foram identificados com base no padrão de substituição do anel aromático em relação as três subunidades principais da lignina.

**Figura 38.** Cromatogramas de Py-GC/MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico evaporado empregando solventes orgânicos.





**Tabela 17.** Atribuições e abundâncias relativas dos compostos liberados após Py-GC/MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico (evaporado).

ID	Unidade	Composto	Acet. butila	Acet. isobutila	Acet. isoamila	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	MTBE
1	H	fenol	0,92	1,39	2,91	1,46	0,84	1,58	0	3,51
2	H	2 metil-fenol	0,06	0,13	0,29	0,06	0,07	0,16	0,02	0,22
3	H	4metil-fenol	1,18	1,33	1,46	0,55	1,17	1,55	0,7	3,09
4	G	Guaiacol	0,89	1,61	2,27	2,05	0,62	2,19	0,59	2,25
5	H	2,4 dimetil fenol	0,06	0,05	0,12	0,04	0,05	0,08	0,02	0,11
6	H	4-etil-fenol	0,87	1,15	1,38	0,55	1,07	1,38	0,61	2,52
7	G	4 metil guaiacol	1,31	1,45	0,66	0,25	0,66	2,16	0,54	1,89
8	H	catecol	0,26	0,39	0,3	0	0,12	0,62	0,16	0,61
9	pCa/H	4 vinil fenol	32,95	31,43	45,41	62,01	49,48	28,36	39,67	33,92
10	PS	hidroximetilfurfural	2,18	0	0,37	0	0	0	0,91	0
11	H	3 isopropilfenol	0	0,06	0,16	0	0	0,08	0	0,12
12	S	3 metoxi catecol	0,16	0,16	0,33	0,06	0,05	0,25	0,07	0,19
13	G	3 metil catecol	0,07	0,02	0,09	0	0,02	0,15	0	0,11
14	G	Etil guaiacol	0,06	0,9	0,52	0,21	0,32	1,63	0,31	1,22
15	H	Hidroquinona	0,15	0,36	0	0	0,02	0,39	0,06	0
16	H	2 alil fenol	0	0	0,31	0,26	0	0	0	0
17	H	4 metil catecol	0,04	0,03	0	0	0,01	0,16	0	0
18	G/FA	2 metóxi-4 vinil fenol	21,29	35,34	20,45	17,59	16,4	35,74	24,91	21,78
19	H	4 alil fenol	0,13	0,18	0,73	0,6	0,14	0,16	0,16	0,17
20	S	siringol	0,43	0,69	1,42	1,36	0,31	1	0,42	0,82
21	H	p-hidrobenzaldeído	6,36	3,06	4,06	2,81	3,45	2,39	7,95	6,65
22	G	vanilina	7,49	6	4,91	4,43	3,66	4,65	8,21	8,61
23	G	trans-iso Eugenol	0,03	0,03	0,08	0,96	0,01	0,05	2,87	0
24	H/pCa	p-hidroxiacetofenona	0,19	0,55	5,56	0,09	0,43	0,26	0,43	0,55
25	unk	p-isobutil fenol	0,03	0,05	0,52	0	0,02	0,08	0,05	0
26	G	Acetoguaiacona	0,73	0,89	0,37	0,31	0,39	0,81	0,69	0,98

Continuação da Tabela 17

ID	Unidade	Composto	0,05	0,29	0	0,09	0,06	0,12	0	0,29
27	H	Fenol, 3,5-bis(1,1-dimetiletil)	0,58	1,07	0,26	0,18	0,33	1,23	0,46	0,44
28	G	Guaiacilacetona	0,21	0,16	0,08	0	0,12	0,25	0,14	0,11
29	S/B	3',5'- Dimetóxiacetofenona	0,18	0,16	0	0,58	0,12	0,17	0,09	0
30	G	Ácido Vanílico	1,11	3,08	0,98	0	0,64	2,82	1,24	1,35
31	G	Acetato de Vanilina	6,18	4,67	3,27	3,28	4,08	3,52	6,45	5,67
32	S	Siringaldeído	0,25	0,06	0	0	0	0	0	0
33	G	Metil éster ácido vanílico	0,54	0,24	0	0	0,06	0,37	0,09	0
34	G	Metil éster ácido homovanílico	0,53	0,07	0,3	0,14	0,3	0,01	0,49	0,03
35	G	Coniferaldeído	0,29	0,3	0,09	0,06	0,2	0,45	0,19	0,7
36	S	Acetosiringona	0,06	0,16	0,21	0	0,1	0,21	0,14	0,52
37	H	Metil éster ácido p-hidroxicinâmicos	0	0,51	0,26	0	0,22	0,81	0,17	0
38	S	Ácido homosiríngico	0	1,02	0	0	0	0	0	0,56
39	pCa	Trans- ácido p-cumárico	0	0,11	0,09	0	0	0,17	0	0,2
40	FA	Metil éster ácido ferúlico	3,74	0	0	0	10,93	0	0	0
41	pCa	Ácido p-cumárico	8,41	0,85	0	0	3,54	3,97	1,18	0,83
42	FA	Ácido ferúlico	3,1	5,4	7,1	7,6	4	7,6	2,7	3,8
		S <sup>a</sup> =	49,7	55,7	37,5	48,7	41,9	55	54	41,3
		G <sup>a</sup> =	47,2	38,9	55,4	43,7	54,1	37,4	43,3	55
		H <sup>a</sup> =	0,06	0,1	0,19	0,16	0,1	0,14	0,05	0,09
		Razão S/G <sup>b</sup> =	0,07	0,14	0,13	0,17	0,07	0,2	0,06	0,07
		Razão S/H <sup>b</sup> =	0,05	0,29	0	0,09	0,06	0,12	0	0,29

<sup>a</sup> calculado sem considerar os compostos 4-vinifenol e 4-vinilguaiacol (provenientes também dos ácidos p-cumárico e ferúlico), e utilizando os percentuais molares.

<sup>b</sup> Razão molar, Benzeno; unk- desconhecida

O processo de pirólise libera compostos derivados das unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S). De acordo com a **Tabela 17**, os principais compostos identificados são fenol (1), 4-metilfenol (3), guaiacol (4), 4-etilfenol (6), 4-metilguaiacol (7), 4-vinilfenol (9), 4-etil guaiacol (14), 4-vinil guaiacol (18), siringol (20), *p*-hidrobenzaldeído (21), *p*-hidroxiacetofenona (24), siringaldeído (32), ácido ferúlico (42), dentre outros. Os percentuais das respectivas subunidades também são apresentados na **Tabela 17** e salienta-se que a estimativa das abundâncias relativas das unidades S, G e H, bem como as razões S/G e S/H foram calculadas sem a contribuição dos compostos 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol, que para o caso de gramíneas também podem ser derivados dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico por meio de reações de descarboxilação.

Os resultados indicam que as frações fenólicas são comparativamente escassas em unidades S e enriquecidas nas unidades G e H. A fração extraída empregando-se acetato de isoamila resultou na maior razão S/G, seguido pelo propionato de isoamila e MIBK, como consequência da remoção preferencial de unidades S durante a etapa de extração líquido-líquido.

Estruturas  $C\alpha$ -oxidados foram observadas para todas as frações fenólicas obtidas por meio das extrações empregando-se distintos solventes, conforme observado no pirograma da **Figura 38** (isto é, picos 22: vanilina; 26: acetoguaiacona; 32: siringaldeído; 36: acetosiringona).

A degradação da cadeia lateral propanóide da lignina ocorre entre 230-260°C, com a formação de metil, etil e vinil guaiacol e vanilina (Brebú and Vasile, 2009).

Guaiacol e siringol são produtos de degradação intermediários, e o seu percentual diminui com o aumento da temperatura empregada no processo de pirólise.

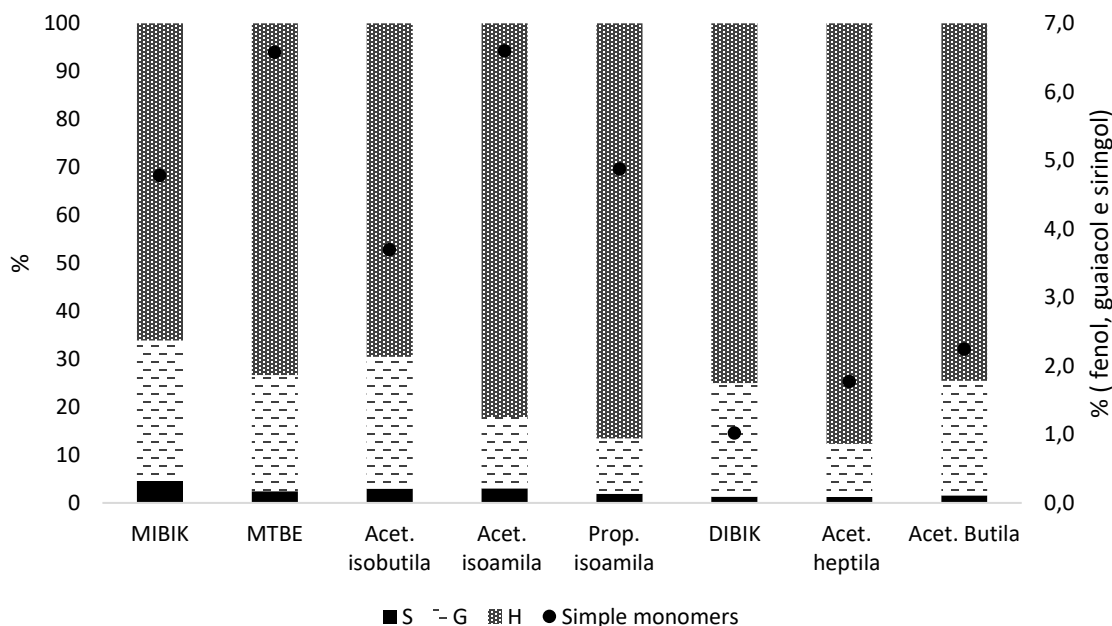
O catecol e seus derivados normalmente não são encontrados na lignina, mas podem ser formados nessa faixa de temperatura como compostos provenientes da degradação secundária das reações de decomposição dos guaiacóis, predominantemente favorecido em reações com longos períodos de residência (Brebú and Vasile, 2009), já a demetilação dos grupos dimetoxi resultam na conversão dois fenóis em pirocatecois entre 350-450°C, quando a processo de pirólise está praticamente finalizada.

A composição da lignina dos grupos de acilação variam de acordo com as classes das plantas (Boerjan et al., 2003). Ligninas provenientes de madeiras de dicotiledônias apresentam unidades G e S e apenas trações de unidades H.

Madeira de poplar, por exemplo, apresenta uma proporção S:G:H de 55:45:1 (Vanholme et al., 2013). A lignina de muitas madeiras duras apresenta-se aciladas por unidade de *p*-hidroxibenzoatos e grupos acetil (Sarkanen and Ludwig, 1971). As ligninas de gramíneas, como as de bagaço de cana-de-açúcar, contêm unidades G, S e uma maior quantidade de unidades H em relação as madeiras dicotiledônias, mas palha de milho por exemplo apresenta uma proporção de G:S:H de 64:30:6 (Bule et al., 2013).

Monômeros simples foram liberados durante a pirólise analítica, como o fenol, guaiacol e siringol, representando até 7 % do percentual da área nas amostras MTBE e acetato de isoamila (**Figura 39**).

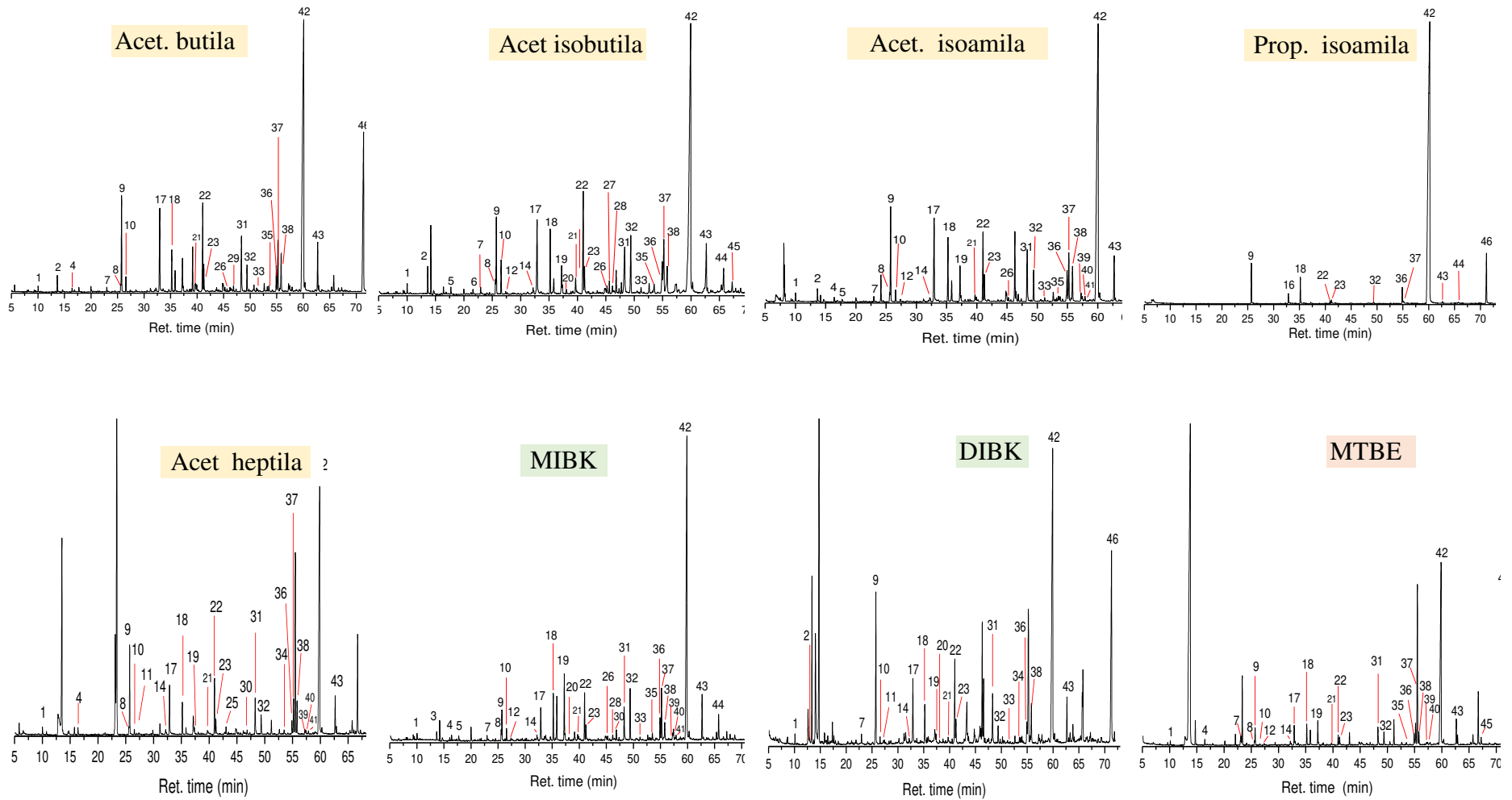
**Figura 39.** Abundância relativa dos derivados S, G e H, e unidades monoméricas simples identificadas no Py-CG-MS (monômeros simples foram reportados como a soma dos percentuais em área de fenol, siringol e guaiacol).



Apesar da eficiência da Py-CG-MS na caracterização da lignina, os processos químicos que ocorrem durante a análise não distinguem os derivados das unidades *p*Ca e H, e FA e G (Brandt et al., 2015).

A pirólise na presença do aditivo hidróxido de tetrametilamônio (Py-TMAH-GC-MS) é um método para a determinação da composição da lignina no qual os percentuais das unidades *p*Ca e H, e FA e G podem ser claramente diferenciados. Os derivados resultantes da pirólise com TMHA são mais robustos, mais resistentes a degradação térmica, facilitando assim a separação cromatográfica. A **Tabela 18** apresenta os compostos identificados e oriundos Py-TMAH-GC-MS, e o pirograma é reportado na **Figura 40**.

**Figura 40.** Cromatogramas de Py-TMAH-GC-MS dos extratos fenólicos provenientes do hidrolisado hemicelulósico empregando os diferentes solventes.



**Tabela 18.** Atribuições e abundâncias relativas dos compostos liberados após Py-TMAH-GC-MS dos extratos fenólicos extraídos do hidrolisado hemicelulósico.

ID	Unidade	Composto	Acet. butila	Acet. isobutila	Acet. isoamila	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	MTBE
1	H	Metoxibenzeno	0,2	0,3	0,3	0	0,4	0,3	0,4	0,2
2	PS	metil éster ácido 2-furancarboxílico	0,3	1	0,5	0	0	0	0,2	0
3	PS	2-metil furoato	0	0	0	0	0	0,4	0	0
4	H	1-metóxi-4-metil benzeno	0,2	0	0,2	0	0,5	0,3	0	0,5
5	unk	dimetil éster ácido butanodiólico	0	0,2	0,1	0	0	0,2	0	0
6	unk	metil éster ácido benzóico	0	0,1	0	0	0	0	0	0
7	H	1-etil-4-metóxi benzeno	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,5	0,2
8	G	1,2-dimetóxi-benzeno,	0,1	0,3	0,2	0	0,2	0,3	0	0,2
9	H	1-etetil-4-metóxi benzeno	4,7	2,9	5	3	6,4	2,4	10,7	1,3
10	G	1,4-dimetóxi-benzeno,	0,2	1,4	0,6	0	0,3	0,7	0,3	0,1
11	unk	2,4-dimetil benzaldeído,	0	0	0	0	0	0	0,1	0
12	unk	1-metóxi-4-(1-metiletil)-benzeno	0	0,1	0,1	0	0	0,1	0	0,1
13	unk	1-metóxi-4-propil-benzeno	0	0	0	0	0	0	0	0
14	G	3,4-dimetóxi-tolueno	0	0,2	0,1	0	0,3	0,2	0,2	0,3
15	unk	4-(1-metiletil) benzaldeído	0	0	0	0	0	0	0	0
16	H	(E ou Z) 1-metóxi-4-(1-propenil) benzeno	0	0	0	0,9	0	0	0	0
17	G	4-metóxi benzaldeído	3,7	4,1	5,7	0	4,2	1,9	4,3	2,1
18	H	(E ou Z) 1-metóxi-4-(1-propenil) benzeno	4,5	2,9	3,7	2,1	2,5	2,6	2,1	2,2
19	S	1,2,3-trimetóxi-benzeno	0	0,2	0,1	0	0,3	0,1	0,3	0,1

Continuação da Tabela 18

ID	Unidade	Composto	Acet. butila	Acet. isobutila	Acet. isoamila	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	MTBE
20	G	4-etil-1,2-dimetóxi benzeno	0	0,1	0	0	0	0,1	0,1	0
21	H	4 metóxi acetofenona	0,1	0,7	0,3	0	0,2	0,2	0,1	0,1
22	G	4-etenil-1,2-dimetóxi benzeno	2	5,7	4,2	0,2	4,6	2,7	5,5	0,9
23	H	metil éster ácido 4-metóxi benzóico	0,9	1,2	1,4	0,3	1,2	0,8	1,2	0,7
24	unk	trans 1-(1-butenil)-4-metóxi benzeno	0	0	0	0	0	0	0	0
25	unk	4-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído	0	0	0	0	0,1	0	0	0
26	unk	metil éster ácido 4-metóxi benzenoacético	0,1	0,3	0,2	0	0	0,2	0	0
27	unk	4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil-fenol	0	0,5	0	0	0	0	0	0
28	unk	2-metóxi-4-(2-propenil) fenol	0	0,3	0	0	0	0,3	0	0
29	unk	1,2-dimetóxi-4-(1-propenil) benzeno	0,2	0	0	0	0	0	0	0
30	unk	metil cis- isoeugenol	0	0	0	0	0,3	0,5	0	0
31	G	3,4-dimetóxi-benzaldeído	1,7	3,3	3,3	0	3	2	2,8	1,9
32	unk	metil trans- isoeugenol	1	3,2	1,8	0,1	1,5	3,1	0,9	1,3
33	H	metil ester ácido 4-metóxi benzenopropanóico	0,1	0,2	0,1	0	0	0,2	0,1	0
34	unk	2,4-dimetóxiacetofenona	0	0	0	0	0,1	0	0,2	0
35	G	1-(3,4-dimetóxiifenil) etanona	0,1	0,3	0,2	0	0	0,3	0	0,3



Continuação da Tabela 18

ID	Unidade	Composto	Acet. butila	Acet. isobutila	Acet. isoamila	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	MTBE
36	pCA	E -3-(4-metóxfenil) - metil éster ácido 2- propenóico	1,8	1,3	1,5	1,3	1	1,2	0,9	1,1
37	G	metil éster ácido 3,4- dimetóxbenzóico	1,3	3,1	3	0,1	3,2	3,1	0	2,5
38	S	3,4,5- trimetóxbenzaldeído	1	1,6	2,1	0	2,6	0,9	2,3	1,1
39	G	1,2-dimetóxi-4-(2- metóxi-1-fenil) benzeno	0	0	0,4	0	0,3	0,2	0	0,2
40	G	metil éster ácido 3,4- dimetóxbenzoacético	0	0	0,1	0	0,2	0,4	0	0,2
41	G	1,2-dimetóxi-4-(2- metóxi-1-fenil) benzeno	0	0	0,2	0	0,2	0,2	0	0
42	pCA	metil éster ácido trans-3- (4-metóxfenil) - 2- propenóico	62,4	35,1	46,7	86,6	40,3	35,4	42,6	43,3
43	S	metil éster ácido 3,4,5- trimetóxbenzóico	1,3	2,3	2,8	0,1	3,4	2,8	3,1	3,2
44	FA	metil éster ácido 3-(3,4- dimetóxfenil) - 2- propenóico	0	0,6	0	0,1	0	1,4	0	0
45	unk	1,2-bis(3,4-dimetóxfenil) 1,2 etanodiona	0	0,2	0	0	0	0	0	0,6
46	FA	metil éster ácido 3-(3,4- dimetóxfenil) -2- propenóico	12,1	26	15,1	5	22,8	34,4	21	35,7

Continuação da Tabela 18

	Acet. butila	Acet. isobutila	Acet. isoamila	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	MTBE
S <sup>a</sup> =	2	3,9	4,4	0,1	5,6	3,6	5	4
G <sup>a</sup> =	11,1	23,1	21,1	0,4	19,3	14,8	15,8	10,4
H <sup>a</sup> =	14,2	11,7	14,8	8,5	15,2	9,9	20,2	7,3
FA <sup>a</sup> =	10,2	23,7	12,7	4,3	19,3	32,7	17,3	32,1
pCA <sup>a</sup> =	62,6	37,7	46,9	86,6	40,6	38,9	41,6	46,2
Razão S/G <sup>a</sup>	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,4
Razão pCA/FA <sup>b</sup>	6,2	1,6	3,7	20	2,1	1,2	2,4	1,4

<sup>a</sup> Abundância molar relativa

<sup>b</sup> Abundância molar relativa para *p*-cumaratos (pico 37 e 44) e abundância molar relativa de ferulatos (picos 46 e 51).

Unk- derivações de unidades de lignina desconhecidas.

O composto 4-vinilguaiacol (18) é derivado dos ferulatos que estão atrelados aos polissacarídeos da parede celular vegetal e o composto proeminente 4-vinilfenol (9) é derivado essencialmente dos ésteres *p*-cumaratos (del Río et al., 2015).

A pirólise analítica na presença de TMAH previne a descarboxilação dos compostos e libera os respectivos metis ésteres dos compostos esterificados (del Río et al., 2015).

De acordo com a **Tabela 18**, o derivado metilado do ácido *p*-cumárico, o trans-3-(4-metóxfenil)-metil éster ácido propenóico (pico 42), bem como quantidades do ácido ferúlico metilado (pico 44) e metil éster ácido 3-(3,4-dimetóxfenil)-2-propenóico (pico 46) foram identificados.

O propionato de isoamila apresentou o maior percentual de razão molar *p*-cumarato/ferulato, correspondente a 20,04, enquanto essa razão é drasticamente diminuída para 1,19 e 1,44 para as frações fenólicas extraídas com MIBK e MTBE respectivamente.

Esses resultados indicam que o propionato de isoamila apresenta maior seletividade para remoção de unidades derivadas de *p*-cumaratos, os quais estão primariamente ligados a macromolécula de lignina, enquanto o MIBK apresenta seletividade direcionada para remoção de ambos derivados.

Compostos de oxidação como o ácido 3,4-dimetóxbenzóico metil éster (pico 37), metil éster 3,4- dimetoxibenzeno ácido acético (pico 40) e 3,4,5- ácido trimetoxibenzóico metil éster (pico 43) são também observados na **Tabela 18**, com abundâncias expressivas para a fração extraída com MIBK e ausência na fração oriunda da extração com propionato de isoamila.

Destaca-se que a literatura reporta resultados dessa análise empregando a lignina residual do material pré-tratado ao invés dos fragmentos fenólicos presentes na fração líquida, como é o foco de abordagem desse presente trabalho.

Zhang et al., (2015), reportaram os resultados de Py-GC/MS do sólido residual de pré-tratamento de madeira (poplar), realizado a 240°C com 0,05 % (m/m) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 min (fator de severidade (Log R<sub>0</sub>) ~ 5,0), no qual concluiu-se que em elevadas temperaturas e com adição de catalisador ácido tem-se o aumento da despolimerização da macromolécula fenólica, resultando não somente na remoção de unidades S como também na promoção de remoção de unidades G.

A remoção preferencial das unidades G e S para a fração aquosa também foi reportado em reações de pré-tratamento auto catalítico em temperaturas acima de 200°C (Laskar et al., 2013).

del Río et al., (2015), reportaram uma caracterização química detalhada de lignina de bagaço de cana-de-açúcar, apresentando um percentual de composição molar H: G: S de 2:38:60.

O percentual molar de unidades guaiacil foi superestimada pela pirólise analítica, apresentando altos percentuais para as amostras 1, 2, 4, 5 e 8, sendo que ligações características da unidade G não foram observadas no espectro de 2D-HSQC.

De acordo com a literatura, as unidades guaiacila são mais difíceis de serem removidas da biomassa do que as unidades siringila durante pré-tratamentos aquosos, devido à grande propensão na formação de ligações covalentes. Além disso, a falta de grupos metoxila na posição C<sub>5</sub> do anel aromático provavelmente iria proporcionar reações de condensação mais facilmente (Lora and Wayman, 1980).

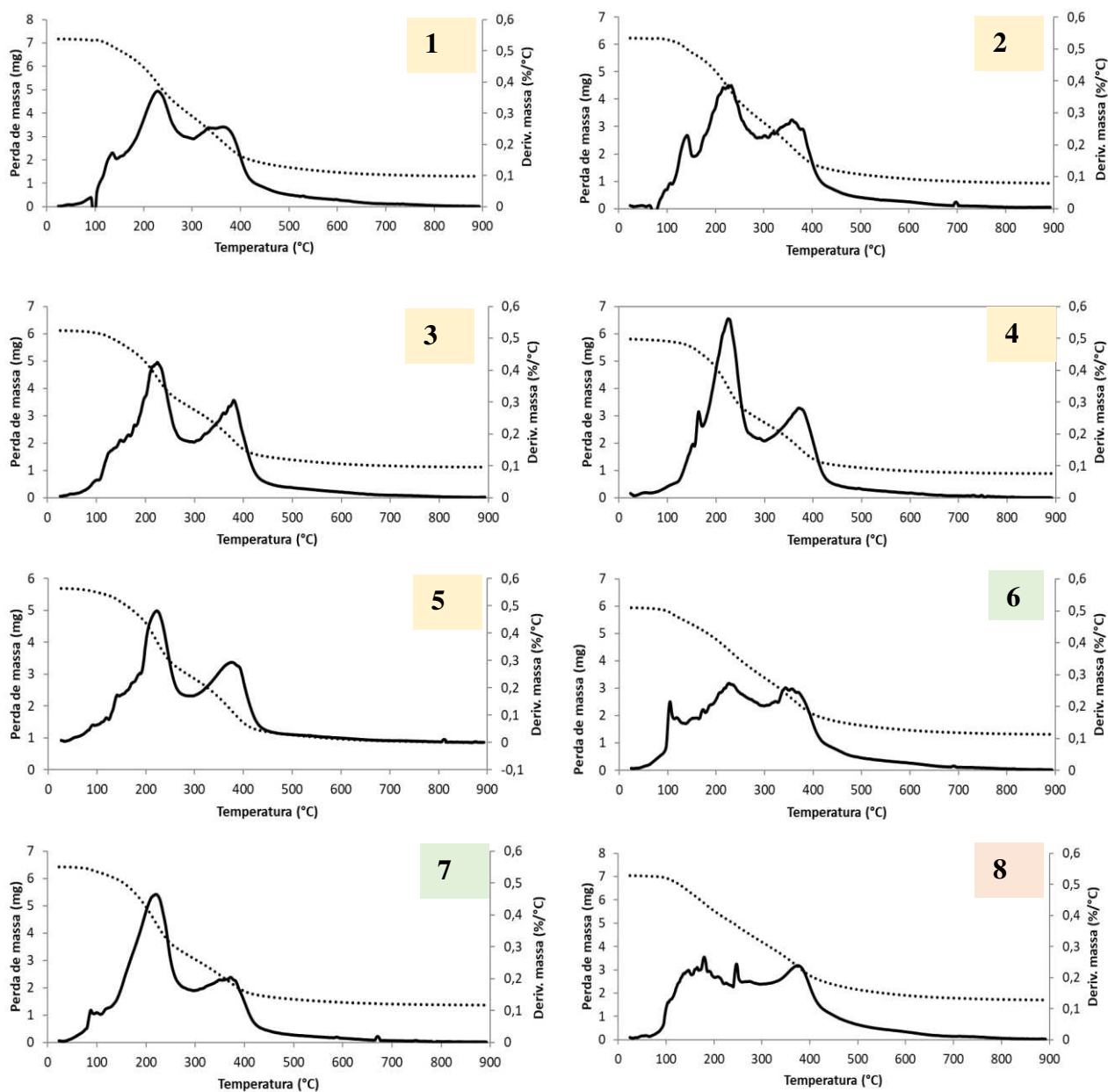
De acordo com os dados do HSQC e PyTMHA-CGMS o pré-tratamento com ácido sulfúrico solubilizou preferencialmente derivados *p*-cumaratos e ferulatos.

#### **6.2.1.4 Perfil de degradação térmico (TGA)**

A análise termogravimétrica (TGA) é amplamente empregada no estudo de decomposição de polímeros sob atmosfera de nitrogênio ou argônio (Brebun and Vasile, 2009).

As curvas de TGA revelam o percentual de perda de massa dos materiais em relação a temperatura de degradação térmica e a primeira derivada (DTG) indica as correspondentes taxas de perda de massa. A avaliação da estabilidade térmica das diferentes frações fenólicas provenientes do hidrolisado hemicelulósico é reportada na **Figura 41**.

**Figura 41.** Termogramas dos extratos fenólicos provenientes do hidrolisado hemicelulósico obtidos em atmosfera oxidante. A curva de TGA é representada pela linha preta e a curva de DTG pela linha tracejada. acetato de butila (1), acetato de isobutila (2), acetato de isoamila (3), propionato de isoamila (4), acetato de heptila (5), MIBK (6), DIBK (7) e MTBE (8).



A estrutura molecular da lignina é heterogênea e composta predominantemente por anéis aromáticos, com inúmeras possibilidades de ramificações, distintos grupos funcionais e ligações químicas, o que estão intimamente ligados a faixa de degradação térmica que abrange desde 100 até 800°C (Gu et al., 2013; Shui Yang et al., 2007).

A degradação da lignina pode ser dividida em três estágios, sendo o primeiro entre 30-120°C e envolvem estruturas físicas primárias como desidratação e processo de volatilização de pequenas moléculas (como os solventes) (Xiao et al., 2001). O segundo estágio ocorre em torno de 120 a 280°C, o qual infere a degradação dos carboidratos presentes nas amostras sendo convertidos em gases voláteis como CO, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, e iniciasse o processo de despolimerização da lignina ou transição vítrea. O estágio final da degradação ocorre em temperaturas acima de 350°C, com a degradação de produtos voláteis derivados da estrutura da lignina, incluindo fenóis, álcoois, aldeídos ácidos (Watkins et al., 2015).

A literatura reporta a presença de inúmeros estágios de perda de massa nas curvas de TG, sendo a primeira atribuída a perda de umidade da amostra de lignina (em torno de 100°C), o qual pode ser observado nos extratos MIBK e DIBK (Domínguez et al., 2008).

Dois ou três eventos térmicos podem ser identificados em todos os termogramas da **Figura 41**, e todas as amostras apresentam o pico máximo de degradação entre 370–390°C, como usualmente reportado na literatura (Collard and Blin, 2014; Naron et al., 2017).

A decomposição da lignina começa em torno de 200-275°C, e o processo principal geralmente ocorre próximo a 400°C, com a formação de hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, fenólicos hidroxílicos e compostos do tipo guaiacil/siringil, tendo a maioria grupos OH fenólicos (Brebú and Vasile, 2009).

Wittkowski et al., (1992), reportaram que a degradação de cadeias laterais da lignina do tipo propanóide ocorrem entre 230 e 260°C com a formação de derivados metil, etil e vinil guaiacol. Enquanto as ligações aril éter podem ser quebradas em temperaturas abaixo de 310 °C devido à baixa estabilidade térmica.

De acordo com Nimz, (1974), mais de 65% das unidades monoméricas de lignina de madeira são conectadas por ligações do tipo  $\beta$ -O-4, com a maior parcela de degradação ocorrendo entre 200 e 600°C. Já as ligações  $\beta$ - $\beta$  e ligações C-C entre as unidades monoméricas da lignina são degradadas entre 275-350°C, enquanto a recombinação dos radicais formados pode ocasionar a formação de unidades guaiacil e siringil.

A decomposição dos anéis aromáticos ocorre em temperaturas acima de 400°C, enquanto a demetoxilação e demetilação dos anéis aromáticos não ocorrem acima de 450°C (Hoareau et al., 2004).

Vallejos et al., (2011), reportaram que o primeiro evento térmico no termograma DTG aparece entre 308 e 435°C, que correspondem respectivamente a quebra das ligações entre as unidades monoméricas da lignina e a geração de fenóis.

Kumar and Pruthi, (2015), reportaram que a decomposição de ácido ferúlico ocorre em uma etapa com a perda de 99,1% de massa (pico DTG em 260°C) entre 200 e 432°C, correspondendo a endoterma em 173°C no termograma do DTA.

De fato, ligninas de madeiras moles são compostas principalmente por unidades G, ligadas por ligações C-C condensadas, reconhecidas por apresentar maior estabilidade térmica em relação a maioria das ligações entre as unidades monoméricas de ligninas de madeira dura e gramíneas (Jakab et al., 1997; Zhao et al., 2014).

Pode-se observar por meio da curva de TGA da **Figura 41** que a degradação térmica das amostras não é iniciada até a absorção de uma quantidade de energia térmica, e que todas as curvas apresentam um perfil de decaimento similar, exceto para a fração fenólica proveniente da extração com MTBE.

Tana et al., (2016), em estudo de ligninas de bagaço de cana durante o processo de produção de etanol de segunda geração observou que a perda de massa de lignina, na curva de TGA, após 500°C, torna-se pouco significativa.

A **Tabela 19** apresenta os valores de temperaturas máximas de degradação (DTG<sub>máx</sub>) para as frações fenólicas provenientes do hidrolisado hemicelulósico.

**Tabela 19.** Valores de temperaturas máximas de degradação (DTG<sub>máx</sub>) para as frações fenólicas provenientes do hidrolisado hemicelulósico.

Amostras	DTG (°C)	
	1° pico	2° pico
Acetato de butila	228,49	364,19
Acetato de isobutila	226,76	356,38
Acetato de isoamila	224,24	380,13
Propionato de isoamila	224,85	370,15
Acetato de heptila	222,66	375,78
MIBK	234,78	356,02
DIBK	220,45	371,86
MTBE	179,43	246,84 / 374,03

O pico máximo da DTG, pode ser interpretado como a medida de decomposição térmica e pode ser utilizado como uma ferramenta de comparação da estabilidade térmica das

frações fenólicas de distintos processos e fontes e de acordo com a **Tabela 19** este pico é encontrado entre 200-250°C para todas as amostras.

A taxa de perda de massa dos extratos fenólicos apresentou um perfil de degradação térmica similar, exceto para o butanol e o MTBE, entre a faixa de 100-400 °C.

Watkins et al., (2015), em estudo de caracterização de ligninas proveniente de diferentes biomassas reportou um DTG máximo de 331,87°C para alfafa; 328,50°C para palha de milho, 336,11°C para palha de pinus.

### 6.3 Conclusões parciais

Os compostos fenólicos extraídos pelos distintos solventes empregados na etapa de destoxificação por extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico evaporado apresentaram distintas características de acordo com a técnica empregada.

O <sup>1</sup>HNMR indicou a presença de subestruturas não oxigenadas e carbonos alifáticos saturados (CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>– hidrocarbonetos) identificados pela presença de picos intensos e característicos na região de 1,25 ppm. Os solventes acetato de isobutila e DIBK mostraram maior seletividade na remoção de compostos alifáticos acetoxílicos em relação aos demais solventes, entretanto não pode ser observada distinta seletividade entre a remoção de fragmentos fenólicos contendo ácidos carboxílicos e aldeídos.

O espectro de infravermelho permite que a maior parcela dos picos característicos e comumente reportados para lignina sejam identificados, onde observou-se que os extratos fenólicos provenientes das extrações com acetato de isoamila, propionato de isoamila, DIBK, e acetato de heptila apresentaram maior intensidade no pico (2930 cm<sup>-1</sup>) atribuído a vibrações de estiramento de C–H de grupos metila e metoxila.

Os compostos extraídos apresentaram massa molar baixa em relação aos usualmente reportados na literatura provenientes de processos alcalinos (extração de lignina), com valor máximo de Mw de 725 g/ mol para o material extraído pelo MTBE. Já o propionato de isoamila resultou na remoção do maior percentual de compostos com massa molar em torno de 179 g/mol, correspondendo a no máximo dímeros de lignina.

Os resultados de SAXs apontaram que somente os extratos fenólicos oriundos da extração com MTBE, DIBK e acetato de heptila, apresentam uma população de moléculas com tamanhos maiores e menores, possuindo então estruturas com contribuição de fractal e de discos, tendo que os provenientes da extração com MTBE apresentam maior tendência de terem fragmentos maiores e com ramificações, enquanto o DIBK e acetato de heptila apontam a



presença de fragmentos maiores preferencialmente sem ramificações ou com baixo percentual de ramificações.

Ambas as técnicas de GPC e de SAXs permitem a avaliação da polidispersividade das amostras, entretanto observou-se tendências distintas tendo em ordem decrescente de polidispersividade determinado por GPC o MTBE > MIBK > acetato de isobutila > acetato de butila > acetato de heptila > DIBK > acetato de isoamila > propionato de isoamila, enquanto para os valores determinados por SAXS: MTBE > DIBK > acetato de heptila > acetato de isoamila = MIBK > acetato de isobutila > acetato de butila > propionato de isoamila.

Os espectros de RMN 2D HSQC apresentaram sinais típicos e correspondentes as estruturas *p*-cumarato (*p*Ca) e ferulato (FA) para todos os extratos fenólicos, confirmando os estiramentos pronunciados na região espectral de 1700-1600 cm<sup>-1</sup> identificados pelo FTIR e provavelmente associados a grupos carbonilas conjugados com anéis aromáticos.

De acordo com os dados do 2D NMR, tanto o acetato de isoamila quanto o propionato de isoamila resultam em extração preferencial de unidades *p*Ca (versus FA). Entretanto, os dados de pirólise analítica Py (TMAH) -GC/MS apontaram o propionato de isoamila como o mais seletivo (*p*Ca/FA = 20,0 versus 3,7).

O percentual molar de unidades guaiacil foi superestimada pela pirólise analítica, apresentando altos percentuais para as amostras 1, 2, 4, 5 e 8, sendo que ligações características da unidade G não foram observadas no espectro de 2D-HSQC.

De acordo com as análises de TGA em torno de 15 a 25% do percentual em massa de todas as amostras da lignina permanecem sem volatilizar a temperaturas de 900°C, devido a formação de estruturas aromáticas altamente condensadas e que possuem habilidade de formação de carvão, tendo que o pico máximo da DTG foi encontrado entre 200-250°C para todas as amostras, podendo-se inferir que todos os compostos extraídos, independentemente do solvente apresentam estabilidades térmicas similares.

## **CAPÍTULO 7 – Avaliação das características dos inibidores frente a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos**

O hidrolisado hemicelulósico é composto, além de açúcares, por ácidos orgânicos, furanos e compostos aromáticos de estruturas heterogeneas. Apesar de esforços na elucidação dos mecanismos e principais compostos responsáveis pelo processo inibitório, o tema ainda carece ser estudado.

A partir da caracterização sistemática dos compostos fenólicos extraídos do hidrolisado e das respectivas concentrações dos principais inibidores, o presente capítulo busca avaliar preliminarmente a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico frente às características dos inibidores.

Adicionalmente, análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MSMS) dos hidrolisados, antes e após destoxificação, contribuirão para fornecer indícios preliminares em relação à composição do meio empregado no processo fermentativo.

### **7.1 Materiais e Métodos**

#### **7.1.1 Caracterização do hidrolisado antes e após destoxificação com MIBK por UPLC-MSMS**

As frações aquosas foram analisadas por um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (UPLC, Acquity HClass Waters) acoplado a um detector de ultra alta resolução com fonte de elétron spray e analisador híbrido quadrupolo/tempo-de-voou (Impact II) da empresa Bruker (UHR-ESI-QqTOF). Para a análise, foi utilizada coluna BEH C18, com poro de 1,7  $\mu\text{m}$ , com dimensões de 2,1 mm x 100 mm acoplado a pré-coluna compatível. O sistema de solventes bem como gradiente de eluição das amostras estão descritos na **Tabela 20**.

**Tabela 20.** Sistema de solventes e gradiente do eluente utilizado na análise. Detecção realizada em modo positivo e negativo.

Tempo (min)	Água (%)	Metanol (%)	Ácido fórmico* (%)
0	90	5	5
1	90	5	5
12	0	95	5
13	0	95	5
15	90	5	5

\*foi empregada uma solução de ácido fórmico 2%.

A coluna foi mantida à temperatura de 40°C e as eluições foram feitas com fluxo de 0,5 mL/min, de acordo com os gradientes apresentados na **Tabela 20**. A temperatura das amostras foi de 20°C. Os detectores utilizados foram o conjunto de fotodiodos (PDA), na faixa de comprimento de onda de 190 a 600 nm, e espectrômetro de massas ESI-QqTOF. O modo de análise no espectrômetro de massas foi o positivo, a fonte elétron spray, na faixa de 30 a 2000 Da, com velocidade de detecção de 8 Hz, apresentava os seguintes parâmetros: *end plate offset* = 500 V, capilar = 4500 V, nebulizador à 4,0 bar, fluxo de gás de secagem (nitrogênio) = 10 L/min, com temperatura de secagem de 200 °C. Para o MS/MS: célula de colisão = 5,0 eV, com energia de colisão na faixa de 20 a 70 V, *cut-off* absoluto de fragmentação de 1500.

Como regra de fragmentação, íons com  $m/z$  abaixo de 80 Da foram excluídos, e a função “exclusão ativa” estava habilitada (íons precursores com mais de 3 espectros tinham sua fragmentação bloqueada por 0,3 min ou até a razão “intensidade atual/intensidade prévia” ser maior ou igual a 1,8). A substância formiato de sódio (10 mM) foi utilizada para calibração externa e interna (em cada eluição).

Identificações e quantificações foram realizadas utilizando os seguintes padrões: ácido 2-furanóico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido ferúlico, *p*-hidrobenzaldeído, vanilina, iso-vanilina, orto-vanilina, siringaldeído, coniferil aldeído, *p*-hidroxiacetofenona, acetovanilona, acetosiringona, catecol, hidroquinona, álcool coniferílico, eugenol, isoeugenol e ácido *trans*-ferúlico. Todos os padrões foram pesados e solubilizados em água ultrapura para obtenção de soluções de aproximadamente 1 mM. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtro 0,22 µm (Millipore).

As respectivas estruturas químicas, massas moleculares e massas utilizadas no preparo das soluções encontram-se na Tabela I1 apresentada no ANEXO I.

Os tempos de retenção, fragmentação dos picos dos padrões e áreas foram utilizados na análise semiquantitativa dos hidrolisados e encontram-se reportados na Tabela I2 no ANEXO I.

A composição do hidrolisado proveniente do pré-tratamento de bagaço de cana com ácido diluído foi avaliada antes e após processo de destoxificação constituído por evaporação seguido de extração líquido-líquido com MIBK. A presença tanto de padrões fenólicos como a tentativa de elucidação de estruturas desconhecidas foi avaliada. As estruturas desconhecidas foram analisadas seguindo dois modos de identificação. O primeiro, baseado no trabalho de Allard et al., (2016), no qual o autor disponibilizou todo o banco de dados do dicionário de produtos naturais de modo *in silico* (que é uma predição computacional da fragmentação de espectrometria de massas) e o segundo pelo uso da Rede Mundial de Material Molecular de Produtos Naturais (em inglês, Global Natural Product Social Molecular Networking – GNPS) (Wang et al., 2016).

### 7.1.2 Valores de toxicidade (IC<sub>50</sub>)

A correlação de hidrofobicidade dos fenólicos como um parâmetro que influencia as respectivas toxicidades de um composto fenólico a leveduras é reportado na literatura por meio dos valores de IC<sub>50</sub>. O IC<sub>50</sub> é descrito como a concentração responsável pela inibição de 50% do crescimento da levedura.

Os valores de IC<sub>50</sub> para fenol, hidroquinona, metoxifenol, 4-etoxifenol, 4-propoxifenol, 4-butil fenol e catecol foram obtidos experimentalmente para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por Negritto et al., (2017). As equações para a predição dos valores de IC<sub>50</sub> reportados por Negritto et al., (2017) apresentaram baixo desvio frente aos valores experimentalmente determinados.

Como forma de avaliação premilinar de toxicidade, os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados para os padrões (padrões utilizados na análise por UPLC-MSMS) ácido 2 furanóico, ácido 4-hidrobenzóico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, *p*-hidrobenzaldeído, vanilina, siringaldeído, aldeído coniferílico, 4-hidroxiacetofenona, acetovanilona, acetosiringona, álcool coniferílico e eugenol.

Os valores foram calculados com base na 6 obtidas nas simulações reportadas por Negritto et al., (2017).

$$\log 1/IC_{50} = 0.61(\pm 0.10) \text{ clog } P + 1.20(\pm 0.32) \quad (6).$$

Onde  $\log P$  é o coeficiente de partição do composto fenólico

## 7.2 Resultados

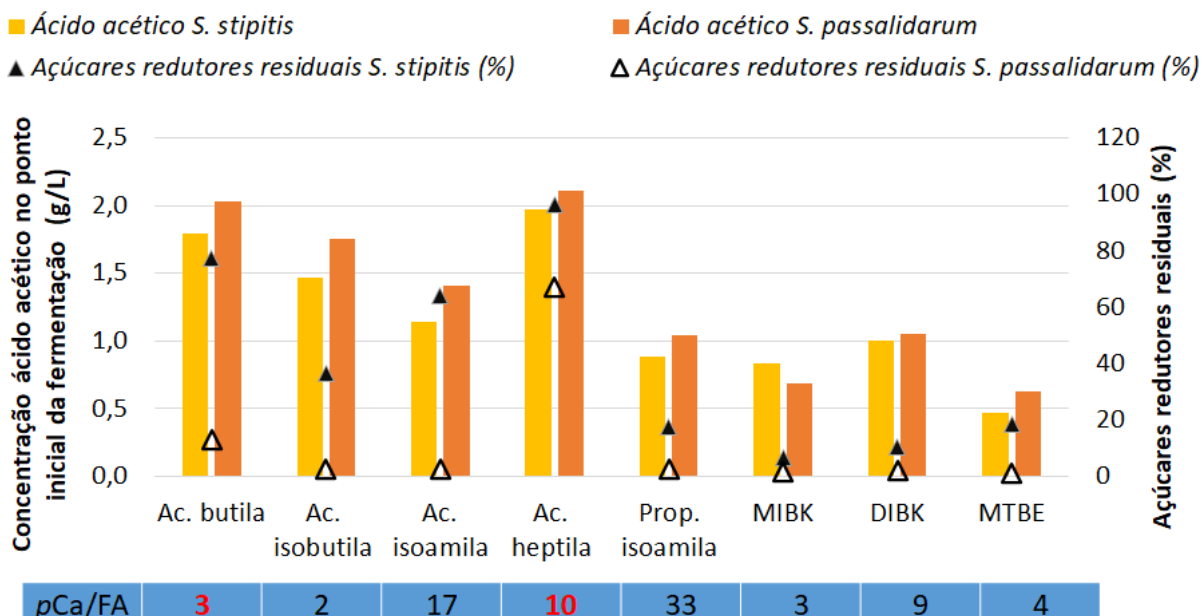
### 7.2.1 Avaliação das características dos fenólicos extraídos frente a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos

Os hidrolisados hemicelulósicos apresentam-se como meios de elevada complexidade devido a presença de inúmeros compostos, como ácidos orgânicos e fenólicos. Esses compostos ainda apresentam variabilidade de concentração e estruturas de acordo com a severidade e tipo de pré-tratamento empregado, além do material lignocelulósico de origem.

Dentre as espécies de leveduras que fermentam naturalmente xilose, destaca-se a *S. stipitis* e a *S. passalidarum*, que apresentam distintos mecanismos de inibição do metabolismo perante os mesmos inibidores.

Uma avaliação preliminar da fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados perante as concentrações e características dos inibidores foi realizada. A **Figura 42** apresenta a concentração de ácido acético no ponto inicial da fermentação, o percentual de açúcares redutores para as fermentações com *S. stipitis* e *S. passalidarum* dos hidrolisados destoxificados e as respectivas razões  $pCa/FA$  proveniente da caracterização dos fenólicos extraídos dos respectivos hidrolisados.

**Figura 42.** Concentração de ácido acético no ponto inicial da fermentação e percentual de açúcares redutores para fermentação por *S. stipitis* e *S. passalidarum* e as razões  $pCa/FA$  dos fenólicos extraídos dos hidrolisados durante a etapa de destoxificação.



\*Açúcares redutores residuais após 72h de fermentação para *S. stipitis* e 48 h de fermentação para *S. passalidarum*;  $pCa/FA$  obtidos pela caracterização por RMN.

De acordo com a **Figura 42**, a presença de ácido acético em concentrações em torno 2 g/L para as amostras acetato de heptila e acetato de butila corresponderam aos maiores acúmulos de açúcares residuais para ambas as leveduras, correspondendo a 96,4% e 77,5% para *S. stipitis* (72h) e 66,9% e 12,8% para *S. passalidarum* (48 h), respectivamente.

Observa-se que o efeito inibitório, para ambas a leveduras, foi mais pronunciado para o hidrolisado destoxificado com acetato de heptila em relação a acetato de butila, apesar de ambos apresentarem concentrações similares de ácido acético (2,1 g/L e 2,0 g/L no meio de fermentação com *S. passalidarum* e 2,0 g/L e 1,8 g/L no meio de fermentação com *S. stipitis* respectivamente).

Os inibidores atuam em sinergismo no metabolismo celular, ocasionando um acréscimo de toxicidade no meio devido à presença de outros componentes. Nota-se que o hidrolisado destoxificado por acetato de heptila resultou na remoção preferencial de unidades  $pCA$ , gerando um hidrolisado destoxificado com maiores percentuais de unidades FA (10  $pCa/FA$ ). Em contrapartida, o acetato de butila removeu preferencialmente unidades FA (3  $pCa/FA$ ).

O hidrolisado proveniente da extração líquido-líquido com acetato de isobutila também resultou em concentrações expressivas de ácido acético (1,5 g/L e 1,8 g/L para *S. stipitis*

e *S. passalidarum* respectivamente), entretanto devido a remoção preferencial de fenólicos do grupo ferulato (FA), a fermentabilidade por ambas as leveduras apresentou percentual de açúcares redutores residuais bem inferiores (36,2 g/L e 2,6 g/L para *S. stipitis* e *S. passalidarum*, respectivamente).

Sendo assim, pode-se inferir que apesar do efeito de toxicidade amplamente reportado para o ácido acético, a sinergia do seu efeito juntamente com unidades FA resulta em um decréscimo no metabolismo celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*.

Soares, (2018), realizou testes de resistência individual dos inibidores e estabeleceu concentrações limites de 2,5 g/L de ácido acético e 2,0 g/L de furfural para um desempenho satisfatório na fermentação com *S. stipitis* NRRL Y-7124 e concentrações de 0,5 g/L de ácido acético, 1,0 g/L de furfural, 3,0 g/L de 5-HMF para *S. passalidarum* NRRL Y-27907.

Apesar das concentrações de ácido acético acima do limite de resistência de 0,5 g/L (*S. passalidarum*) reportado por Soares, (2018), a levedura *S. passalidarum* reportou menor acúmulo de açúcares (66,9 %) residuais em relação ao observado para *S. stipitis* (96,4%).

Wang et al., (2017a) em avaliação dos inibidores provenientes do hidrolisado de palha de arroz na fermentabilidade de *S. stipitis* reportaram que unidades pCA e FA resultam em inibição do crescimento celular e consequentemente a eficiência fermentativa. O fluxo citométrico indicou um percentual de dano às células 62,8 % e 49,0 % para as fermentações contendo 0,2 g/L de pCA e FA, respectivamente. Tendo que as unidades pCA apresentaram maior potencial de danificar as células que FA.

Além do ácido acético, o ácido levulínico e fórmico também apresentam efeito inibitório frente às leveduras. De acordo com Greetham et al., (2014), a linhagem *S. stipitis* NCYC 1541 sofreu pronunciada inibição do crescimento celular com 0,6 g/L de ácido acético (pH 5), e 0,23 g/L de ácido fórmico (pH 3,8) e 0,5 g/L de furfural (pH 6,5) e Guo and Olsson, (2014), reportaram que em estudos com *S. cerevisiae* que o crescimento foi totalmente inibido com o meio sintético suplementado com 3,7 mg/mol de ácido acético, 4,8 mg/mol ácido fórmico e 3,4 mg/mol de ácido levulínico.

A ação inibitória dos ácidos orgânicos se deve ao equilíbrio entre as formas dissociada e não dissociada. A fermentação foi conduzida sob pH 5,0, entretanto o pH pode ser decrescido no decorrer do experimento, deslocando assim o equilíbrio para a forma não dissociada dos ácidos, a qual é passível de transporte para o citoplasma, acidificando e causando a redução da atividade metabólica (Costa, 2016). Os hidrolisados destoxificados (e que tiveram os fenólicos extraídos caracterizados) apresentam concentrações entre 0,2 até 0,3 g/L para ácido fórmico e teores abaixo de 0,01 g/L para furfural e 0,08 g/L para HMF (Tabela I1-Anexo I).

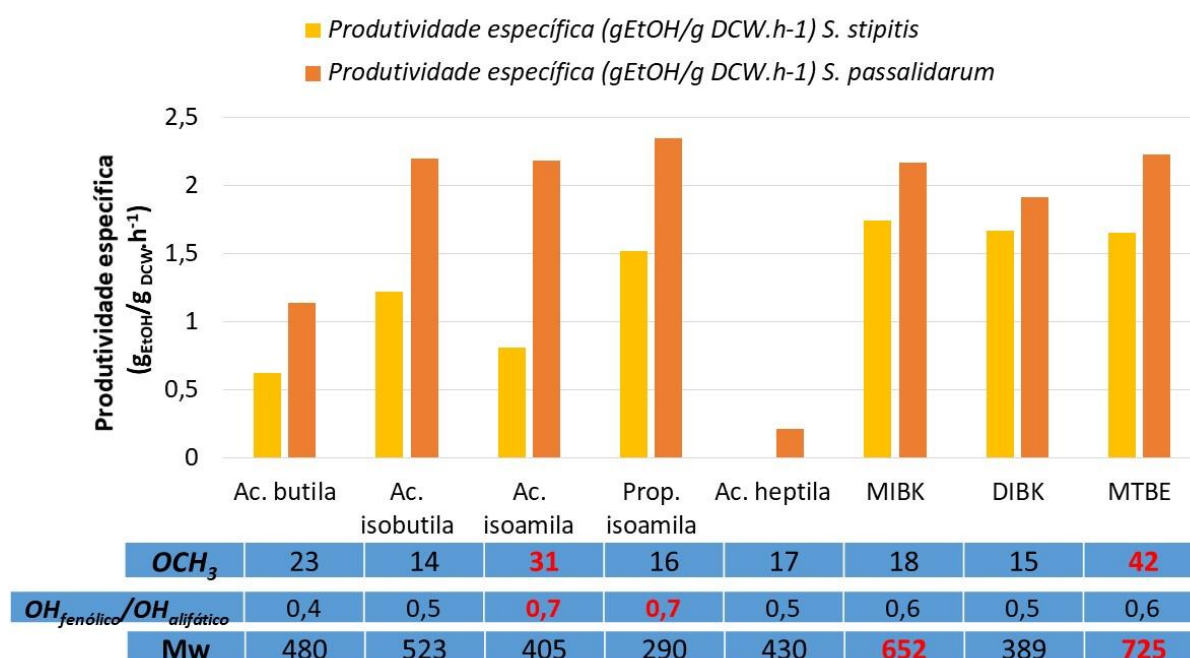
Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação direta entre o desempenho fermentativo e a concentração residual dos demais ácidos orgânicos e furanos.

A presença de fenólicos, majoritariamente derivados da lignina, no hidrolisado ácido também engloba a classe de compostos nocivos ao crescimento de microrganismos fermentativos. Esses fragmentos englobam desde unidades fenólicas monoméricas até oligômeros poli aromáticos com distintas ramificações e grupos funcionais (Adeboye et al., 2014).

A literatura reporta que o processo de inibição está diretamente relacionado a hidrofobicidade e massa molar dos fenólicos (Klinke et al., 2004), além da concentração de células no processo fermentativo (Soares, 2018).

A **Figura 43** apresenta produtividade específica em etanol ( $g_{EtOH}/g_{DCW}\cdot h^{-1}$ ) para as fermentações por *S. stipitis* e *S. passalidarum*, dos hidrolisados destoxificados e as características físico-químicas dos fenólicos extraídos.

**Figura 43.** Produtividade específica em etanol das fermentações pelas leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum* dos hidrolisados destoxificados pelo processo de extração líquido-líquido e características dos fenólicos extraídos como teor de metoxila ( $OCH_3$ ), massa molar (Mw) e razão grupo hidroxila fenólico e alifático ( $OH_{fenólico}/OH_{alifático}$ ).



Os fragmentos fenólicos removidos do hidrolisado hemicelulósico pelo processo de evaporação seguido por destoxificação por extração líquido-líquido apresentaram baixa massa



molar, entre 290 e 725 g/mol, em relação aos usualmente removidos por métodos alcalinos, que de acordo com Doherty and Mousavioun, (2010), apresentam massa molar em torno de 2410 Da (deslignificação alcalina à 170°C, 1,5 h).

A literatura reporta que os compostos fenólicos de baixa massa molar são mais tóxicos para os microrganismos fermentativos quando comparados aos compostos fenólicos de elevada massa molar. Isto se deve ao fato destes compostos serem mais facilmente difundidos para o interior celular e/ou mais reativos com alguns dos constituintes da membrana plasmática do que os compostos que apresentam massa molar mais elevada (Klinke et al., 2004).

A presença de metoxilas e OH<sub>fenólicos</sub> nos compostos fenólicos pode ser relacionada a sua hidrofobicidade e toxicidade (Adeboye et al., 2014; Jönsson et al., 2013). A seletividade dos solventes para a extração de fenólicos contendo metoxilas (OCH<sub>3</sub>) variou de 15 a 42 %. O acetato de isobutila extraiu compostos com menor percentual de metoxilas (14%) resultando em um hidrolisado com maior percentual de fenólicos hidrofóbicos. Já o MTBE apresentou maior seletividade para extração de fragmentos metoxilados (42%), resultando em um hidrolisado com um menor percentual de fenólicos hidrofóbicos.

Os extratos fenólicos extraídos com MIBK (0,58), MTBE (0,56), acetato de isoamila (0,65), propionato de isoamila (0,75) e DIBK (0,54) apresentaram preferencialmente unidades contendo OH fenólicos, conseqüentemente resultando em hidrolisados com uma quantidade mais expressiva de OH alifáticos (**Figura 43**).

Segundo Orlean, (2012), a parede celular de leveduras possuem um mecanismo de ação distinto em relação as células de mamíferos, com a presença de uma barreira contendo manoproteínas e  $\beta$ -glucanas, conferindo assim características hidrofóbicas, o qual poderia prontamente aumentar o transporte de fenóis hidrofóbicos.

Os compostos fenólicos são amplamente reportados como agentes antioxidantes, tendo aplicações como preservantes alimentícios, no qual tem-se o envolvimento de um mecanismo de ação que envolve uma consecutiva oxidação de 2 elétrons na posição  $\beta$  do anel aromático (Hadi et al., 2007). Entretanto, a literatura reporta que sob certas condições como altas concentrações, pH e presença de íons metálicos, os fenólicos podem apresentar comportamento pró-oxidante, resultando em aumento expressivo de espécies oxigenadas reativas (ROS), como as encontradas em células cancerosas que resultam em fragmentação do DNA (Oikawa et al., 1998).

Negritto et al., (2017), reportam forte correlação entre a hidrofobicidade dos compostos e a toxicidade em células de leveduras de *S. cerevisiae*. A citotoxicidade de fenóis com grupos retiradores de elétrons pode ser correlacionada com a hidrofobicidade, enquanto os

fenóis com grupos doadores de elétrons apresentam baixa correlação com hidrofobicidade (Selassie et al., 1998).

Geralmente aldeídos e cetonas são inibidores mais potentes do que ácidos, os que por sequência são mais tóxicos que os álcoois, tanto para *S. cerevisiae*, quanto para *E. coli* (Almeida et al., 2007). Os percentuais de extrações de aldeídos e ácidos carboxílicos foram similares para todos os solventes, tendo o propionato de isoamila o maior percentual, 13,61% e o MTBE, o menor percentual, 10,15%.

Uma análise estatística de componentes principais foi realizada para análise e verificação de tendência nas correlações estruturais dos fenólicos e desempenhos fermentativos. Entretanto, não foi possível encontrar um bom ajuste dos dados e nem contribuições para o entendimento das respostas fermentativas das leveduras.

As leveduras do clado *Spathaspora*, além de boas fermentadoras de xilose, apresentam melhor tolerância aos compostos inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica, do que por exemplo a *S. stipitis* (da Cunha-Pereira et al., 2011; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Wohlbach et al., 2011). De acordo com Kurtzman, (2010) e Nguyen et al., (2011), a espécie *S. stipitis* apresenta célula com dimensões 2,2-4,5 x 2,5-6,0  $\mu\text{m}$ , enquanto o gênero *Spathaspora* apresenta dimensões médias de 3-8 x 3-8  $\mu\text{m}$ . O fato do primeiro passo para a metabolização da xilose ser o transporte do açúcar através da membrana plasmática da célula (Fonseca et al., 2011) e devido a *S. passalidarum* possuir uma maior área de membrana em relação a *S. stipitis* podem ser fatores relacionados a diferenças o melhor desempenho fermentativo em um meio contendo a mesma concentração de inibidores.

Com base na concentração dos inibidores e desempenho na fermentação, com menores acúmulos de açúcares residuais e maior produtividade específica em etanol para *S. stipitis* e *S. passalidarum* ( $1,74 \pm 0,11$  e  $2,17 \pm 0,01$   $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ ) o MIBK foi eleito como o solvente selecionado para o processo de destoxificação.

## **7.2.2 Análise do hidrolisado antes e após destoxificação com MIBK por UPLC-MSMS**

A detecção e tentativa de elucidação estrutural dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico é uma ferramenta que permite não somente o mapeamento composicional do meio, bem como avaliar a efetividade e seletividade de processos de destoxificação empregados. A investigação detalhada do comportamento de leveduras, quando submetidas às condições impostas pelo hidrolisado lignocelulósico, é de extrema importância para o processo de obtenção de biocombustíveis e bioprodutos, a fim de verificar sua robustez

ao processo, indícios dos principais interferentes metabólicos, bem como determinar seus limites de trabalho e sua potencial aplicabilidade industrial.

O processo de destoxificação com MIBK foi o selecionado como promissor frente aos solventes avaliados. Visando avaliar e identificar os compostos extraídos frente a destoxificação com MIBK o hidrolisado evaporado e o hidrolisado evaporado e extraído com MIBK foram caracterizados por UPLC-MSMS.

No processo fermentativo de hidrolisados, a inibição não ocorre apenas pela elevada concentração de substrato, mas também pela presença de compostos ácidos, furânicos e fenólicos que são potencialmente inibidores. Quando o efeito da alta concentração dos inibidores é parcialmente retirado pela destoxificação, com a remoção de 36% dos compostos presentes no hidrolisado (destoxificação com MIBK), sendo estes compostos preferencialmente por estruturas de baixa massa molar (até 400 g/mol) (conforme reportado no item 5.2.1), tem-se um incremento na capacidade de metabolizar os açúcares comparado à fermentação do hidrolisado evaporado.

A **Tabela 21** apresenta a quantificação de 21 padrões fenólicos para os hidrolisados antes e após destoxificação com MIBK.

**Tabela 21.** Quantificação de padrões fenólicos no hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido, antes e após extração com MIBK.

ID	Nome	Hidrolisado evaporado* (g/L)	Hidrolisado destoxificado MIBK (g/L)
P01	Ácido furanóico	0,030	0,00
P02	4-Hidroxibenzóico	0,021	0,00
P03	Ácido vanílico	0,028	0,00
P04	Ácido sirínico	0,050	0,00
P05	4-Hidroxicinâmico	0,494	0,00
P06	Ácido ferúlico	0,016	0,01
P07	4-Hidroxibenzaldeído	0,195	0,00
P08	Vanilina	0,022	0,00
P09	Iso-vanilina	0,104	0,00
P10	Orto-vanilina	0,046	0,00
P11	Siringaldeído	0,031	0,00
P12	Coniferil	0,000	0,00
P13	4-Hidroxiacetofenona	0,329	0,00
P14	Acetovanilona	0,013	0,00
P15	Acetosiringona	0,009	0,00
P16	Catecol	0,005	0,00
P17	Hidroquinona	0,035	0,00
P18	Álcool coniferil	0,000	0,00
P20	Isoeugenol	0,000	0,00
P21	Ácido <i>trans</i> -ferúlico	0,194	0,01

\*o pH do hidrolisado foi ajustado de 1,67 para 5 para condução da análise. O padrão eugenol (19) apresentou insolubilidade na fase móvel, não sendo injetado para análise.

Os compostos fenólicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são majoritariamente oriundos da fragmentação da lignina (e dos extrativos) e encontram-se como um desafio devido à complexidade estrutural e a diversidade de estruturas químicas.

O hidrolisado evaporado com pH ajustado para 5 foi injetado sem necessidade de prévia diluição apresentando concentrações preferenciais de ácido 4-hidroxicinâmico (~0,5 g/L), seguido de 4-hidroxiacetofenona (~0,33 g/L) e 4- hidrobenzaldeído (~0,20 g/L) (**Tabela 21**).

Siqueira et al., (2011), avaliaram a distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos por microfotometria celular ultravioleta e encontraram uma maior abundância desses compostos nas células de parênquima, atribuído a uma absorvância em 315 nm devido a ligação desses ácidos a lignina e /ou arabino-metilglucuro xilanas.

Palmqvist and Hahn-Hägerdal, (2000a), reportaram que os compostos vanilina e catecol são compostos frequentemente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos e amplamente reportado em hidrolisados de madeiras, apresentando toxicidade em concentrações

superiores a 1 g/L com reduções em até 30% em rendimentos de etanol. Entretanto, dentre os padrões avaliados, não foi detectada a presença de catecol, hidroquinona, álcool coniferílico e isoeugenol no hidrolisado.

De acordo com a **Tabela 21** o processo de destoxificação com MIBK apresentou-se eficiente, perante o método de quantificação empregado, na remoção da maior parcela dos padrões fenólicos avaliados/quantificados, com exceção aos ácidos ferúlico e *trans*-ferúlico, com concentrações residuais em torno de 0,01 g/L.

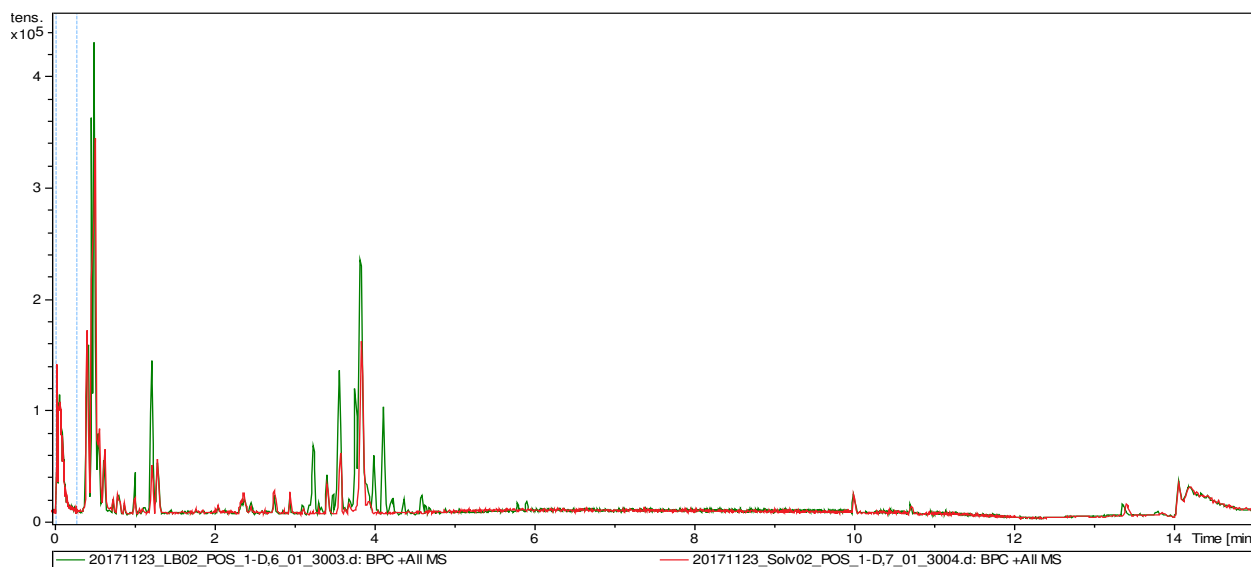
Zeferino, (2013) avaliou o efeito da vanilina, siringaldeído e dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico sobre a fermentação de meio à base de glicose e xilose por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Dentre estes compostos, o siringaldeído foi o que causou o maior impacto sobre o metabolismo fermentativo da levedura, uma vez que reduziu todos os parâmetros fermentativos com o aumento de sua concentração no meio, causando perdas de até 74% na produção de etanol. Por outro lado, o autor verificou que a vanilina (55 e 175 mg/L), afetou primariamente o crescimento de *P. stipitis* nas condições avaliadas (redução de aproximadamente 16% em todos os níveis) e seu impacto negativo sobre a produção de etanol (33%), rendimento (24%) e produtividade (46%) foi observado apenas no maior teor do composto. Em relação aos ácidos fenólicos, foi observado reduções principalmente no crescimento celular, em um nível proporcional à concentração dos compostos no meio de fermentação. O ácido ferúlico, por exemplo, reduziu o valor de produtividade (35%) em concentrações a partir de 570 mg/L, e o ácido *p*-cumárico diminuiu os valores de produtividade (25%) e rendimento (37%) em concentrações a partir de 320 mg/L.

Klinke et al., (2004), reportaram um resumo dos principais fenólicos encontrados em hidrolisado hemicelulósicos, destacando-se a presença de hidroquinona em hidrolisado ácido diluído de madeira de abeto (*spruce*), e 4 metoxifenol, álcool *p*-cumárico, ácido fluorético e ácido 3-4 hidroxifenil propiônico em hidrolisado de explosão à vapor de palha de milho.

A determinação da composição de hidrolisados hemicelulósicos ainda é muito preliminar na literatura, apesar da presença de inúmeras técnicas analíticas disponíveis. No modo de injeção positivo foram detectados em torno de 790 distintos compostos com tempos de retenção e massas variando entre 0,5 min até 15,0 min e 81 até 663 g/mol. Desses compostos, em torno de 46% apresentaram massas entre 80-200 g/mol, 24% entre 200-300 g/mol; 20% entre 300-400g/mol, 7% entre 400-500 g/mol; 2% entre 500-600 g/mol e 1% entre 600 e 700 g/mol.

A **Figura 44** apresenta os espectros de UPLC-MSMS do hidrolisado hemicelulósico evaporado e após destoxificação por MIBK. Os espectros de massas dos padrões e os respectivos tempos de retenção utilizadas na análise se encontram no ANEXO I.

**Figura 44.** Espectro de UPLC-MSMS do hidrolisado hemicelulósico evaporado (linha verde) e após destoxificação por MIBK (linha vermelha).

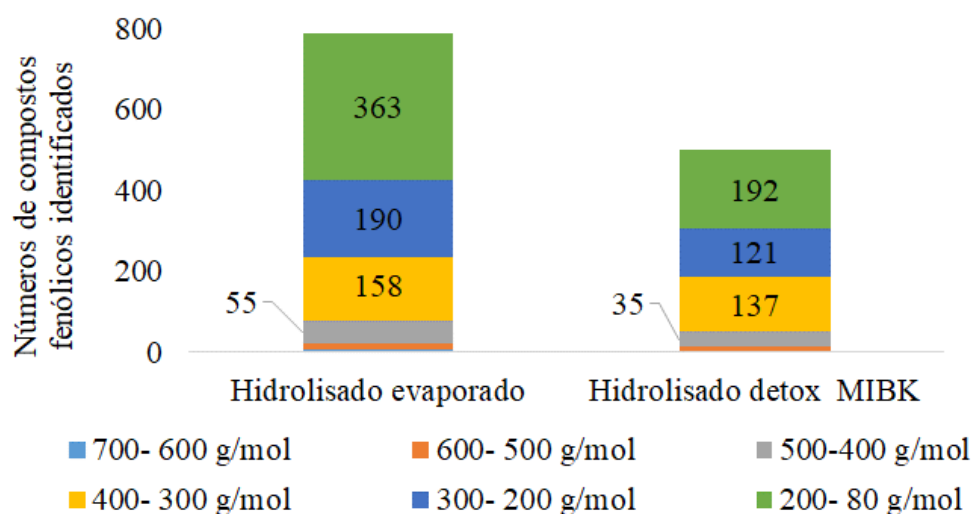


Zha and Punt, (2013), estimaram a presença de 60 distintos compostos fenólicos em diversos hidrolisados, sendo a maior parcela de estruturas ainda não elucidadas.

Os resultados encontrados corroboram com a presença de compostos de baixa molar reportados nas análises de RMN e GPC.

O processo de extração com MIBK resultou na remoção total de 284 dos 790 presentes no hidrolisado evaporado. Desses compostos 38% apresentavam massa entre 80- 200 g/mol; 24% entre 200-300 g/mol; 27% entre 300-400 g/mol; 7% entre 400-500 g/mol; 2% entre 500-600 g/mol e 1% entre 600-700 g/mol (**Figura 45**).

**Figura 45.** Número de compostos fenólicos identificados nos hidrolisados hemicelulósicos antes e após processo de dextoxificação por MIBK e as respectivas faixas de massa molar.



Por meio de ferramentas de simulação computacional, em torno de 25 % dos 790 picos detectados foram identificados, destacando-se a presença no hidrolisado hemicelulósico evaporado de hidroxiaacetosiringona, para-acetoxibenzaldeído, 4- (2-propenil) fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo; 4-hidroxi-3,5-ácido dimetoxibenzóico 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil éster; ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico; glicosil éster do ácido *p*-cumárico; aldeído sinapílico do 4-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

Adeboye et al., (2014), reportaram que a toxicidade dos fenólicos poli aromáticos e aldeídos oriundos da lignina são proporcionais à massa molar. Tendo que usualmente os compostos fenólicos que apresentam menor massa molar apresentam maior toxicidade aos microrganismos em relação aos de maior massa molar devido a facilidade de permeação da membrana celular. Já Heer et al., (2009), reportaram que o estresse químico promovido pela presença de furanos em meios fermentativos aumenta a duração da fase *lag* de crescimento celular, sendo dependente do tipo de microrganismo.

A correlação de hidrofobicidade dos fenólicos como uma parâmetro que influencia as respectivas toxicidades foi reportado Negritto et al., (2017) por meio dos valores de  $IC_{50}$  (concentração responsável pela inibição de 50% do crescimento da levedura). A **Tabela 22** apresenta os valores de  $IC_{50}$  observados por Negritto et al., (2017) e os calculados para os padrões utilizados na quantificação dos hidrolisados por UPLC-MSMS. Os cálculos para os padrões foram realizados com as equações reportadas por Negritto et al., (2017). Salienta-se que as equações do artigo são propostas para *S. cerevisiae*.

**Tabela 22.** Valores de toxicidade ( $IC_{50}$ ) para as células da levedura e hidrofobicidade dos fenólicos.

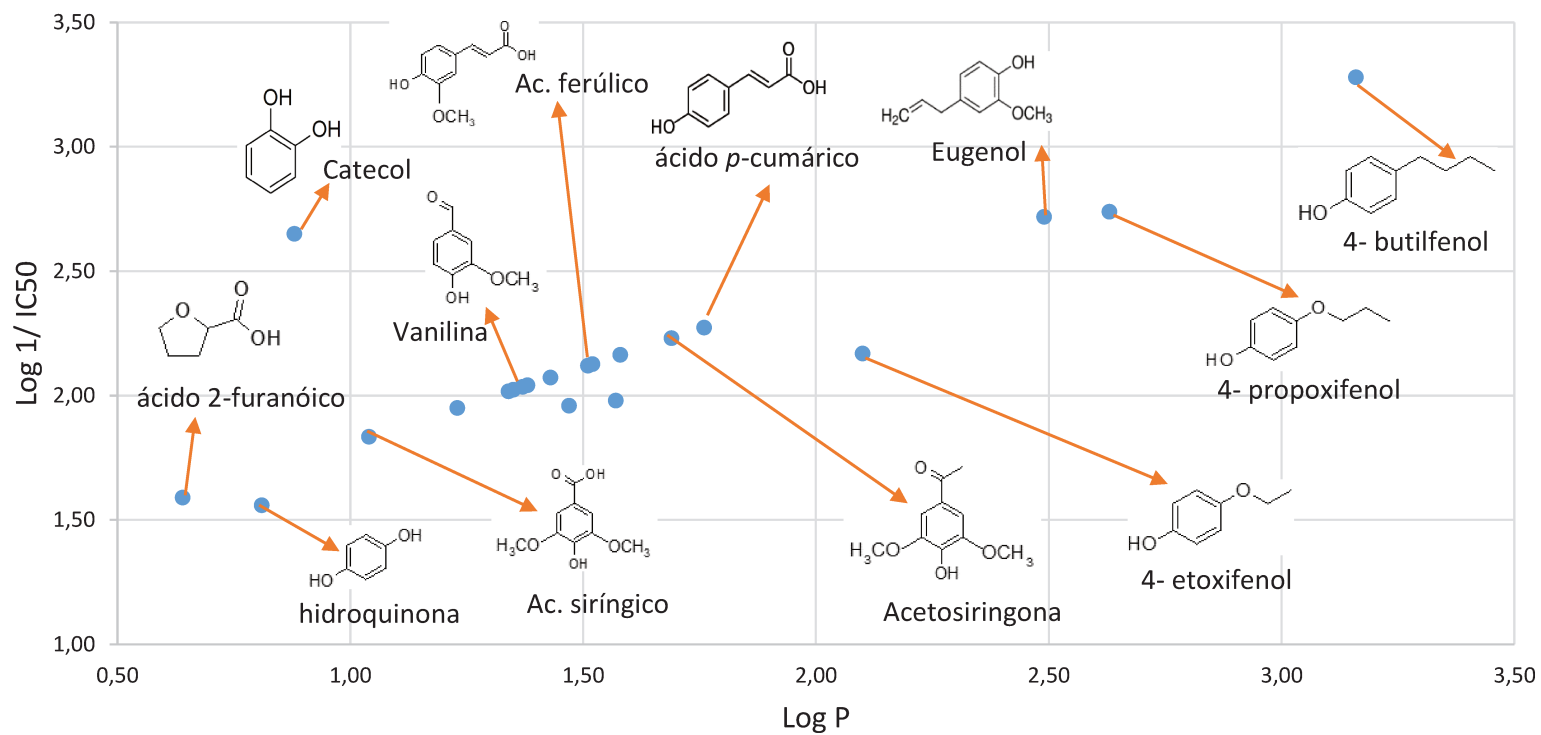
<i>Fenólicos</i>	<i>Vobs</i>	6	<i>log P</i>
Fenol	1,96	2,10	1,47
Hidroquinona	1,56	1,69	0,81
Metoxifenol	1,98	2,16	1,57
4 Etoxifenol	2,17	2,48	2,1
4 propoxifenol	2,74	2,80	2,63
4- Butil fenol	3,28	3,13	3,16
Catecol	2,65	1,74	0,88
Ácido 2 furanóico	-	1,59	0,64
Ácido 4- hidroxibenzóico	-	2,16	1,58
Ácido vanílico	-	2,07	1,43
Ácido siríngico	-	1,83	1,04
Ácido p-cumárico	-	2,27	1,76
Ácido ferúlico	-	2,12	1,51
p-Hidroxibenzaldeído	-	2,02	1,35
Vanilina	-	2,04	1,37
Siringaldeído	-	2,02	1,34
Aldeído coniferílico	-	2,13	1,52
4-Hidroxiacetofenona	-	1,95	1,23
Acetovanilona	-	2,04	1,38
Acetosiringona	-	2,23	1,69
Álcool coniferílico	-	2,02	1,35
Eugenol	-	2,72	2,49

Vobs: valores de inibição observados experimentalmente por Negritto et al 2017; *log P*- coeficiente de partição

A **Figura 46** apresenta a correlação de toxicidade para alguns compostos fenólicos (valores de  $IC_{50}$ ) e hidrofobicidade dos fenólicos ( $\log P$ ). Os valores do gráfico consideram os valores da **Tabela 22**.



**Figura 46.** Correlação entre toxicidade dos fenólicos para as células da levedura e hidrofobicidade dos fenólicos.



De acordo com a **Figura 46**, as equações descritas por Negritto et al., (2017), resultaram em uma forte correlação entre a hidrofobicidade dos compostos e a toxicidade em células de leveduras, mesmo com a inserção dos padrões fenólicos avaliados para esse projeto.

O processo de extração com MIBK foi eficiente em termos de remoções de compostos de alta toxicidade como vanilina, ácido siríngico e acetosiringona, com base nos valores de IC<sub>50</sub>. Os compostos ácidos ferúlico e *trans*-ferúlico, de toxicidades intermediárias, não foram totalmente extraídos do hidrolisado, com quantidades remanescentes em torno de 0,01 g/L. Entretanto, o efeito tóxico pode ser potencializado pela presença de compostos identificados como para-acetoxibenzaldeído e hidroxiaacetosiringona.

Além do tamanho e da hidrofobicidade, estudos conduzidos em células de leucemia mostraram que fenóis com grupos doadores de elétrons ou grupos retiradores de elétrons apresentam comportamentos distintos. A citotoxicidade de fenóis com grupos retiradores de elétrons pode ser correlacionada com a hidrofobicidade, enquanto os fenóis com grupos doadores de elétrons apresentam baixa correlação com hidrofobicidade (Negritto et al., 2017; Selassie et al., 1998).

A parede celular de leveduras possuem um mecanismo de ação distinto em relação as células de mamíferos, como a presença de uma barreira contendo mano proteínas e  $\beta$ -glucanas, conferindo assim características hidrofóbicas, o qual poderia prontamente aumentar o transporte de fenóis hidrofóbicos em células de levedura (Orlean, 2012). Ademais, a literatura reporta que sob certas condições como altas concentrações de inibidores, pH e presença de íons metálicos, os fenólicos podem apresentar ações pró-oxidante, resultando em aumento expressivo de espécies oxigenadas reativas (ROS), como as encontradas em células cancerosas que resultam em fragmentação do DNA (Oikawa et al., 1998).

Fenóis e outros compostos aromáticos (similares ao benzeno), causam estatisticamente danos significativos no DNA, enquanto outros fenólicos parecem atuar no sentido oposto, protegendo as células dos danos ao DNA (Stich, 1991).

Com base nos pontos abordados, justifica-se a complexidade da obtenção de respostas celulares em meios contendo desde fenólicos simples até os mais complexos.

Mesmo que preliminar, os dados de caracterização química resultantes desse trabalho podem contribuir com uma proposta de composição preliminar do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar, que pode resultar em avanços posteriores em técnicas de adaptação e ou modificação das leveduras.

### 7.3 Conclusões parciais

Os compostos fenólicos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são majoritariamente oriundos da fragmentação da lignina e encontram-se como um desafio devido à complexidade estrutural e a diversidade de estruturas químicas. O hidrolisado evaporado apresentou concentrações majoritárias de ácido 4-hidroxicinâmico (0,5 g/L), 4-hidroxiacetofenona (0,329 g/L) e 4- hidrobenzaldeído (0,195 g/L), não sendo detectada a presença de catecol, hidroquinona, álcool coniferílico e isoeugenol. A maior parcela dos compostos apresenta baixa massa molar, entre 80 e 400 g/mol, correspondendo a monômeros, dímeros e no máximo trímeros de estruturas preferencialmente aromáticas. Esse resultado corrobora aos reportados pela análise de SAXs no qual foi possível observar parâmetros e contribuições somente de moléculas fenólicas de baixa massa molar.

O ácido ferúlico esterificado a arabinoxilanas foi preferencialmente solubilizado, além de unidades de ácido *p*-cumárico, confirmados por sinais de RMN característicos de grupos com álcool cinâmico; e de fragmentos fenólicos correspondentes as estruturas *p*-cumarato (*p*Ca) e ferulato (FA).

O hidrolisado apresenta escassez em unidades S de lignina e dentre os compostos quantificados, tem-se uma composição predominante de ácidos hidroxicinâmicos com valores ao redor de 0,5 g/L.

O processo de destoxificação com MIBK resultou na remoção total de 36% dos compostos presentes e detectados pelo UPLC-MSMS, sendo majoritariamente constituídos por fragmentos de massa molar até 400 g/mol. Dentre os padrões quantificados todos foram extraídos, exceto o ácido ferúlico e *trans*-ferúlico com valores residuais de 0,01 g/L.

O desempenho fermentativo dos hidrolisados destoxificados frente a *S. stipitis* e *S. passalidarum* foi avaliada frente as concentrações dos principais compostos inibitórios e as características físico-químicas reportadas pelas técnicas empregadas nesse trabalho.

Há indícios da ação sinérgica de unidades ferulato com ácido acético em concentrações acima de 2 g/L, resultando em inibição fermentativa para ambas as leveduras estudadas.

A abordagem comparativa entre as características estruturais dos inibidores com os correspondentes desempenhos fermentativos é extremamente complexa e de difícil correlação com desempenho fermentativo. Entretanto, as informações obtidas nesse trabalho podem direcionar estudos posteriores de inibição fermentativa.

## CAPÍTULO 8 - Conclusões e sugestões para próximos trabalhos

O pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar em escala piloto, empregando 0,5% (m/v) de ácido sulfúrico como catalisador à 140°C e 15 min foi utilizado, resultando na solubilização de 89% das hemiceluloses, sendo o açúcar recuperado majoritariamente na forma monomérica e apresentando ligações típicas das extremidades redutoras e não redutoras de carboidratos, como de unidades xilanopirosídeo e ácido 4-metil glucurônico, além de compostos inibitórios como ácido acético, furfural, HMF e ácido fórmico.

A celulignina pré-tratada exibiu uma morfologia mais desorganizada, em relação ao material *in-natura*, com maior exposição das fibras, com pequenos poros, e rupturas na superfície, que revelam as alterações oriundas do processo de pré-tratamento, além da presença de estruturas esféricas com diâmetro médio de 0,87 nm.

O processo de destoxificação contemplando uma primeira etapa de evaporação foi avaliada, sob condição otimizada a pH 1,7, resultando na remoção de  $16 \pm 0,8\%$  de ácido fórmico,  $65 \pm 1,0\%$  de ácido acético,  $13 \pm 0,5\%$  de HMF,  $98 \pm 0,9\%$  do furfural e  $34 \pm 0,77\%$  do teor de fenólicos sem arrastes expressivos de carboidratos para o destilado.

A segunda etapa, com um processo de extração líquido-líquido, apresentou perdas não significativas e intrínsecas a operação unitária, com balanços de massa com rendimentos superiores a 99%, com destaque para os álcoois de cadeia longa (1-decanol e 1-hexanol) e as cetonas (MIBK e DIBK) que apresentam solubilidade inferior a 1 g/L no hidrolisado hemicelulósico e ainda resultaram em remoções expressivas dos inibidores, com remoção de  $34,9 \pm 0,2\%$  de ácido acético e  $100 \pm 0,0\%$  de ácido levulínico para o MIBK e  $46,9 \pm 0,0\%$  de ácido acético.

O butanol e o álcool isoamílico foram os solventes com menor biocompatibilidade para o processo de destoxificação e subsequente fermentação, ocasionando inibição no crescimento celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*, e resultando em  $70,9 \pm 1,70\%$  e  $56,0 \pm 2,27\%$  de açúcares redutores residuais em 48 h de fermentação, respectivamente.

A levedura *S. passalidarum* apresentou em geral, melhor tolerância aos solventes empregados na etapa de destoxificação em relação a *S. stipitis*, com pequenos percentuais de redução de rendimento e produtividade para DIBK, acetato de butila, biodiesel de óleo de mamona e 2-etilhexanol em relação a xilose padrão, que não ultrapassam reduções de 5%, ficando dentro da faixa de desvio do erro operacional.

Os solventes MIBK, MTBE e DIBK apresentaram-se como potenciais solventes a serem empregados no processo de destoxificação para remoção de compostos inibitórios, resultando em incrementos fermentativos de produtividade volumétrica de etanol na faixa de 85% a 90% empregando *S. stipitis* e em incrementos fermentativos de produtividade volumétrica de etanol na faixa de 34% em relação ao hidrolisado evaporado para *S. passalidarum*.

Considerando-se que os hidrolisados possuem a mesma composição após processo de destoxificação, a levedura *S. passalidarum* apresentou limites de tolerância similares e/ou superiores aos observados a *S. stipitis*, salientando-se a produtividade volumétrica de etanol proveniente do hidrolisado hemicelulósico evaporado foi de  $0,028 \pm 0,001$  g/L.h para *S. stipitis* e  $0,269 \pm 0,015$  g/L.h para *S. passalidarum*.

Os compostos extraídos apresentaram massa molar baixa, em relação aos usualmente reportados na literatura provenientes de processos alcalinos, com valor máximo de Mw de 725 g/mol para o MTBE. Já o propionato de isoamila resultou na remoção do maior percentual de compostos com massa molar em torno de 179 g/mol, correspondendo a no máximo dímeros de lignina.

Os resultados de SAXs apontaram que somente os extratos fenólicos oriundos da extração com MTBE, DIBK e acetato de heptila, apresentam uma população de moléculas com tamanhos maiores e menores, possuindo então estruturas com contribuição de fractal e de discos, tendo que os provenientes da extração com MTBE apresentam maior tendência de terem fragmentos maiores e com ramificações, enquanto o DIBK e acetato de heptila apontam a presença de fragmentos maiores preferencialmente sem ramificações ou com baixo percentual de ramificações.

O espectro de RMN 2D HSQC apresentou sinais típicos e correspondentes as estruturas *p*-cumarato (*p*Ca) e ferulato (FA) para todos os extratos fenólicos, confirmando os estiramentos pronunciados na região espectral de  $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  identificados pelo FTIR e provavelmente associados a grupos carbonilas conjugados com anéis aromáticos.

A avaliação preliminar do das caracteríticas e concentrações dos inibidores frente ao desempenho fermentativo inferiu a sinergia da toxicidade do ácido acético (em concentrações acima de 2 g/L) com unidades ferulato. Resultando em decréscimo no metabolismo celular tanto para *S. stipitis* como para *S. passalidarum*.

Uma caracterização preliminar do hidrolisado hemicelulósico evaporado foi realizada por UPLC-MSMS apresentando concentrações majoritárias de ácido 4-hidroxicinâmico (0,5 g/L), 4-hidroxiacetofenona (0,329 g/L) e 4- hidrobenzaldeído (0,195 g/L),

não sendo detectada a presença de catecol, hidroquinona, álcool coniferílico e isoeugenol. A maior parcela dos compostos apresenta baixa massa molar, entre 80 e 400 g/mol, correspondendo a monômeros, dímeros e no máximo trímeros de estruturas preferencialmente aromáticas. O processo de destoxificação com MIBK resultou na remoção total de 36% dos compostos presentes e detectados pelo UPLC-MSMS, sendo majoritariamente constituídos por fragmentos de massa molar até 400 g/mol. Dentre os padrões quantificados todos foram extraídos, exceto o ácido ferúlico e *trans*-ferúlico com valores residuais de 0,01 g/L.

A abordagem comparativa entre as características estruturais dos inibidores com os correspondentes desempenhos fermentativos é extremamente complexa, mas os resultados apresentados nessa tese proverão direcionamentos para próximos trabalhos.

Como sugestões para próximos trabalhos, enumera-se:

- Avaliação do processo de fermentação com reciclo celular e batelada alimentada empregando o hidrolisado destoxificado selecionado (MIBK) e a levedura *S. passalidarum*;
- Avaliação da integridade da membrana celular das leveduras durante o processo de fermentação com reciclo e batelada alimentada;
- Fracionamento dos extratos fenólicos na tentativa de isolamento de algumas classes de inibidores;
- Emprego de dois ou mais tipos de solventes no processo de destoxificação visando melhorias no desempenho fermentativo;
- Utilização de modelos de lignina, contendo dímeros e trímeros, visando a construção/melhoria da biblioteca de identificação de compostos fenólicos por UPLC-MSMS;
- Estudos de adaptação evolutiva dos microorganismos usados neste trabalho para os principais inibidores identificados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adapa, P., Schonenaus, L., Canam, T., Dumonceaux, T., 2011. Quantitative Analysis of Lignocellulosic Components of Non-Treated and Steam Exploded Barley, Canola, Oat and Wheat Straw Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Sci. Technol.* 177.
- Adeboye, P.T., Bettiga, M., Aldaeus, F., Larsson, P.T., Olsson, L., 2015. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. *Microb. Cell Fact.* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0338-x>
- Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L., 2014. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *AMB Express* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0046-7>
- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 30, 1515–1524. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9728-z>
- Allard, P.-M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V.C., Roussi, F., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., 2016. Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal. Chem.* 88, 3317–3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804>
- Allen, S.A., Clark, W., McCaffery, J.M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Gorsich, S.W., 2010. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 3, 2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Almeida, J.R.M., Röder, A., Modig, T., Laadan, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2008. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 939–945. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1364-y>
- Alriksson, B., Cavka, A., Jönsson, L.J., 2011. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. *Bioresour. Technol.* 102, 1254–1263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.037>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.093>
- Amadi, P.U., Ifeanacho, M.O., 2016. Impact of changes in fermentation time, volume of yeast, and mass of plantain pseudo-stem substrate on the simultaneous saccharification and fermentation potentials of African land snail digestive juice and yeast. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 14, 289–297. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2016.09.002>
- An, L., Wang, G., Jia, H., Liu, C., Sui, W., Si, C., 2017. Fractionation of enzymatic hydrolysis

- lignin by sequential extraction for enhancing antioxidant performance. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.015>
- Arslan, Y., Eken-Saraçoğlu, N., 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. *Bioresour. Technol.* 101, 8664–8670. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.085>
- Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V., Olsson, L., 2013a. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. *Biotechnol. Biofuels* 6, 181. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-181>
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L., 2013b. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* 6, 22. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-22>
- Atalla, R.H., Agarwal, U.P., 1985. Raman Microprobe Evidence for Lignin Orientation in the Cell Walls of Native Woody Tissue. *Science* (80-. ). 227, 636–638. <https://doi.org/10.1126/science.227.4687.636>
- Banerjee, N., Bhatnagar, R., Viswanathan, L., 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 226–228. <https://doi.org/10.1007/BF00505872>
- Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* 102, 10868–10874. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.128>
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>
- Brandt, A., Chen, L., Van Dongen, B.E., Welton, T., Hallett, J.P., 2015. Structural changes in lignins isolated using an acidic ionic liquid water mixture. *Green Chem.* 17, 5019–5034. <https://doi.org/10.1039/c5gc01314c>
- BRAZIL, G., 2015. Intended Nationally Determined Contribution towards achieving the objective of the United Nations Framework Convention on Climate Change. Brasilia, DF.
- Brebu, M., Vasile, C., 2009. THERMAL DEGRADATION OF LIGNIN – A REVIEW. *Cellul. Chem. Technol.* 44, 353–363.
- Brenelli, L.B., Mandelli, F., Mercadante, A.Z., Rocha, G.J. de M., Rocco, S.A., Craievich, A.F., Gonçalves, A.R., Centeno, D. da C., de Oliveira Neto, M., Squina, F.M., 2016. Acidification treatment of lignin from sugarcane bagasse results in fractions of reduced polydispersity and high free-radical scavenging capacity. *Ind. Crops Prod.* 83, 94–103. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.12.013>
- Brink, L.E.S., Tramper, J., 1985. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1258–1269. <https://doi.org/10.1002/bit.260270822>
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K.B., Ramakrishnan, S., 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res.* 2011, 787532. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Brouwer, T., Blahusiak, M., Babic, K., Schuur, B., 2017. Reactive extraction and recovery of levulinic acid, formic acid and furfural from aqueous solutions containing sulphuric acid.



- Sep. Purif. Technol. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.036>
- Buanafina, M.M. de O., 2009. Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Mol. Plant* 2, 861–872. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp067>
- Bule, M. V., Gao, A.H., Hiscox, B., Chen, S., 2013. Structural Modification of Lignin and Characterization of Pretreated Wheat Straw by Ozonation. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3916–3925. <https://doi.org/10.1021/jf4001988>
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., 2005. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* 46, 5845–5850. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2005.06.140>
- Burk, M.J., 2010. INTERNATIONAL SUGAR JOURNAL, Sustainable production of industrial chemicals from sugars. *International Sugar Journal*.
- Burkhardt, S., Kumar, L., Chandra, R., Saddler, J., 2013. How effective are traditional methods of compositional analysis in providing an accurate material balance for a range of softwood derived residues? *Biotechnol. Biofuels* 6, 90. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-90>
- Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussán, K.J., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, S.S., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Gomes, F.C.O., Lachance, M.-A., Rosa, C.A., 2012. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS One* 7, e43135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043135>
- Caetano, A.C.G., Madeleno, L.L., 2011. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. *Ciência Tecnol.* 2, 27–37.
- Canilha, L., Carvalho, W., de Almeida Felipe, M. das G., de Almeida e Silva, J.B., Giuliatti, M., 2010. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 84–92. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8792-8>
- Canilha, L., Santos, V.T.O., Rocha, G.J.M., Almeida e Silva, J.B., Giuliatti, M., Silva, S.S., Felipe, M.G.A., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., Carvalho, W., 2011. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0931-2>
- Cao, S., Pu, Y., Studer, M., Wyman, C., Ragauskas, A.J., 2012. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *RSC Adv.* 2, 10925. <https://doi.org/10.1039/c2ra22045h>
- Carpita, N.C., 1996. STRUCTURE AND BIOGENESIS OF THE CELL WALLS OF GRASSES. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 445–476. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.445>
- Caspeta, L., Castillo, T., Nielsen, J., 2015. Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 184. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00184>
- Cavka, A., Stagge, S., Jönsson, L.J., 2015. Identification of Small Aliphatic Aldehydes in Pretreated Lignocellulosic Feedstocks and Evaluation of Their Inhibitory Effects on Yeast. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9747–9754. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04803>
- CGEE, C.F.S.S.A.M., 2017. Second-generation sugarcane bioenergy Advanced low-carbon fuels for transport and industry. Brasilia, DF.
- Chandel, A.K., Kapoor, R.K., Singh, A., Kuhad, R.C., 2007. Detoxification of sugarcane

- bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* 98, 1947–1950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.047>
- Chandel, A.K., Narasu, M.L., Rudravaram, R., Pogaku, R., Rao, L.V., 2009. Bioconversion of de-oiled rice bran (DORB) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by *Pichia stipitis* NCM3499 under optimized conditions. *Int. J. Food Eng.* 5. <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1453>
- Chandel, A.K., Silva, S.S., Singh, O. V., 2011. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. *Biofuel Prod.* ... 2012, 989572. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>
- Chandel, A.K., Singh, O. V., Rao, L. V., Venkateswar Rao, L., Rao, L. V., 2010. Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: State-of-the-art, in: *Sustainable Biotechnology: Sources of Renewable Energy*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 63–81. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9_4)
- Chen, Y., Sarkanen, S., 2010. Macromolecular replication during lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 71, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.11.012>
- Cheng, K.-K., Cai, B.-Y., Zhang, J.-A., Ling, H.-Z., Zhou, Y.-J., Ge, J.-P., Xu, J.-M., 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng. J.* 38, 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.07.012>
- Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S., 2014. Conversion of biomass platform molecules into fuel additives and liquid hydrocarbon fuels. *Green Chem.* 16, 516. <https://doi.org/10.1039/c3gc41492b>
- Collard, F.-X., Blin, J., 2014. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 38, 594–608. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.06.013>
- Constant, S., Wienk, H.L.J., Frissen, A.E., Peinder, P. de, Boelens, R., van Es, D.S., Grisel, R.J.H., Weckhuysen, B.M., Huijgen, W.J.J., Gosselink, R.J.A., Bruijninx, P.C.A., 2016. New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. *Green Chem.* 18, 2651–2665. <https://doi.org/10.1039/C5GC03043A>
- Corrales, R.C.N.R., Mendes, F.M., Perrone, C., Sant'Anna, C., de Souza, W., Abud, Y., Bon, E.P. da S., Ferreira-Leitão, V., 2012. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Biofuels* 5, 36. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-36>
- Costa, A.K.B., 2016. Estudo da fermentação de hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela linhagem *Spathaspora passalidarum* UFMG-HMD 14.1. Universidade Estadual de Campinas.
- Crestini, C., Melone, F., Sette, M., Saladino, R., 2011. Milled wood lignin: A linear oligomer. *Biomacromolecules* 12, 3928–3935. <https://doi.org/10.1021/bm200948r>
- da Cunha-Pereira, F., Hickert, L.R., Sehnem, N.T., de Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z., 2011. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour. Technol.* 102, 4218–4225. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.12.060>
- Deighton, N., Richardson, A., Stewart, D., McDougall, G.J., 1999. Cell-wall-associated

- oxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: Monolignol oxidation. *Holzforschung* 53, 503–510. <https://doi.org/10.1515/HF.1999.083>
- del Río, J.C., Lino, A.G., Colodette, J.L., Lima, C.F., Gutiérrez, A., Martínez, Á.T., Lu, F., Ralph, J., Rencoret, J., 2015. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. *Biomass and Bioenergy* 81, 322–338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.006>
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 220–225. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00237-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00237-5)
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1990. Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. *Process Biochem.* 25, 132–135.
- Dias, M.O.S., Junqueira, T.L., Cavalett, O., Pavanello, L.G., Cunha, M.P., Jesus, C.D.F., Maciel Filho, R., Bonomi, A., 2013a. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl. Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.081>
- Dias, M.O.S., Junqueira, T.L., Rossell, C.E. V., Maciel Filho, R., Bonomi, A., 2013b. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. *Fuel Process. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.041>
- Diaz De Villegas, M.E., Villa, P., Guerra, M., Rodriguez, E., Redondo, D., Martinez, A., 1992. Conversion of furfural into furfuryl alcohol by *saccharomyces cerevisiae* 354. *Acta Biotechnol.* 12, 351–354. <https://doi.org/10.1002/abio.370120420>
- Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2009. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 891–899. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9966-9>
- Doherty, P., Mousavioun, W.O.S., 2010. Chemical and Thermal Properties of Bagasse Soda Lignin. *Ind. Crops Prod.* 31, 52–58.
- Doherty, W.O.S., Mousavioun, P., Fellows, C.M., 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind. Crops Prod.* 33, 259–276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.022>
- Domínguez, J.C., Oliet, M., Alonso, M.V., Gilarranz, M.A., Rodríguez, F., 2008. Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from *Eucalyptus globulus*. *Ind. Crops Prod.* 27, 150–156. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2007.07.006>
- Donaldson, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry - An ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859–873. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00049-8)
- Donaldson, L.A., 1994. Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Sci. Technol.* 28, 111–118. <https://doi.org/10.1007/BF00192690>
- Donohoe, B.S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 913–925. <https://doi.org/10.1002/bit.21959>
- du Preez, J.C., 1994. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose

- fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 944–956. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90003-5)
- Durie, R.A., Lynch, B.M., Sternhell, S., 1960. Comparative Studies of Brown Coal and Lignin. I. Infra-Red Spectra. *Aust. J. Chem.* 13, 156. <https://doi.org/10.1071/CH9600156>
- Dussán, K.J., Silva, D.D.V., Perez, V.H., da Silva, S.S., 2016. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. Energy* 87, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.065>
- Ebringerová, A., Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21, 542–556. [https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7)
- Eken-Saraçoğlu, N., Arslan, Y., 2000. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* 22, 855–858. <https://doi.org/10.1023/A:1005663313597>
- Eraso, P., Gancedo, C., 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 224, 187–192. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80445-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80445-3)
- Erdtmann, H., 1939. Oversikt over naturprodukter av diaryl-butan-typ. *Svenk Papperstodning-Nord. Cellul.* 42, 115–122.
- Fangkum, A., Reungsang, A., 2011. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 8687–8696. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.119>
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin. <https://doi.org/10.1007/BF02608943>
- Ferreira, A.D., Mussatto, S.I., Cadete, R.M., Rosa, C.A., Silva, S.S., 2011. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.1858>
- Fonseca, B.G., Moutta, R. de O., Ferraz, F. de O., Vieira, E.R., Nogueira, A.S., Baratella, B.F., Rodrigues, L.C., Hou-Rui, Z., da Silva, S.S., 2011. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 199–207. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0845-z>
- Ford, C., Hartley, R.D., 1990. Cyclodimers of p-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.* 50, 29–43. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740500105>
- Frei, M., 2013. Lignin: Characterization of a multifaceted crop component. *Sci. World J.* 2013, 436517. <https://doi.org/10.1155/2013/436517>
- Freudenberg, K., 1965. Lignin- Its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols. *Science* (80- ). 148, 595–600.
- Fry, S.C., Willis, S.C., Paterson, A.E.J., 2000. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* 211, 679–692. <https://doi.org/10.1007/s004250000330>
- Fukushima, K., Terashima, N., 1991. Heterogeneity in formation of lignin. *Wood Sci. Technol.* 25, 371–381. <https://doi.org/10.1007/BF00226177>

- Garlock, R.J., Balan, V., Dale, B.E., Ramesh Pallapolu, V., Lee, Y.Y., Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Holtzapple, M.T., Falls, M., Sierra-Ramirez, R., Shi, J., Ebrik, M.A., Redmond, T., Yang, B., Wyman, C.E., Donohoe, B.S., Vinzant, T.B., Elander, R.T., Hames, B., Thomas, S., Warner, R.E., 2011. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. *Bioresour. Technol.* 102, 11063–11071. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.04.002>
- Ghiaci, P., Norbeck, J., Larsson, C., 2013. Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels* 6, 101. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-101>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.01.088>
- Gjersing, E., Happs, R.M., Sykes, R.W., Doepcke, C., Davis, M.F., 2013. Rapid determination of sugar content in biomass hydrolysates using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 721–728. <https://doi.org/10.1002/bit.24741>
- Glatter, V.O., Kratky, O., 1982. *General theory, Small-Angle X-ray Scattering*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/actp.1985.010360520>
- González-Ramos, D., van den Broek, M., van Maris, A.J., Pronk, J.T., Daran, J.-M.G., 2013. Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation. *Biotechnol. Biofuels* 6, 48. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-48>
- Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Ralph, J., 2003. Apoplastic pH and Monolignol Addition Rate Effects on Lignin Formation and Cell Wall Degradability in Maize. <https://doi.org/10.1021/JF030027C>
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., 2000. Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6106–13.
- Grazinoli-Garrido, R., Sola-Penna, M., 2004. Inactivation of yeast inorganic pyrophosphatase by organic solvents. *An. Acad. Bras. Cienc.* 76, 699–705. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652004000400006>
- Greetham, D., Wimalasena, T., Kerruish, D.W.M., Brindley, S., Ibbett, R.N., Linforth, R.L., Tucker, G., Phister, T.G., Smart, K.A., 2014. Development of a phenotypic assay for characterisation of ethanologenic yeast strain sensitivity to inhibitors released from lignocellulosic feedstocks. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 931–945. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1431-6>
- Grzenia, D.L., Schell, D.J., Wickramasinghe, S.R., 2012. Membrane extraction for detoxification of biomass hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 111, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.169>
- Gu, T., Held, M., Faik, A., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. *Environ. Technol.*
- Guo, Z., Olsson, L., 2014. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. *FEMS Yeast Res.* 14, 1234–1248. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12221>
- Gursel, I.V., Dijkstra, J.W., Huijgen, W.J.J., Ramirez, A., 2019. Techno-economic comparative assessment of novel lignin depolymerization routes to bio-based aromatics. *Biofuels*,

- Bioprod. Biorefining. <https://doi.org/10.1002/bbb.1999>
- Hadi, S., Bhat, S., Azmi, A., Hanif, S., Shamim, U., Ullah, M., 2007. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Semin. Cancer Biol.* 17, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.04.002>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 937–953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- Hammersley, A.P., 1997. FIT2D: An Introduction and Overview. Grenoble.
- Hanaki, K., Portugal-Pereira, J., 2018. The Effect of Biofuel Production on Greenhouse Gas Emission Reductions. Springer, Tokyo, pp. 53–71. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-54895-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-4-431-54895-9_6)
- Hao, X.-C., Yang, X.-S., Wan, P., Tian, S., 2013. Comparative proteomic analysis of a new adaptive *Pichia Stipitis* strain to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Biotechnol. Biofuels* 6, 34. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-34>
- Harris, D., DeBolt, S., 2010. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00481.x>
- Hatfield, R., Ralph, J., Grabber, J.H., 2008. A potential role for sinapyl p-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation. *Planta* 228, 919–928. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0791-4>
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. *Lignin Lignan Biosynth.* 79, 209–236. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<403::AID-JSFA263>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<403::AID-JSFA263>3.0.CO;2-0)
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1998. Cell wall cross-linking in grasses by ferulates and diferulates. *Lignin Lignan Biosynth.* 697, 209–236. <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0697.ch016>
- Hatfield, R.D., Rancour, D.M., Marita, J.M., 2016. Grass Cell Walls: A Story of Cross-Linking. *Front. Plant Sci.* 7, 2056. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02056>
- He, L., Terashima, N., 1990. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. III. Heterogeneity of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Lignin with Respect to the Composition of Structural Units in Different Morphological Regions. *J. Wood Chem. Technol.* 10, 435–459. <https://doi.org/10.1080/02773819008050251>
- Heer, D., Heine, D., Sauer, U., 2009. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7631–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.01649-09>
- Heipieper, H.J., Keweloh, H., Rehm, H.J., 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1213–7.
- Heitner, C., Dimmel, D., Schmidt, J.A., 2010. Lignin and lignans : advances in chemistry. CRC Press, Taylor & Francis.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.05.027>

- Heredia-Olea, E., Pérez-Carrillo, E., Serna-Saldívar, S.O., 2012. Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 119, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.122>
- Hergert, H.L., 1960. Infrared Spectra of Lignin and Related Compounds. II. Conifer Lignin and Model Compounds 1,2. *J. Org. Chem.* 25, 405–413. <https://doi.org/10.1021/jo01073a026>
- Hergert, H.L., Kurth, E.F., 1953. The Infrared Spectra of Lignin and Related Compounds. I. Characteristic Carbonyl and Hydroxyl Frequencies of Some Flavanones, Flavones, Chalcones and Acetophenones<sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1622–1625. <https://doi.org/10.1021/ja01103a031>
- Hoareau, W., Trindade, W.G., Siegmund, B., Castellan, A., Frollini, E., 2004. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. *Polym. Degrad. Stab.* 86, 567–576. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2004.07.005>
- Holtman, K.M., 2003. An Investigation of the Milled Wood Lignin Isolation Procedure by Solution and Solid State NMR Spectroscopy Cap. 2.
- Horisawa, S., Inoue, A., Yamanaka, Y., 2019. Direct ethanol production from lignocellulosic materials by mixed culture of wood rot fungi *schizophyllum commune*, *Bjerkandera adusta*, and *fomitopsis palustris*. *Fermentation* 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010021>
- Hou, X., 2012. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 205–214. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3694-4>
- Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S., Zhao, Z.K., 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresour. Technol.* 100, 4843–4847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.041>
- Hu, F., Jung, S., Ragauskas, A., 2012. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 117, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.037>
- Hu, F., Ragauskas, A., 2014. Suppression of pseudo-lignin formation under dilute acid pretreatment conditions. *RSC Adv.* 4, 4317–4323. <https://doi.org/10.1039/C3RA42841A>
- IRENA, 2014. Global bioenergy: supply and demand projections. Working Paper for REmap 2030. Abu Dhabi.
- Ishii, T., 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127, 111–127. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00130-1)
- Jacobsen, S.E., Wyman, C.E., 2002. 2002 Xylose Monomer and Oligomer Yields for Uncatalyzed Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose at Varying Solids Concentration.pdf. <https://doi.org/10.1021/IE001025+>
- Jakab, E., Faix, O., Till, F., 1997. Thermal decomposition of milled wood lignins studied by thermogravimetry/mass spectrometry. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 40–41, 171–186. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(97\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(97)00046-6)
- Jeong, G.T., Kim, S.K., Park, D.H., 2013. Detoxification of hydrolysate by reactive-extraction for generating biofuels. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 88–93. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0417-3>

- Jiang, L.-Q., Fang, Z., Li, X.-K., Luo, J., Fan, S.-P., 2013. Combination of dilute acid and ionic liquid pretreatments of sugarcane bagasse for glucose by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 48, 1942–1946. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.09.012>
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels* 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>
- Jönsson, L.J., Martín, C., Johsson, L.J., Martín, C., Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.10.009>
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Biorefining.* <https://doi.org/10.1002/bbb.4>
- Junqueira, T.L., Chagas, M.F., Gouveia, V.L.R., Rezende, M.C.A.F., Watanabe, M.D.B., Jesus, C.D.F., Cavalett, O., Milanez, A.Y., Bonomi, A., 2017. , Mateus F. Chagas. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0722-3>
- Keweloh, H., Weyrauch, G., Rehm, H., 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 66–71. <https://doi.org/10.1007/BF00170572>
- Kilian, S.G., Uden, N. van., 1988. *Applied microbiology and biotechnology.*, Applied microbiology and biotechnology. Springer-Verlag.
- Kim, D., 2018. Physico-chemical conversion of lignocellulose: Inhibitor effects and detoxification strategies: A mini review. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23020309>
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S., Passoth, V., 2005. Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 247–253. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1746-8>
- Kohlbrecher, J., Buitenhuis, J., Meier, G., Lettinga, M.P., 2006. Colloidal dispersions of octadecyl grafted silica spheres in toluene: A global analysis of small angle neutron scattering contrast variation and concentration dependence measurements. *J. Chem. Phys.* 125. <https://doi.org/10.1063/1.2220564>
- Kumar, A.K., Sharma, S., 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, N., Pruthi, V., 2015. Structural elucidation and molecular docking of ferulic acid from *Parthenium hysterophorus* possessing COX-2 inhibition activity. *3 Biotech* 5, 541–551. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0253-6>



- Kurtzman, C.P., 2010. Scheffersomyces, in: *The Yeasts*. pp. 773–777.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K., Stone, B.A., 1994. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractionated cell walls of wheat internodes. *Phytochemistry* 37, 327–333. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85055-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85055-0)
- Lam, T.B.T., Kadoya, K., Iiyama, K., 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: Ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the  $\beta$ -position, in grass cell walls. *Phytochemistry* 57, 987–992. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00052-8)
- Lan, K., Xu, S., Li, J., Hu, C., 2019. Recovery of Lactic Acid from Corn Stover Hemicellulose-Derived Liquor. *ACS Omega* 4, 10571–10579. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00794>
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N., 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X)
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J., 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 617–32.
- Laskar, D.D., Zeng, J., Yan, L., Chen, S., Yang, B., 2013. Characterization of lignin derived from water-only flowthrough pretreatment of *Miscanthus*. *Ind. Crops Prod.* 50, 391–399. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.08.002>
- Lee, H., Biely, P., Latta, R.K., Barbosa, M.F., Schneider, H., 1986. Utilization of Xylan by Yeasts and Its Conversion to Ethanol by *Pichia stipitis* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 320–4.
- Leschinsky, M., Weber, H.K., Patt, R., Sixta, H., 2009. Formation of Insoluble Components During Autohydrolysis of *Eucalyptus Globulus*. *Lenzinger Berichte* 87, 16–25.
- Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2007. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 98, 3061–3068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.018>
- Li, J., Henriksson, G., Gellerstedt, G., 2005. Carbohydrate Reactions During High-Temperature Steam Treatment of Aspen Wood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 125, 175–188. <https://doi.org/10.1385/ABAB:125:3:175>
- Li, X., Jackson, P., Rubtsov, D. V, Faria-Blanc, N., Mortimer, J.C., Turner, S.R., Krogh, K.B., Johansen, K.S., Dupree, P., 2013. Development and application of a high throughput carbohydrate profiling technique for analyzing plant cell wall polysaccharides and carbohydrate active enzymes. *Biotechnol. Biofuels* 6, 94. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-94>
- Liu, W.C., Inwood, S., Gong, T., Sharma, A., Yu, L.Y., Zhu, P., 2019. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 258–271. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1554620>
- Liu, Z.L., 2011. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3167-9>
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W., 2004.

- Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0148-3>
- Lora, J.H., Wayman, M., 1980. Autohydrolysis of aspen milled wood lignin. *Can. J. Chem.* 58, 669–676. <https://doi.org/10.1139/v80-102>
- Lorenzi, B.R., Andrade, T.H.N. de, 2019. O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO NO BRASIL: POLÍTICAS E REDES SOCIOTÉCNICAS. *Rev. Bras. Ciências Sociais.* <https://doi.org/10.1590/3410014/2019>
- Lou, R., Wu, S., Lv, G., Guo, D., 2010. Pyrolytic products from rice straw and enzymatic/mild acidolysis lignin (EMAL). *BioResources* 5, 2184–2194. <https://doi.org/10.15376/biores.5.4.2184-2194>
- Lv, W.J., Xue, C.Y., Cao, C.Y., Zhang, Y., 2010. Lignin distribution in wood cell wall and its testing methods. *J. Beijing Univ.* 32, 136–141.
- Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M.G., Davies, J.M., 2005. Plasma membrane H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology* 151, 1995–2003. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27502-0>
- Mans, R., Daran, J.M.G., Pronk, J.T., 2018. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.011>
- Mansfield, S.D., Kim, H., Lu, F., Ralph, J., 2012. Whole plant cell wall characterization using solution-state 2D NMR. *Nat. Protoc.* 7, 1579–1589. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.064>
- Markwalder, H.U., Neukom, H., 1976. Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* 15, 836–837. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94474-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94474-1)
- Mateo, S., Roberto, I.C., Sánchez, S., Moya, A.J., 2013. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Ind. Crops Prod.* 49, 196–203. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.04.046>
- Maziero, P., Neto, M. de O., Machado, D., Batista, T., Cavalheiro, C.C.S., Neumann, M.G., Craievich, A.F., Rocha, G.J. de M., Polikarpov, I., Gonçalves, A.R., 2012. Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. *Ind. Crops Prod.* 35, 61–69. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2011.06.008>
- Milanez, A.Y., Nyko, D., Valente, M.S., Sousa, L.C., Bonomi, A.M.F.L.J., Jesus, C.D.F., Watanabe, M.D.B., Chagas, M.F., Rezende, M.C.A.F., Cavalett, O., Junqueira, T.L., Gouvêia, V.L.R., 2015. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar-uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública, BNDES Setorial. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social.
- Mira, N.P., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I., 2010. Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View. *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 525–540. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0072>
- Modig, T., Lidén, G., Taherzadeh, M.J., 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* 363,

769–76.

- Mollapour, M., Piper, P.W., 2007. Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis, Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6446–6456. <https://doi.org/10.1128/MCB.02205-06>
- Morreel, K., Kim, H., Lu, F., Dima, O., Akiyama, T., Vanholme, R., Niculaes, C., Goeminne, G., Inzé, D., Messens, E., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Mass Spectrometry-Based Fragmentation as an Identification Tool in Lignomics. *Anal. Chem.* 82, 8095–8105. <https://doi.org/10.1021/ac100968g>
- Mottiar, Y., Gierlinger, N., Jeremic, D., Master, E.R., Mansfield, S.D., 2020. Atypical lignification in eastern leatherwood (*Dirca palustris*). *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.16394>
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R.D., Harris, P.J., Curzon, E.H., 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* 148, 71–85. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)80038-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)80038-6)
- Mussatto, S.I., Santos, J.C., Roberto, I.C., 2004. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 590–596. <https://doi.org/10.1002/jctb.1026>
- Nakanishi, S.C., Soares, L.B., Biazi, L.E., Nascimento, V.M., Costa, A.C., Rocha, G.J.M., Ienczak, J.L., 2017. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* 114. <https://doi.org/10.1002/bit.26357>
- Naron, D.R., Collard, F.-X., Tyhoda, L., Görgens, J.F., 2017. Characterisation of lignins from different sources by appropriate analytical methods: Introducing thermogravimetric analysis-thermal desorption-gas chromatography–mass spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* 101, 61–74. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.02.041>
- Negrão, D.R., 2015. Modificações estruturais da lignina causada por fungos. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.
- Negritto, M.C., Valdez, C., Sharma, J., Rosenberg, C., Selassie, C.R., 2017. Growth Inhibition and DNA Damage Induced by X-Phenols in Yeast: A Quantitative Structure-Activity Relationship Study. *ACS omega* 2, 8568–8579. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01200>
- Nguyen, N.H., Suh, S.-O., Marshall, C.J., Blackwell, M., 2006. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycol. Res.* 110, 1232–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.002>
- Nguyen, N.H., Suh, S.O., Blackwell, M., 2011. *Spathaspora* N.H: Nguyen, S.-O. Suh & M. Blackwell (2006), in: *The Yeasts*. pp. 795–797. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00068-9>
- Nie, X.-N., Liu, J., She, D., Sun, R.-C., Xu, F., 2013. Physicochemical and Structural Characterization of Hemicelluloses Isolated by Different Alcohols from Rice Straw. *BioResources* 8, 3817–3832.
- Nimz, H., 1974. Beech Lignin? Proposal of a Constitutional Scheme. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 13, 313–321. <https://doi.org/10.1002/anie.197403131>

- NovaCana, 2020. Nova Cana [WWW Document]. URL <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/presidente-granbio-e2g-consolidado-empresa-pronta-nova-etapa-230320>
- Oikawa, S., Nishino, K., Oikawa, S., Inoue, S., Mizutani, T., Kawanishi, S., 1998. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochem. Pharmacol.* 56, 361–70.
- Oliveira, R.A., Rossell, C.E. V., Venus, J., Rabelo, S.C., Maciel Filho, R., 2018. Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. *J. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.006>
- Orlean, P., 2012. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* 192, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N.Q., Hahn-Hagerdal, B., 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 46–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990405\)63:1<46::AID-BIT5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990405)63:1<46::AID-BIT5>3.0.CO;2-J)
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00160-1)
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Parajo, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M. (Department of C.E.U. of V. (Campus O.A.L. 32004 O. (Spain)), 1997. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochem.* (United Kingdom).
- Parawira, W., Tekere, M., 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 31, 20–31. <https://doi.org/10.3109/07388551003757816>
- Parijs, v F.R.D., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., Merks, R.M.H., 2010. Modeling Lignin Polymerization. I. Simulation Model of Dehydrogenation Polymers. *PLANT Physiol.* 153, 1332–1344. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154468>
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G., 2013. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1921-1>
- Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.-C., 2009. Comparative Study of Hemicelluloses Obtained by Graded Ethanol Precipitation from Sugarcane Bagasse. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6305–6317. <https://doi.org/10.1021/jf900986b>
- Pepper, J.M., Baylis, P.E.T., Adler, E., 1959. The isolation and properties of lignin obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium. *Can. J. Chem.* 37, 1241–1248. <https://doi.org/10.1139/v59-183>
- Pingali, S.V., Urban, V.S., Heller, W.T., McGaughey, J., O'Neill, H., Foston, M., Myles, D.A., Ragauskas, A., Evans, B.R., 2010. Breakdown of Cell Wall Nanostructure in Dilute Acid Pretreated Biomass. *Biomacromolecules* 11, 2329–2335. <https://doi.org/10.1021/bm100455h>

- Piper, P., Mollapour, M., Calderon, C.O., Hatzixanthis, K., 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* 147, 2635–2642. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2635>
- Purwadi, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2004. Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by Ca(OH)<sub>2</sub>. *J. Biotechnol.* 114, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.07.006>
- Quideau, S., Ralph, J., 1997. Lignin–ferulate cross-links in grasses. Part 4.1–3 Incorporation of 5–5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 0, 2351–2358. <https://doi.org/10.1039/a701808h>
- Rabelo, S.C., Andrade, R.R., Maciel Filho, R., Costa, A.C., 2014. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel* 136, 349–357. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2014.07.033>
- Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A.K., Saddler, J.N., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Wyman, C.E., 2014. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science* (80-. ). 344. <https://doi.org/10.1126/science.1246843>
- Ralph, J., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* 275, 167–178. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00237-N](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00237-N)
- Ralph, J., Landucci, L., 2010. NMR of Lignins. *Lignin and Lignans* 137–243. <https://doi.org/10.1201/EBK1574444865-c5>
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 602, 3485. <https://doi.org/10.1039/p19940003485>
- Reinoso, F.A.M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Milagres, A.M.F., Del Río, J.C., Ferraz, A., 2018. Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels* 11, 153. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1155-3>
- Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Nieto, L., Santos, J.I., Jiménez-Barbero, J., Martínez, Á.T., del Río, J.C., 2009. HSQC-NMR analysis of lignin in woody (*Eucalyptus globulus* and *Picea abies*) and non-woody (*Agave sisalana*) ball-milled plant materials at the gel state 10th EWLP, Stockholm, Sweden, August 25–28, 2008. *Holzforschung* 63, 691–698. <https://doi.org/10.1515/HF.2009.070>
- Rennie, E.A., Scheller, H.V., 2014. Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.013>
- Rezende, C., de Lima, M., Maziero, P., deAzevedo, E., Garcia, W., Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 4, 54. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-54>
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–56.
- Rinaldi, R., Jastrzebski, R., Clough, M.T., Ralph, J., Kennema, M., Bruijninx, P.C.A., Weckhuysen, B.M., 2016. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in

- Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* 55, 8164–8215. <https://doi.org/10.1002/anie.201510351>
- Roberto, I.C., Lacin, L.S., Barbosa, M.F.S., de Mancilha, I.M., 1991. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochem.* 26, 15–21. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(91\)80003-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(91)80003-8)
- Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Nakanishi, S.C., Nascimento, V.M., Silva, V.F.N., 2015. Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* 74, 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.074>
- Rocha, G.J.M., Martin, C., Soares, I.B., Souto Maior, A.M., Baudel, H.M., Moraes de Abreu, C.A., 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 35, 663–670. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2010.10.018>
- Rodrigues, R. de C.L.B., Rocha, G.J.M., Rodrigues, D., Filho, H.J.I., Felipe, M. das G.A., Pessoa, A., 2010. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). *Bioresour. Technol.* 101, 1247–1253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.034>
- Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., Almeida e Silva, J.B., Vitolo, M., Gómez, P. V., 2001. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian J. Chem. Eng.* 18, 299–311. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322001000300009>
- Roque, L.R., Morgado, G.P., Nascimento, V.M., Ienczak, J.L., Rabelo, S.C., 2019. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. *Fuel* 242, 775–787. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2018.12.130>
- Russell, J.B., 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 363–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- Sannigrahi, P., Kim, D.H., Jung, S., Ragauskas, A., 2011. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energy Environ. Sci.* 4, 1306–1310. <https://doi.org/10.1039/c0ee00378f>
- Santoro, D.C.J., Assis, T., Suzane R. D., Ienczak, J.L., Rabelo, S.C., 2015. Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production, in: *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals . Simb.*
- Santos, F.A., Queiróz, J.H. De, Colodette, J.L., Fernandes, S.A., Guimarães, V.M., 2012. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. *Quim. Nova* 35, 1004–1010. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Santos, S.C., Sousa, A.S., Dionísio, S.R., Tramontina, R., Ruller, R., Squina, F.M., Rossell, C.E.V., Costa, A.C., Ienczak, J.L., 2016. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. *Bioresour. Technol.* 219, 319–329. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.07.102>
- Sarkanen, K. V, Ludwig, C.H., 1971. Lignin: Occurrence, Formation, Structure and Reactions,

Wiley-Inte. ed. New York.

- Schirmer-Michel, A.C., Flôres, S.H., Hertz, P.F., Matos, G.S., Ayub, M.A.Z., 2008. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 99, 2898–2904. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.042>
- Selassie, C.D., DeSoyza, T. V., Rosario, M., Gao, H., Hansch, C., 1998. Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process? *Chem. Biol. Interact.* 113, 175–190. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00027-1)
- Selig, M.J., Viamajala, S., Decker, S.R., Tucker, M.P., Himmel, M.E., Vinzant, T.B., 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.* 23, 1333–1339. <https://doi.org/10.1021/bp0702018>
- Shinde, S.D., Meng, X., Kumar, R., Ragauskas, A.J., 2018. Recent advances in understanding the pseudo-lignin formation in a lignocellulosic biorefinery, *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c8gc00353j>
- Shui Yang, J., Ren Ni, J., Li Yuan, H., Wang, E., 2007. Biodegradation of three different wood chips by *Pseudomonas* sp. PKE117. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 60, 90–95. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2006.12.006>
- Silva, J.F.L., MacIel Filho, R., Wolf MacIel, M.R., 2020. Process Design and Technoeconomic Assessment of the Extraction of Levulinic Acid from Biomass Hydrolysate Using n-Butyl Acetate, Hexane, and 2-Methyltetrahydrofuran. *Ind. Eng. Chem. Res.* 59, 11031–11041. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c00794>
- Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2010. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1306–1315. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8867-6>
- Silva, N. de L., Maciel, M.R.W., Batistella, C.B., Maciel Filho, R., 2006. Optimization of biodiesel production from castor oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129–132, 405–14. <https://doi.org/10.1385/abab:130:1:405>
- Silva, N.D.L., Santander, C.M.G., Rueda, S.M.G., Wolf MacIel, M.R., M. Filho, R., 2013. Characterization of blend properties of castor biodiesel and bioethanol, in: *Industrial and Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/ie400680t>
- Siqueira, G., Milagres, A.M., Carvalho, W., Koch, G., Ferraz, A., 2011. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnol. Biofuels* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-7>
- Slininger, P.J., Shea-Andersh, M.A., Thompson, S.R., Dien, B.S., Kurtzman, C.P., Balan, V., da Costa Sousa, L., Uppugundla, N., Dale, B.E., Cotta, M.A., 2015. Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid- and base-pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. *Biotechnol. Biofuels* 8, 60. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0239-6>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.
- Sluiter, J.B., Chum, H., Gomes, A.C., Tavares, R.P.A., Azevedo, V., Pimenta, M.T.B., Rabelo, S.C., Marabezi, K., Curvelo, A.A.S., Alves, A.R., Garcia, W.T., Carvalho, W., Esteves,

- P.J., Mendonça, S., Oliveira, P.A., Ribeiro, J.A.A., Mendes, T.D., Vicentin, M.P., Duarte, C.L., Mori, M.N., 2016. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. *J. AOAC Int.* 99, 579–585. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0063>
- Soares, I.B., Mendes, K.C.S., Benachour, M., Abreu, C.A.M., 2017. Evaluation of the effects of operational parameters in the pretreatment of sugarcane bagasse with diluted sulfuric acid using analysis of variance. *Chem. Eng. Commun.* 204, 1369–1390. <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1365061>
- Soares, L.B., 2018. O efeito de inibidores do hidrolisado hemicelulósico e seu impacto no desempenho da fermentação etanólica de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. Universidade Estadual de Campinas.
- Sporck, D., Reinoso, F.A.M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Rio, J.C., Ferraz, A., Milagres, A.M.F., 2017. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. *Biotechnol. Biofuels* 10, 296. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0981-z>
- Sritrakul, N., Nitisinprasert, S., Keawsompong, S., 2017. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. *Agric. Nat. Resour.* 51, 512–519. <https://doi.org/10.1016/J.ANRES.2017.12.006>
- Stich, H.F., 1991. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat. Res.* 259, 307–24.
- Svenska pappersbruksföreningen., M., Svenska cellulosaföreningen., D.R. (Centre d'Etudes N. de G. (France)), Lundquist, K., Bardet, M., Robert, D.R., Lundquist, K., 1985. Svensk papperstidning. Swedish paper journal., *Nordic Pulp and Paper Research Journal* (Sweden). Svenska cellulosaföreningen.
- Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G., 2000. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 374–380. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80004-9)
- Takahama, U., Oniki, T., 1997. Enhancement of Peroxidase-Dependent Oxidation of Sinapyl Alcohol by an Apoplastic Component, 4-Coumaric Acid Ester Isolated from Epicotyls of *Vigna angularis* L. *Plant Cell Physiol.* 38, 456–462. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029189>
- Tana, T., Zhang, Z., Moghaddam, L., Rackemann, D.W., Rencoret, J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Doherty, W.O.S., 2016. Structural Changes of Sugar Cane Bagasse Lignin during Cellulosic Ethanol Production Process. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 5483–5494. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01093>
- Tesfaw, A., Assefa, F., 2014. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *Int. Sch. Res. Not.* 2014, 532852. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Trajano, H.L., Engle, N.L., Foston, M., Ragauskas, A.J., Tschaplinski, T.J., Wyman, C.E., 2013. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-110>
- Turumtay, H., 2015. Cell Wall Engineering by Heterologous Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes for Better Conversion of Lignocellulosic Biomass into Biofuels. *Bioenergy Res.* <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9624-z>



- Vallejos, M.E., Chade, M., Mereles, E.B., Bengoechea, D.I., Brizuela, J.G., Felissia, F.E., Area, M.C., 2016. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Ind. Crops Prod.* 91, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.007>
- Vallejos, M.E., Felissia, F.E., Cruvelo, A.A.S., Zambon, M.D., Ramos, L., Area, M.C., 2011. Chemical and physico-chemical characterization of lignins obtained from ethanol-water fractionation of bagasse. *BioResources* 6, 1158–1171. <https://doi.org/10.15376/biores.6.2.1158-1171>
- van Zyl, C., Prior, B.A., du Preez, J.C., 1991. Acetic acid inhibition of d-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 82–86. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90193-E](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90193-E)
- Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., Kim, H., Cross, J., Morreel, K., Araujo, P., Welsh, L., Hausteraete, J., McClellan, C., Vanholme, B., Ralph, J., Simpson, G.G., Halpin, C., Boerjan, W., 2013. Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis*. *Science* (80-. ). 341, 1103–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1241602>
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2008. Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.005>
- Vaz, J.S., Santoro, D.C.J., Nascimento, V.M., Rabelo, S.C., 2017. Pré tratamento com ácido diluído do bagaço de cana de açúcar para a máxima recuperação de xilose. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017., Brasilia.
- Verduyn, C., 1991. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60, 325–353. <https://doi.org/10.1007/BF00430373>
- Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida E Silva, J.B., 2006. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.032>
- Wang, H., Frits, P. de V., Jin, Y., 2009. A win-win technique of stabilizing sand dune and purifying paper mill black-liquor. *J. Environ. Sci.* 21, 488–493. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62296-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62296-2)
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V. V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O’Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T.,

- Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, X., Tsang, Y.F., Li, Y., Ma, X., Cui, S., Zhang, T.-A.A., Hu, J., Gao, M.-T.T., 2017. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* 244, 1059–1067. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.096>
- Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A., Jeelani, S., 2015. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. *J. Mater. Res. Technol.* 4, 26–32. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2014.10.009>
- Wei, W., Wu, S., Liu, L., 2012. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. *Bioresour. Technol.* 110, 302–307. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.01.003>
- Windeisen, E., Wegener, G., 2012. Lignin as Building Unit for Polymers, in: Matyjaszewski, K., Möller, M. (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 10 Volume Set. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 255–265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00263-6>
- Wittkowski, R., Ruther, J., Drinda, H., Rafiei-Taghanaki, F., 1992. Formation of Smoke Flavor Compounds by Thermal Lignin Degradation, in: *Flavor Precursors*. pp. 232–243. <https://doi.org/10.1021/bk-1992-0490.ch018>
- Wohlbach, D.J., Kuo, A., Sato, T.K., Potts, K.M., Salamov, A.A., LaButti, K.M., Sun, H., Clum, A., Pangilinan, J.L., Lindquist, E.A., Lucas, S., Lapidus, A., Jin, M., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B.E., Jeffries, T.W., Zinkel, R., Barry, K.W., Grigoriev, I. V., Gasch, A.P., 2011. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13212–13217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103039108>
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* 74, 307–319. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00163-X)
- Xu, F., Sun, R.C., Sun, J.X., Liu, C.F., He, B.H., Fan, J.S., 2005. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Anal. Chim. Acta* 552, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.07.037>
- Xue, S., Jones, A.D., Sousa, L., Piotrowski, J., Jin, M., Sarks, C., Dale, B.E., Balan, V., 2018. Water-soluble phenolic compounds produced from extractive ammonia pretreatment exerted binary inhibitory effects on yeast fermentation using synthetic hydrolysate. *PLoS One* 13, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194012>
- Yang, M., Xing, J., Liu, Y.Y.Y., Liu, Y.Y.Y., Mu, T., Zhou, J., Maohua Yang; Jianmin Xing; Yuyang Liu; Yilan Liu; Tingzhen Mu; Jiemin Zhou, Yang, M., Xing, J., Liu, Y.Y.Y., Liu, Y.Y.Y., Mu, T., Zhou, J., 2015. Formation and Characterization of Pseudo-Lignin Microspheres during High-pressure Water Pretreatment. *BioResources* 10. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.8474-8486>

- Yasarla, L.R., Ramarao, B. V., 2012. Dynamics of flocculation of lignocellulosic hydrolyzates by polymers. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 6847–6861. <https://doi.org/10.1021/ie202567c>
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., Serrano, R., 2005. pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8683–92. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8683-8692.2005>
- Zaldivar, J., Ingram, L.O., 1999. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 203–10.
- Zautsen, R.R.M., Maugeri-Filho, F., Vaz-Rossell, C.E., Straathof, A.J.J., van der Wielen, L.A.M., de Bont, J.A.M., 2009. Liquid-liquid extraction of fermentation inhibiting compounds in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 1354–1360. <https://doi.org/10.1002/bit.22189>
- Zeferino, I.A.M., 2013. Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*. Universidade de São Paulo.
- Zeitsch, K.J., 2000. The chemistry and technology of furfural and its many by-products. Elsevier.
- Zha, Y., Punt, P.J., 2013. Exometabolomics approaches in studying the application of lignocellulosic biomass as fermentation feedstock. *Metabolites* 3, 119–143. <https://doi.org/10.3390/metabo3010119>
- Zhang, L., Yan, L., Wang, Z., Laskar, D.D., Swita, M.S., Cort, J.R., Yang, B., 2015. Characterization of lignin derived from water-only and dilute acid flowthrough pretreatment of poplar wood at elevated temperatures. *Biotechnol. Biofuels* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0377-x>
- Zhang, Y., Xia, C., Lu, M., Tu, M., 2018. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnol. Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1182-0>
- Zhao, J., Xiuwen, W., Hu, J., Liu, Q., Shen, D., Xiao, R., 2014. Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and Py-GC/MS. *Polym. Degrad. Stab.* 108, 133–138. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2014.06.006>
- Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S., 2011. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresour. Technol.* 102, 1663–1668. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.09.083>
- Zhuang, J., Wang, X., Xu, J., Wang, Z., Qin, M., 2017. Formation and deposition of pseudo-lignin on liquid-hot-water-treated wood during cooling process. *Wood Sci. Technol.* 51, 165–174. <https://doi.org/10.1007/s00226-016-0872-7>

## ANEXOS

### ANEXO A

#### A1. Determinação de rendimento mássico, solubilização dos macrocomponentes e severidade

Após o processo de pré-tratamento é possível calcular o rendimento da etapa de pré-tratamento avaliando assim as perdas de massa (solubilização/degradação da biomassa). O rendimento mássico de pré-tratamento foi calculado de acordo com a Equação A1.

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} 100 \quad (A1)$$

Onde:

$m_{inicial}$ : massa inicial do bagaço de cana-de-açúcar (g, base seca);

$m_{final}$ : massa do bagaço de cana-de-açúcar após o pré-tratamento (g, base seca);

R: Rendimento mássico do pré-tratamento.

A solubilização da celulose, hemiceluloses e lignina foi calculada de acordo com a Equação A2.

$$S = 100 \times (m_i \cdot x_i - m_i \cdot R \cdot y_f) / (m_i \cdot y_i) \quad (A2)$$

Onde:

S: Solubilização do componente (%);

$m_i$ : massa inicial do bagaço de cana-de-açúcar (g, base seca);

$y_i$ : Conteúdo do componente no bagaço *in-natura* (%);

$y_f$ : Conteúdo do componente no bagaço pré-tratado (celulignina) (%);

R: Rendimento mássico do pré-tratamento.

O fator de severidade combinado é frequentemente usado para descrever a solubilização de hemiceluloses e lignina de uma biomassa após a etapa de pré-tratamento. A Equação A3 descreve o fator de severidade.

$$\log (R_0) = \log \left[ t \cdot \exp \left( \frac{T - T_{ref}}{14.75} \right) \right] \quad (A3)$$

Onde:

t: tempo de residência em minutos;

T: temperatura de pré-tratamento em °C;

T<sub>ref</sub>: temperatura de referência (100°C);

O valor (14,75) é uma constante arbitrária  $\omega$  baseada na energia de ativação quando se assume uma cinética de pseudo primeira ordem. Esta constante tem sido avaliada e, em alguns casos, otimizada (Rabelo, et al., 2013).

O fator de severidade combinado é calculado com base no fator de severidade ( $\log R_0$ ) (Equação A3), e o pH medido depois do pré-tratamento, através da Equação A4.

$$\log (R_0') = \log R_0 - pH \quad (A4)$$

Onde:

Log  $R_0$ : fator severidade;

pH: pH do hidrolisado hemicelulósico medido após pré-tratamento.

## ANEXO B

### B1. Descritivo da metodologia de caracterização físico-química

O bagaço de cana *in-natura* e a fração obtida após a etapa de pré-tratamento foram caracterizadas quanto ao teor de celulose, hemiceluloses, lignina e cinzas, para a fração sólida, e açúcares monoméricos e oligoméricos, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos, para a fração líquida. Estas análises são de fundamental importância para que seja possível avaliar a fração solubilizada de cada componente e a fração recuperada deles no hidrolisado de pré-tratamento.

#### B1.1. Moagem

Para a análise da composição química do bagaço *in-natura* e do bagaço pré-tratado, certa quantidade de cada biomassa foi moída em um moinho de impacto e cisalhamento (modelos Pulverisette 14, marca Fritsch) obtendo amostras com granulometria de 0,12 mm.

#### B1.2. Extrativos

Para a determinação do teor de extrativos, realizado somente para o material “*in-natura*”, cerca de 10 g de material com granulometria 0,5 mm foram extraídos a 75°C com emprego de extrator tipo soxhlet e manta de aquecimento. A primeira etapa de extração foi realizada pelo período de 8 horas, sendo utilizados 400 mL da mistura ciclohexano/etanol (1:1, v/v).

Após remoção dos extrativos solúveis em solvente orgânico, foi realizada uma segunda etapa de extração com 400 mL de água destilada por 8 horas para cada repetição (3 vezes).

O teor de extrativos foi calculado com base na diferença de massa do material seco antes e depois do processo de extração (Equação B1).

$$\%_{\text{Extrativos}} = \left( 1 - \frac{m_{\text{AmostraApósExtração}}}{m_{\text{AmostraSeca}}} \right) \times 100 \quad (\text{B1})$$

Onde:

$m_{\text{AmostraSeca}}$  : é a massa inicial de amostra seca (g);

$m_{\text{AmostraApósExtração}}$  : é a massa final de amostra após a extração (g);

$\%_{\text{Extrativos}}$  : é o teor de extrativos presentes no material.

### **B1.3. Hidrólise com ácido sulfúrico 72% (m/m) e 4% (m/m)**

Amostras de aproximadamente 0,300 g do material seco moído foram pesadas em tubos de hidrólise. Em cada tubo foi adicionado 3 mL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m). As amostras foram encubadas em banho-maria a 30°C durante 1 hora sob agitação constante utilizando uma bagueta de teflon. Após o tempo de reação, foi adicionado pelo dosador automático (Mettler) 84,3 mL de água destilada, sendo a reação diluída para 4% (m/m) de ácido. O material foi levado para autoclave a 121°C por 1 h. Ao finalizar do ciclo, o material foi resfriado e filtrado em bomba a vácuo utilizando um kitassato e um cadinho de vidro previamente pesado. Após filtração, o hidrolisado foi reservado e armazenado para posterior determinação da lignina solúvel (UV-Vis) e quantificação dos açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos furânicos (HPLC). O material sólido remanescente no tubo foi lavado, retirando das paredes do tubo qualquer partícula que tenha ficado retida, recolhendo o material no cadinho de vidro para posterior quantificação de lignina insolúvel (análise gravimétrica).

### **B1.4. Lignina Solúvel**

Os hidrolisados obtidos após a etapa de hidrólise ácida foram diluídos e o pH do meio foi corrigido com uma solução de NaOH 6,5 mol/L até pH 12.

O teor de lignina solúvel foi determinado através da medida de absorbância do filtrado obtido no comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Evolution 300, marca Thermo Scientific). A concentração de lignina solúvel na amostra foi calculada segundo a Equação B2.

$$C_{Lig} = 4,187 \times 10^{-2} (A_T - A_{PD}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad B2$$

Onde:

$C_{Lig}$ : a concentração de lignina solúvel (g/L);

$A_T$ : a absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm;

$A_{pd} = \epsilon_1 \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot C_2$  é a absorbância em 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural de HMF), cujas concentrações  $C_1$  e  $C_2$  foram determinadas previamente por HPLC e  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  são as absorvidades, que valem respectivamente 146,85 e 114,00 L/(g.cm).

Assim, a porcentagem de lignina solúvel presente no material pré-tratado foi calculada em relação à massa inicial de amostra seca moída, conforme apresentado na Equação B3.

$$Lignina\ Solúvel\ (\%) = \frac{(C_{lig\ S} \times V_{Filtrado} \times FD)}{M_{Amostra\ seca}} \times 100 \quad B3$$

Onde:

Lignina Solúvel (%): porcentagem de lignina solúvel presente no material.

$M_{Amostra\ Seca}$ : massa inicial de amostra seca (g) (para amostras *in-natura* utiliza-se a massa seca após etapa de extrativos);

$C_{lig\ S}$ : a concentração de lignina solúvel (g/L);

$V_{Filtrado}$ : volume do filtrado (L);

FD: fator de diluição para leitura de absorbância;

### B1.5. Lignina insolúvel

Os cadinhos de porcelana contendo o resíduo insolúvel (lignina + cinzas) foram secos em estufa a 106°C por 24 h. Após secagem, os cadinhos foram mantidos em um dessecador até temperatura ambiente e, em seguida, foram pesados. Após secagem, os materiais foram calcinados em uma mufla seguindo a rampa de aquecimento: inicialmente a temperatura foi elevada a 105°C, por 12 min.; dado o tempo, elevou-se a temperatura novamente para 250°C, por 30 min., e finalmente alterou-se para 575°C, por 180 min.

Ao final da calcinação, a mufla foi desligada e os cadinhos retirados após atingir a temperatura ambiente. Os cadinhos foram levados à estufa a 106°C por 3 horas, e posteriormente transferidos para um dessecador fazendo a pesagem após atingir a temperatura ambiente. O percentual da lignina insolúvel foi determinado pela diferença entre o resíduo sólido e a massa de cinzas, conforme apresentado na Equação B4.

$$Lignina\ Insolúvel\ (\%) = \frac{(M_{R2} - M_{R1}) - (M_{C2} - M_{C1})}{M_{Amostra\ seca}} \times 100 \quad B4$$



Onde:

Lignina insolúvel: percentual de lignina insolúvel no material;

$M_{R2}$ : massa do cadinho com resíduo insolúvel;

$M_{R1}$ : massa do cadinho de vidro;

$M_{C2}$ : massa do cadinho com cinzas;

$M_{C1}$ : massa do cadinho de vidro;

$M_{\text{Amostra Seca}}$ : massa inicial de amostra seca (g) (para amostras *in-natura* utiliza-se a massa seca após etapa de extrativos);

### B1.6. Cinzas

Pesou aproximadamente 0,500 g do bagaço pré-tratado ou *in-natura* em cadinho de porcelana, previamente seco e pesado, onde posteriormente foi aferida a porcentagem de umidade em balança infravermelha (Sartorius MA35). O cadinho foi tampado parcialmente e calcinados em forno tipo mufla (Fornitec) seguindo a rampa de aquecimento: inicialmente a temperatura foi elevada a 105°C, por 12 min.; dado o tempo, elevou-se a temperatura novamente para 250°C, por 30 min., e finalmente alterou-se para 575°C, por 180 min.

Ao final da calcinação, a mufla foi desligada e os cadinhos retirados após atingir a temperatura ambiente. Os cadinhos foram levados à estufa (Fanem A) a 106°C por 3 horas, e posteriormente transferidos para um dessecador fazendo a pesagem após atingir a temperatura ambiente. O percentual de cinzas totais é apresentado na Equação B5.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{M_{C2} - M_{C1}}{M_{\text{Amostra seca}}} \times 100 \quad \text{B5}$$

Onde:

Cinzas (%): percentual de cinzas totais

$M_{C2}$ : massa do cadinho com cinzas (g)

$M_{C1}$ : massa do cadinho (g);

$M_{\text{Amostra seca}}$ : massa da amostra (massa seca) (g)

### B1.7. Análise de açúcares, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural

Para a quantificação de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e HMF, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent,

modelo 1260 Infinity) com detector de índice de refração, empregando-se a coluna de guarda Cation PC H Refill Cartridges (Bio-rad) e a coluna Aminex HPX 87 H – 300 mmx 1,0 um 7.8mmx 9um (BioRad). A fase móvel utilizada foi de ácido sulfúrico 5Mm a uma taxa de mL/min empregando-se o forno a 30°C.

Para análise dos aldeídos furânicos (furfural e HMF) foi utilizado a coluna Acclaim 120 C18 – Fase reversa: 3 µm 120 Angstrom 4.6X150 mm (ThermoScientific) com fase móvel utilizada foi acetonitrila/ água na proporção 1:8 com 1% de ácido acético, utilizando-se um detector de UV-vis (274 nm) a 25°C. A amostra foi filtrada em uma membrana 0,45mm antes do procedimento analítico;

Os teores de celulose, hemiceluloses e lignina foram calculados conforme equações B6 a B8.

$$Celulose (\%) = \left[ \frac{((0,90 \times C_{Gli}) + (0,95 \times C_{Celo}) + (1,29 \times C_{HMF}) + (3,53 \times C_{\acute{A}c. F\acute{o}rm})) * V(L)}{M_{Amostra\ seca}} \right] \times 100 \quad B6$$

$$Hemiceluloses (\%) = \left[ \frac{((0,88 \times C_{Xil}) + (0,88 \times C_{Arab}) + (0,72 \times C_{\acute{A}c. Ac\acute{e}t}) + (0,91 \times C_{\acute{A}c. Glic}) + (1,37 \times C_{FUR})) * V(L)}{M_{Amostra\ seca}} \right] \times 100 \quad B7$$

$$Lignina\ total (\%) = \left[ \frac{(Lignina\ sol\acute{u}vel + Lignina\ insol\acute{u}vel)}{M_{Amostra\ seca}} \right] \times 100 \quad B8$$

Onde:

*Celulose (%)* é o teor de celulose da biomassa, expresso em %.

$C_{Gli}$  é a concentração de glicose, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{Celo}$  é a concentração de celobiose, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{HMF}$  é a concentração de HMF, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{Ác.Fórm}$  é a concentração de ácido fórmico, expressa em grama por litro (g/L);

*Hemiceluloses (%)* é o teor de hemiceluloses da biomassa, expresso em %.

$C_{Xil}$  é a concentração de xilose, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{Arab}$  é a concentração de arabinose, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{Ác.Acét}$  é a concentração de ácido acético, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{Ác.Glic}$  é a concentração de ácido glicurônico, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{FUR}$  é a concentração de furfural, expressa em grama por litro (g/L);

$V(L)$ : volume final da filtração (0,084 L);

$M_{Amostra\ Seca}$ : massa inicial de amostra seca (g) (para amostras *in-natura* utiliza-se a massa seca após etapa de extrativos);

Lignina total (%): percentual de lignina solúvel e insolúvel na amostra;

Lignina solúvel (%): teor de lignina solúvel presente no material.

Lignina insolúvel (%): teor de lignina insolúvel presente no material.

**Obs:** Os fatores de conversão são calculados baseando-se na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise ácida.

## **B2. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico**

### **B2.1. Análise de açúcares, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural no hidrolisado**

Para as análises dos constituintes da fase aquosa dos processos de ELL e das amostras de fermentação, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent, modelo 1260 Infinity). Para a quantificação foi utilizado a coluna Aminex HPX 87 H – 300x7.8 mm e detector de índice de refração (IR).

Para análise dos aldeídos furânicos (furfural e HMF) foi utilizado a coluna Acclaim 120 C18 – Fase reversa: 3 µm 120 Angstrom 4.6X150 mm (ThermoScientific) e detector de UV.

Para a quantificação dos compostos fenólicos, foi utilizada a norma TAPPI T13m-54 com adaptações.

Uma alíquota de 20 µL do hidrolisado hemicelulósico, antes e após a etapa de destoxificação, foi pipetada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL, que foi completado e aferido com água destilada. A absorvância foi determinada para os comprimentos de onda de 215 nm e 280 nm utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis), empregando água destilada como referência.

A concentração de compostos fenólicos foi determinada através da Equação B9, descrita por (Zanuncio e Colodette, 2011):

$$C = FD \times \frac{(4,53 \times (A_{215\text{nm}} - A_{280\text{nm}}))}{300} \quad \text{B9}$$

Onde:

C: concentração de lignina solúvel (g/L),

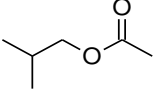
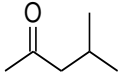
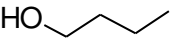

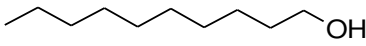
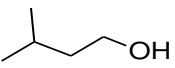
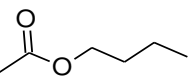
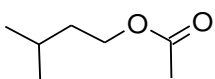
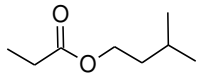
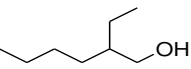
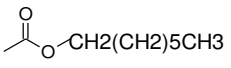
FD: fator de diluição,

$A_{215\text{nm}}$ : absorvância em 215 nm

$A_{280\text{nm}}$ : absorvância em 280 nm

## ANEXO C

**Tabela C1.** Estruturas químicas e pontos de ebulição dos solventes empregados no processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar.

Solvente	Estrutura	Ponto de Ebulição (°C)
Acetato isobutila		118,0
MIBK		116,0
Butanol		117,7
MTBE		55,2
DIBK		
1-Decanol		230,0
Alcool isoamilico		131,0
Acetato butila		126,0
Acetato isoamila		137,0
Propionato de isoamila		160,0
2-Etilhexanol		184,7
Acetato heptila		192,0
Biodiesel de óleo de mamona		-
Biodiesel de óleo de coco		-

## ANEXO D

**Tabela D1.** Média das eficiências de extrações dos carboidratos, produtos de degradação, ácidos orgânicos e fenólicos da etapa de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico.

Compostos (%)	Butanol	Álcool isoam.	2etilhexanol	1-Decanol	Acet.butila	Acet. isobutila	Acet.isoamila
Ac. acético	95,9 ± 4,1	76,4 ± 1,4	61,5 ± 2,2	46,9 ± 0,0	nd	nd	5,6 ± 1,4
Ac. fórmico	73,3 ± 0,6	33,1 ± 1,3	0,1 ± 2,3	0,7 ± 1,7	14,1 ± 1,5	10,4 ± 2,0	37,9 ± 3,6
Ac. levulínico	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	56,9 ± 3,5	66,7 ± 22,2	94,2 ± 5,8	90,2 ± 3,9	29,0 ± 10,6
Arabinose	9,9 ± 0,3	0,2 ± 0,0	2,5 ± 0,3	0,1 ± 0,5	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3
Celobiose	0,3 ± 1,9	9,1 ± 1,2	2,3 ± 1,7	10,3 ± 1,1	4,7 ± 3,9	29,2 ± 1,7	0,8 ± 2,5
Glicose	4,7 ± 0,5	1,5 ± 0,1	1,4 ± 1,1	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,4	0,0 ± 0,6
Xilose	9,9 ± 1,4	3,4 ± 0,4	0,0 ± 1,8	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1	3,1 ± 0,9
HMF	90,1 ± 0,4	83,4 ± 0,5	51,1 ± 0,7	44,8 ± 0,4	58,9 ± 0,2	56,6 ± 1,7	50,5 ± 1,7
Furfural	97,6 ± 0,0	39,3 ± 1,3	90,2 ± 2,0	29,4 ± 1,4	41,6 ± 0,0	45,7 ± 0,2	86,5 ± 1,5
Fenólicos	83,2 ± 0,8	72,0 ± 0,3	47,3 ± 0,3	44,4 ± 0,1	44,0 ± 0,4	47,1 ± 0,8	70,3 ± 0,8

Compostos (%)	Prop. isoamila	Acet. heptila	MIBK	DIBK	BD coco	BD mamona	MTBE
Ac. acético	30,3 ± 1,0	nd	34,9 ± 0,2	24,5 ± 0,6	16,6 ± 1,5	14,3 ± 2,0	67,8 ± 0,1
Ac. fórmico	14,5 ± 0,3	18,0 ± 2,3	18,6 ± 1,0	4,6 ± 0,1	16,4 ± 0,6	11,3 ± 0,7	22,4 ± 0,1
Ac. levulínico	30,2 ± 10,0	9,4 ± 1,7	100,0 ± 0,0	0,0 ± 10,1	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1	26,6 ± 9,2
Arabinose	1,8 ± 0,3	3,0 ± 2,6	0,2 ± 0,01	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,5	2,0 ± 0,8	0,0 ± 0,3
Celobiose	4,0 ± 0,3	1,9 ± 2,4	6,2 ± 0,7	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,1	0,0 ± 0,1
Glicose	2,1 ± 0,1	3,2 ± 2,7	0 ± 0,1	0,3 ± 0,3	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,0 ± 0,1
Xilose	0,7 ± 0,4	4,7 ± 2,6	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,4	2,7 ± 0,8	4,5 ± 0,9	0,4 ± 0,3
HMF	32,3 ± 4,0	38,6 ± 1,9	76,5 ± 0,5	39,3 ± 0,4	16,6 ± 0,1	13,4 ± 0,1	48,8 ± 0,0
Furfural	94,0 ± 2,0	76,8 ± 1,6	42,2 ± 0,4	69,5 ± 0,0	53,7 ± 0,1	43,7 ± 5,0	58,9 ± 0,0
Fenólicos	33,9 ± 1,5	23,4 ± 4,4	34,6 ± 4,5	20,3 ± 4,8	9,0 ± 2,0	13,1 ± 3,7	37,4 ± 11,9

Devido a hidrólise com a formação do álcool e ácido correspondentes. Os valores de ácido acético não foram considerados para a determinação das eficiências de extração para os solventes acetato de butila, isobutila e heptila.

**Tabela D2.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com MIBK.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,95	5,15	0,62	3,50	0,33	1,23
Ac. fórmico	0,21	1,14	0,17	0,97	0,04	0,15
Ac. levulínico	0,02	0,09	0,00	0,00	0,02	0,06
Arabinose	2,59	13,94	2,58	14,53	0,00	0,00
Celobiose	0,21	1,15	0,20	1,13	0,01	0,05
Glicose	3,51	18,90	3,51	19,77	0,00	0,00
Xilose	36,64	197,55	36,01	202,75	0,64	2,36
HMF	0,10	0,55	0,02	0,13	0,08	0,29
Furfural	0,012	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02
Fenólicos	2,94	15,84	1,92	10,82	1,02	3,76
Massa (g)	211,70		202,20		217,87	
Volume (L)	0,19		0,18		0,27	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,80	

**Tabela D3.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com MTBE.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. Acético	1,09	5,87	0,35	1,91	0,74	2,62
Ac. Fórmico	0,17	0,93	0,13	0,73	0,04	0,14
Ac. Levulinico	0,03	0,14	0,02	0,11	-	-
Arabinose	3,04	16,33	3,07	16,62	-	-
Celobiose	0,37	2,00	0,39	2,11	-	-
Glicose	3,62	19,48	3,68	19,92	-	-
Xilose	35,90	192,96	35,76	193,87	0,14	0,49
HMF	0,10	0,52	0,05	0,27	0,05	0,17
Furfural	0,02	0,10	0,01	0,04	0,01	0,04
Fenólicos	2,67	14,37	1,67	9,07	1,00	3,54
Massa (g)	212,35		209,60		208,35	
Volume (L)	0,19		0,18		0,28	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,74	



**Tabela D4.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com butanol.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,98	5,22	0,04	0,27	0,94	3,14
Ac. fórmico	0,28	1,52	0,08	0,52	0,21	0,70
Ac. levulinico	0,01	0,08	-	-	0,01	0,05
Arabinose	2,67	14,24	2,40	16,49	0,27	0,89
Celobiose	0,19	1,01	0,19	1,30	-	-
Glicose	3,62	19,30	3,45	23,65	0,17	0,57
Xilose	37,03	197,50	33,38	228,96	3,65	12,20
HMF	0,11	0,57	0,01	0,07	0,10	0,32
Furfural	0,01	0,06	-	-	0,01	0,04
Fenólicos	3,02	16,08	0,51	3,47	2,51	8,39
Massa (g)	214,00		167,20		253,30	
Volume (L)	0,19		0,15		0,30	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,15		0,85	

**Tabela D5.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com acetato de isobutila.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,96	5,15	1,26	6,90	-	-
Ac. fórmico	0,21	1,14	0,19	1,04	0,02	0,09
Ac. levulinico	0,02	0,09	-	-	0,02	0,06
Arabinose	2,59	13,94	2,58	14,10	-	-
Celobiose	0,21	1,15	0,15	0,83	0,06	0,25
Glicose	3,51	18,90	3,53	19,35	-	-
Xilose	36,66	197,55	36,15	197,59	0,52	2,09
HMF	0,10	0,55	0,04	0,24	0,06	0,23
Furfural	0,01	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02
Fenólicos	2,94	15,84	1,56	8,50	1,39	5,63
Massa (g)	211,80		207,70		212,81	
Volume (L)	0,19		0,18		0,25	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,86	

**Tabela D6.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com acetato de isoamila.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,97	5,22	0,92	5,11	-	-
Ac. fórmico	0,28	1,52	0,18	0,98	0,11	0,40
Ac. levulinico	0,01	0,08	0,01	0,06	-	-
Arabinose	2,66	14,24	2,65	14,75	-	-
Celobiose	0,19	1,01	0,19	1,06	-	-
Glicose	3,60	19,30	3,67	20,43	-	-
Xilose	36,84	197,50	35,71	198,64	1,14	4,21
HMF	0,11	0,57	0,05	0,29	0,05	0,20
Furfural	0,01	0,06	-	-	0,01	0,04
Fenólicos	3,00	16,08	0,89	4,96	2,11	7,82
Massa (g)	212,90		205,15		234,90	
Volume (L)	0,19		0,18		0,27	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,87	

**Tabela D7.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com propionato de isoamila.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	1,02	5,51	0,71	3,95	0,31	1,24
Ac. fórmico	0,21	1,15	0,18	1,01	0,03	0,12
Ac. levulinico	0,02	0,11	0,01	0,08	0,01	0,03
Arabinose	2,69	14,52	2,65	14,68	0,05	0,19
Celobiose	0,67	3,59	0,64	3,54	0,03	0,11
Glicose	3,75	20,21	3,67	20,35	0,08	0,32
Xilose	35,94	193,79	35,68	197,98	0,26	1,04
HMF	0,10	0,54	0,07	0,38	0,03	0,13
Furfural	0,01	0,05	-	-	0,01	0,03
Fenólicos	2,89	15,61	1,91	10,61	0,98	3,95
Massa (g)	211,65		205,60		215,28	
Volume (L)	0,19		0,18		0,25	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,87	

**Tabela D8.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com DIBK.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	1,09	5,87	0,82	4,53	0,27	1,00
Ac. fórmico	0,17	0,93	0,16	0,91	0,01	0,03
Ac. levulinico	0,03	0,14	0,03	0,18	-	-
Arabinose	3,03	16,33	2,99	16,51	0,03	0,13
Celobiose	0,37	2,00	0,37	2,03	-	-
Glicose	3,61	19,48	3,60	19,86	0,01	0,04
Xilose	35,77	192,96	35,22	194,26	0,56	2,09
HMF	0,10	0,52	0,06	0,32	0,04	0,14
Furfural	0,02	0,10	0,01	0,03	0,01	0,05
Fenólicos	2,66	14,37	2,12	11,71	0,54	2,03
Massa (g)	211,60		206,90		215,50	
Volume (L)	0,19		0,18		0,27	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,81	

**Tabela D9.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com acetato de heptila.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	1,09	5,87	1,52	8,54	-	-
Ac. fórmico	0,17	0,93	0,14	0,80	0,03	0,13
Ac. levulinico	0,03	0,14	0,02	0,14	-	-
Arabinose	3,04	16,33	2,94	16,56	0,09	0,37
Celobiose	0,37	2,00	0,36	2,05	0,01	0,03
Glicose	3,62	19,48	3,50	19,71	0,12	0,47
Xilose	35,87	192,96	34,20	192,34	1,67	6,78
HMF	0,10	0,52	0,06	0,33	0,04	0,15
Furfural	0,02	0,10	-	-	0,01	0,06
Fenólicos	2,67	14,37	2,05	11,51	0,62	2,53
Massa (g)	212,15		202,95		214,15	
Volume (L)	0,19		0,18		0,25	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,87	

**Tabela D10.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com acetato de butila.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,95	5,15	1,45	8,10	-	-
Ac. fórmico	0,21	1,14	0,18	1,01	0,03	0,13
Ac. levulinico	0,02	0,09	-	-	0,02	0,07
Arabinose	2,59	13,94	2,58	14,40	-	-
Celobiose	0,21	1,15	0,20	1,13	0,01	0,04
Glicose	3,50	18,90	3,54	19,76	-	-
Xilose	36,64	197,55	35,89	200,41	0,74	3,01
HMF	0,10	0,55	0,04	0,23	0,06	0,24
Furfural	0,01	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02
Fenólicos	2,94	15,84	1,65	9,19	1,29	5,26
Massa (g)	211,65		204,20		216,54	
Volume (L)	0,19		0,18		0,25	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,88	

**Tabela D11.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com 1-decanol.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,95	5,15	0,51	2,92	0,45	1,68
Ac. fórmico	0,21	1,14	0,21	1,23	0,00	0,0
Ac. levulinico	0,02	0,09	0,01	0,03	0,01	0,04
Arabinose	2,58	13,94	2,58	14,92	0,00	0,00
Celobiose	0,21	1,15	0,19	1,10	0,02	0,08
Glicose	3,49	18,90	3,49	20,19	0,00	0,00
Xilose	36,53	197,55	35,85	207,36	0,68	2,56
HMF	0,10	0,55	0,06	0,32	0,05	0,17
Furfural	0,012	0,07	0,01	0,05	0,00	0,01
Fenólicos	2,93	15,84	1,63	9,42	1,30	4,89
Massa (g)	211,05		197,75		221,96	
Volume (L)	0,18		0,17		0,27	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,83	

**Tabela D12.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com 2-etil hexanol.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	1,03	5,52	0,40	2,22	0,63	2,43
Ac. fórmico	0,21	1,15	0,21	1,20	-	
Ac. levulinico	0,02	0,11	0,01	0,05	0,01	0,05
Arabinose	2,71	14,54	2,64	14,80	0,07	0,26
Celobiose	0,67	3,59	0,65	3,66	0,02	0,06
Glicose	3,77	20,24	3,72	20,82	0,05	0,21
Xilose	36,15	194,02	36,48	204,31	-	
HMF	0,10	0,54	0,05	0,28	0,05	0,20
Furfural	0,01	0,05	-		0,01	0,03
Fenólicos	2,91	15,63	1,54	8,60	1,38	5,30
Massa (g)	212,65		204,05		217,01	
Volume (L)	0,19		0,18		0,26	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,84	

**Tabela D13.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com biodiesel de óleo de mamona.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,62	5,87	0,53	5,14	0,09	0,63
Ac. fórmico	0,10	0,93	0,09	0,84	0,01	0,08
Ac. levulinico	0,02	0,14	0,02	0,19	-	
Arabinose	1,73	16,33	1,70	16,34	0,04	0,25
Celobiose	0,21	2,00	0,21	2,01	-	
Glicose	2,06	19,48	2,03	19,53	0,04	0,27
Xilose	20,46	192,96	19,55	188,31	-	
HMF	0,06	0,52	0,05	0,46	0,01	0,05
Furfural	0,01	0,10	0,01	0,06	-	
Fenólicos	1,52	14,37	1,32	12,75	0,20	1,40
Massa (g)	121,00		118,40		123,14	
Volume (L)	0,11		0,10		0,14	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,86	

**Tabela D14.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com biodiesel de óleo de coco.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,62	5,87	0,52	4,95	0,10	0,74
Ac. fórmico	0,10	0,93	0,08	0,79	0,02	0,12
Ac. levulinico	0,02	0,14	0,02	0,19	-	
Arabinose	1,73	16,33	1,71	16,29	0,02	0,16
Celobiose	0,21	2,00	0,21	2,00	-	
Glicose	2,06	19,48	2,03	19,44	0,03	0,19
Xilose	20,42	192,96	19,86	189,80	-	
HMF	0,06	0,52	0,05	0,44	0,01	0,07
Furfural	0,01	0,10		-	0,01	0,04
Fenólicos	1,52	14,37	1,38	13,22	0,14	0,98
Massa (g)	120,80		119,10		121,33	
Volume (L)	0,11		0,10		0,14	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,86	

**Tabela D15.** Balanço de massa do processo de extração líquido-líquido do hidrolisado hemicelulósico com álcool isoamílico.

Compostos	Entrada		Fase aquosa		Fase orgânica	
	g	g/L	g	g/L	g	g/L
Ac. acético	0,95	5,15	0,23	1,40	0,73	2,58
Ac. fórmico	0,21	1,14	0,14	0,88	0,07	0,25
Ac. levulinico	0,02	0,09		-	0,02	0,06
Arabinose	2,59	13,94	2,58	16,01	0,03	0,12
Celobiose	0,21	1,15	0,19	1,20	0,02	0,07
Glicose	3,50	18,90	3,45	21,43	0,05	0,18
Xilose	36,64	197,55	35,39	219,60	1,24	4,39
HMF	0,10	0,55	0,02	0,10	0,08	0,30
Furfural	0,01	0,07	0,01	0,05		-
Fenólicos	2,94	15,84	0,82	5,10	2,12	7,48
Massa (g)	211,65		184,50		234,56	
Volume (L)	0,19		0,16		0,28	
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,14		1,14		0,83	

## ANEXO E

A Tabela E.1 mostra a composição do meio para a realização do pré-inóculo da propagação.

**Tabela E.1** - Volumes e concentrações das soluções para a composição do pré-inóculo utilizado para propagação.

Nutriente	Quantidade	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Extrato de levedura	1 g	10
Peptona	2 g	20
Água	96 mL	-
Xilose (500 g.L <sup>-1</sup> )	4 mL	20

As composições dos meios para os inóculos de *S. passalidarum* e *S. stipitis* encontram-se nas Tabelas E.2 e E.3, respectivamente.

**Tabela E.2** - Volumes e concentrações das soluções para a composição do inóculo utilizado para propagação de *S. passalidarum* (Adaptado de HOU, 2011).

Nutriente	Quantidade	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Extrato de levedura	0,05 g	5,0
Peptona	0,05 g	5,0
Ureia (100 g.L <sup>-1</sup> )	5,75 mL	2,3
Água	193,42 mL	-
Xilose (500 g.L <sup>-1</sup> )	6 mL	12
Glicose (500 g.L <sup>-1</sup> )	0,66 mL	1,32
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (30 g.L <sup>-1</sup> )	8,33 mL	2,0
NH <sub>4</sub> Cl (30 g.L <sup>-1</sup> )	16,66 mL	2,0
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O (30 g.L <sup>-1</sup> )	2,5 mL	0,3
Pré-inóculo	25 mL	-

**Tabela E.3** - Volumes e concentrações das soluções para a composição do inóculo utilizado para propagação de *S. stipitis* (Adaptado de HOU, 2011).

Nutriente	Quantidade	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Extrato de levedura	0,75g	3,0
Xilose (500g/L)	6 mL	12
Glicose	0,66 mL	1,32
Uréia (100 g/L)	5,75 mL	2,3
Água	204,26 mL	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (30 g l <sup>-1</sup> )	8,33 mL	1
Pré-inóculo	25 mL	-

A Tabela E.4 apresenta a composição do meio de crescimento das leveduras para o biorreator de 3L.

**Tabela E.4** - Volumes e concentrações das soluções para a composição do meio de crescimento utilizado para propagação no biorreator (SILVA *et al.*, 2012).

<b>Nutriente</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Concentração (g l<sup>-1</sup>)</b>
Xarope (284,76 g.L <sup>-1</sup> )	126,42	30
Água	813,58	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (30 g.L <sup>-1</sup> )	80	2,0
Ureia (100 g.L <sup>-1</sup> )	60	5,0
Inóculo	120	-



**Tabela E.5** - Volumes (mL) das soluções para a composição do meio com xilose comercial utilizando a levedura *S. passalidarum* (baseado em SILVA *et al.*, 2012).

EXPERIMENTOS	MgSO <sub>4</sub> (30 g.L <sup>-1</sup> )	Ureia (100 g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g)	Xilose (500 g.L <sup>-1</sup> )	Inóculo (126,4 g.L <sup>-1</sup> )	Água (mL)	Solvente (mL)	Concentração solvente (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Concentração Utilizada</b>	1 g.L <sup>-1</sup>	1 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>	50 g.L <sup>-1</sup>	5 g.L <sup>-1</sup>	-	-	-
<b>Xilose padrão</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	81,41	-	-
<b>Xilose + 1-Decanol</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	43,69	38,02	0,4
<b>Xilose + Álcool Isoamílico</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	62,85	18,86	12
<b>Xilose + MIBK</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	80,41	1,3	15
<b>Xilose + Acet. de butila</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	65,93	15,78	3,5
<b>Xilose + Acet. de isobutila</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	59,90	21,81	3,5
<b>Xilose + Acet. de isoamila</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	56,49	25,22	1,5
<b>Xilose + Butanol</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	66,27	15,44	45
<b>Xilose + Prop. de isoamila</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	42,58	39,13	0,5
<b>Xilose + 2-Etilhexanol</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	45,52	36,19	0,5
<b>Xilose + Biodiesel mamona</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	59,53	22,18	1
<b>Xilose + Biodiesel coco</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	58,65	23,06	1
<b>Xilose + DIBK</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	48,45	32,63	0,5
<b>Xilose + Acet. de Heptila</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	36,37	45,34	0,5
<b>Xilose + MTBE</b>	3,33	1	0,3	10	3,96	64,53	17,18	24

**Tabela E.6** - Volumes (mL) das soluções para a composição do meio com hidrolisado hemicelulósico (HH), destoxificado ou não, utilizando a levedura *S. passalidarum* (baseado em SILVA *et al.*, 2012).

EXPERIMENTOS	MgSO <sub>4</sub> (30 g.L <sup>-1</sup> )	Ureia (100 g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g)	Inóculo (126,4 g.L <sup>-1</sup> )	Água (mL)	HH (mL)	ART do HH (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Concentração Utilizada</b>	1 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>	5 g.L <sup>-1</sup>	-	50 g.L <sup>-1</sup>	-
<b>HH</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,13	21,58	231,67
<b>HH (1-Decanol)</b>	3,33	1	0,3	3,96	71,20	20,51	243,73
<b>HH (Álcool isoamílico)</b>	3,33	1	0,3	3,96	72,34	19,37	258,05
<b>HH (MIBK)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,77	20,94	238,71
<b>HH (Acet. de butila)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,54	21,17	236,10
<b>HH (Acet. de isobutila)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,18	21,53	232,17
<b>HH (Acet. de isoamila)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,65	21,06	237,37
<b>HH (Butanol)</b>	3,33	1	0,3	3,96	73,38	18,33	272,81
<b>HH (Prop. de isoamila)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,58	21,13	236,56
<b>HH (2-Etilhexanol)</b>	3,33	1	0,3	3,96	71,19	20,52	243,57
<b>HH (Biodiesel -mamona)</b>	3,33	1	0,3	3,96	69,61	22,10	226,18
<b>HH (Biodiesel coco)</b>	3,33	1	0,3	3,96	69,74	21,97	227,52
<b>HH (DIBK)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,22	21,49	232,66
<b>HH (Acetato de Heptila)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,04	21,67	230,66
<b>HH (MTBE)</b>	3,33	1	0,3	3,96	70,21	21,50	232,53

**Tabela E.7** - Volumes (mL) das soluções para a composição do meio com xilose comercial utilizando a levedura *S. stipitis* (baseado em SILVA *et al.*, 2012).

EXPERIMENTOS	MgSO <sub>4</sub> (30 g.L <sup>-1</sup> )	Ureia (100 g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g)	Xilose (500 g.L <sup>-1</sup> )	Inóculo (87,11 g.L <sup>-1</sup> )	Água (mL)	Solvente (mL)	Concentração solvente (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Concentração Utilizada</b>	1 g.L <sup>-1</sup>	1 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>	50 g.L <sup>-1</sup>	5 g.L <sup>-1</sup>	-	-	-
<b>Xilose padrão</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	79,93	-	-
<b>Xilose + 1-Decanol</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	41,91	38,02	0,4
<b>Xilose + Álcool isoamílico</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	61,07	18,86	12
<b>Xilose + MIBK</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	78,63	1,30	15
<b>Xilose + Acet. de butila</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	64,15	15,78	3,5
<b>Xilose + Acet. de isobutila</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	58,12	21,81	3,5
<b>Xilose + Acet. de isoamila</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	54,71	25,22	1,5
<b>Xilose + Butanol</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	64,49	15,44	45
<b>Xilose + Prop. de isoamila</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	40,80	39,13	0,5
<b>Xilose + 2-Etilhexanol</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	43,74	36,19	0,5
<b>Xilose + Biodiesel mamona</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	57,75	22,18	1
<b>Xilose + Biodiesel coco</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	56,87	23,06	1
<b>Xilose + DIBK</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	47,30	32,63	0,5
<b>Xilose + Acet. de heptila</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	34,59	45,34	0,5
<b>Xilose + MTBE</b>	3,33	1	0,3	10	5,74	62,75	17,18	24

**Tabela E.8** - Volumes (mL) das soluções para a composição do meio com hidrolisado hemicelulósico (HH), destoxificado ou não, utilizando a levedura *S. stipitis* (baseado em SILVA *et al.*, 2012).

<b>EXPERIMENTOS</b>	<b>MgSO<sub>4</sub> (30 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ureia (100 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Extrato de levedura (g)</b>	<b>Inóculo (87,11 g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>HH (mL)</b>	<b>ART do HH (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Concentração Utilizada</b>	1 g.L <sup>-1</sup>	1 g.L <sup>-1</sup>	3 g.L <sup>-1</sup>	5 g.L <sup>-1</sup>	-	50 g.L <sup>-1</sup>	-
<b>HH</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,35	21,58	231,62
<b>HH (1-Decanol)</b>	3,33	1	0,3	5,74	69,42	20,51	243,73
<b>HH (Álcool Isoamílico)</b>	3,33	1	0,3	5,74	70,56	19,37	258,05
<b>HH (MIBK)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,99	20,94	238,71
<b>HH (Acet. de butila)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,76	21,17	236,10
<b>HH (Acet. de isobutila)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,4	21,53	232,17
<b>HH (Acet. de isoamila)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,87	21,06	237,37
<b>HH (Butanol)</b>	3,33	1	0,3	5,74	71,6	18,33	272,81
<b>HH (Prop. de isoamila)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,8	21,13	236,57
<b>HH (2-Etilhexanol)</b>	3,33	1	0,3	5,74	69,41	20,52	243,57
<b>HH (Biodiesel mamona)</b>	3,33	1	0,3	5,74	67,83	22,10	226,19
<b>HH (Biodiesel coco)</b>	3,33	1	0,3	5,74	67,96	21,97	227,52
<b>HH (DIBK)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,44	21,49	232,66
<b>HH (Acet. de Heptila)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,26	21,67	230,67
<b>HH (MTBE)</b>	3,33	1	0,3	5,74	68,43	21,50	232,53

## ANEXO F

**Tabela F1.** Concentrações de inibidores no ponto inicial da fermentação por *S. passalidarum* e *S. stipitis* dos hidrolisados destoxificados pelo processo de extração líquido-líquido.

Solventes	Furfural (g/ L)		HMF (g/ L)		Ácido acético (g/ L)		Ácido fórmico (g/ L)	
	<i>S. stipitis</i>	<i>S. passalidarum</i>	<i>S. stipitis</i>	<i>S. passalidarum</i>	<i>S. stipitis</i>	<i>S. passalidarum</i>	<i>S. stipitis</i>	<i>S. passalidarum</i>
Butanol	Nd	nd	0,014 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,053 ± 0,005	0,210 ± 0,005	0,101 ± 0,001	0,129 ± 0,038
Álcool isoamílico	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,292 ± 0,002	0,396 ± 0,081	0,184 ± 0,001	0,175 ± 0,082
2-Etilhexanol	Nd	nd	0,062 ± 0,002	0,055 ± 0,004	0,492 ± 0,013	1,092 ± 0,584	0,266 ± 0,007	0,352 ± 0,149
1-Decanol	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,068 ± 0,004	0,069 ± 0,002	0,622 ± 0,034	0,850 ± 0,004	0,262 ± 0,014	0,247 ± 0,004
Ac. butila	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,048 ± 0,001	1,796 ± 0,001	2,031 ± 0,141	0,224 ± 0,001	0,298 ± 0,115
Ac. isobutila	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,053 ± 0,001	1,466 ± 0,003	1,751 ± 0,011	0,221 ± 0,001	0,229 ± 0,004
Ac. isoamila	Nd	nd	0,065 ± 0,003	0,064 ± 0,001	1,139 ± 0,057	1,411 ± 0,001	0,218 ± 0,011	0,219 ± 0,008
Prop. isoamila	nd	nd	0,032 ± 0,001	0,082 ± 0,001	0,881 ± 0,005	1,045 ± 0,022	0,225 ± 0,001	0,221 ± 0,022
Ac. heptila	nd	nd	0,076 ± 0,005	0,069 ± 0,001	1,975 ± 0,134	2,106 ± 0,011	0,297 ± 0,005	0,347 ± 0,001
MIBK	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,831 ± 0,005	0,685 ± 0,034	0,230 ± 0,001	0,204 ± 0,017
DIBK	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,071 ± 0,002	0,071 ± 0,001	1,000 ± 0,031	1,049 ± 0,017	0,201 ± 0,006	0,313 ± 0,010
Biod. coco	nd	nd	0,103 ± 0,002	0,093 ± 0,002	1,160 ± 0,021	1,410 ± 0,018	0,185 ± 0,003	0,447 ± 0,005
Biod. mamona	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,100 ± 0,003	0,093 ± 0,001	1,119 ± 0,030	1,490 ± 0,021	0,183 ± 0,005	0,448 ± 0,013
MTBE	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,066 ± 0,001	0,062 ± 0,001	0,466 ± 0,006	0,629 ± 0,001	0,178 ± 0,002	0,232 ± 0,008

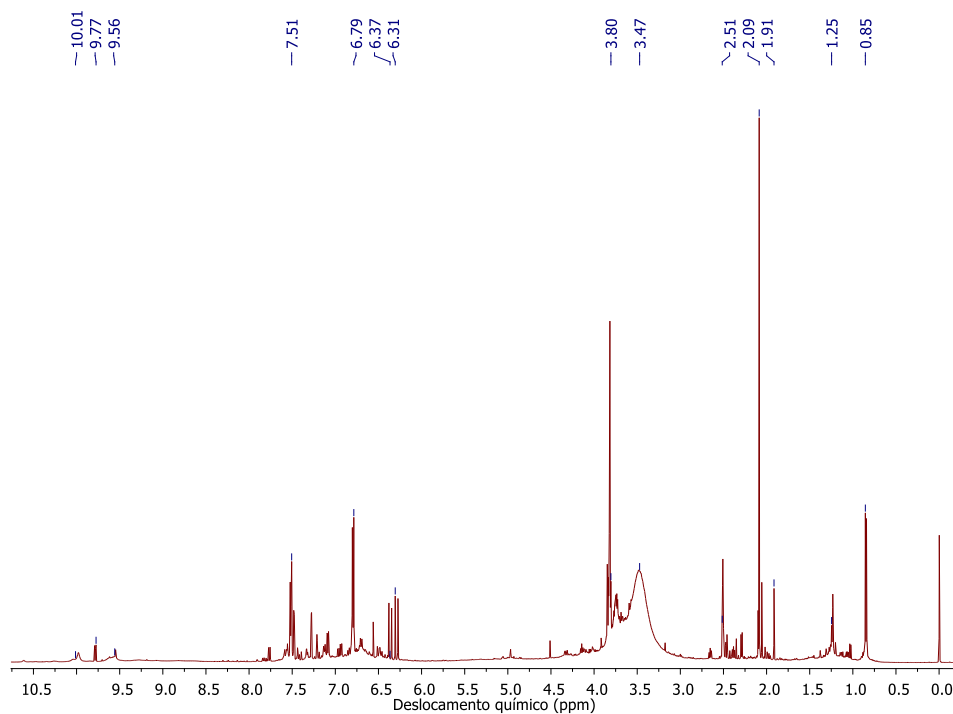
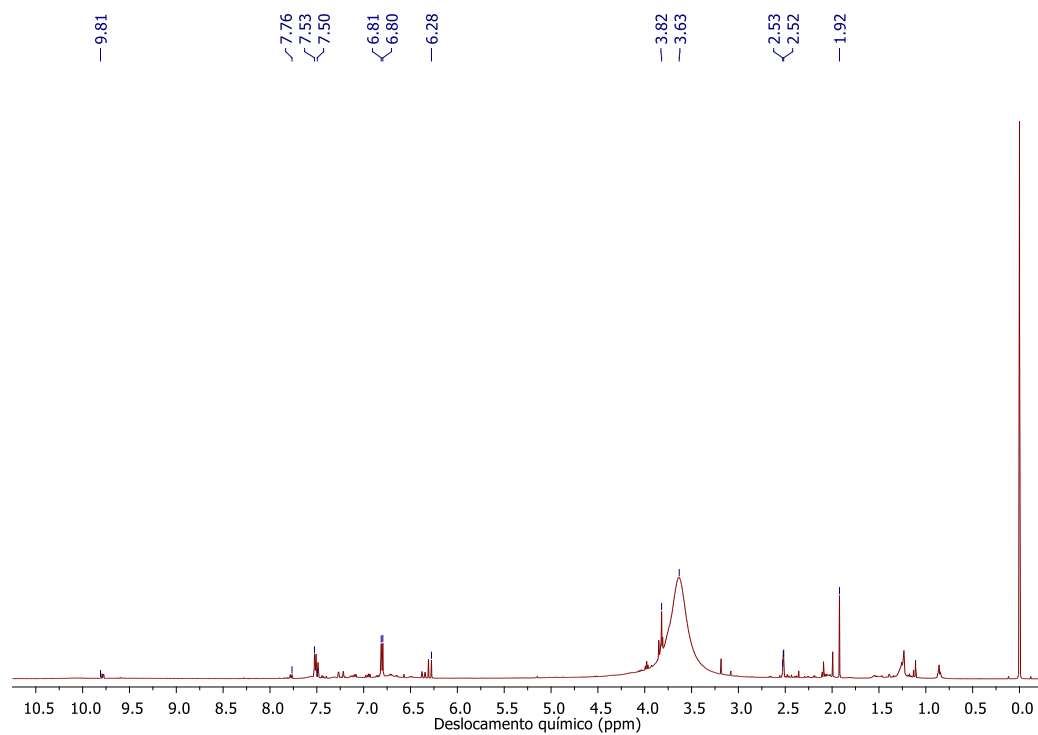
**Continuação da Tabela F1**

Solventes	Fenólicos (g/ L)	
	<i>S. stipitis</i>	<i>S. passalidarum</i>
Butanol	0,677 ± 0,002	0,663 ± 0,014
Álcool isoamílico	1,065 ± 0,009	0,973 ± 0,005
2- Etilhexanol	1,904 ± 0,049	1,703 ± 0,129
1-Decanol	2,007 ± 0,110	2,038 ± 0,045
Ac. butila	2,037 ± 0,001	1,928 ± 0,047
Ac. isobutila	1,806 ± 0,003	1,870 ± 0,001
Ac. isoamila	1,105 ± 0,056	1,098 ± 0,001
Prop. isoamila	2,367 ± 0,013	2,288 ± 0,027
Ac. heptila	2,662 ± 0,181	2,410 ± 0,040
MIBK	2,570 ± 0,015	2,452 ± 0,063
DIBK	2,585 ± 0,081	2,589 ± 0,054
Biod. coco	3,098 ± 0,056	2,784 ± 0,041
Biod. mamona	2,775 ± 0,074	2,588 ± 0,006
MTBE	2,212 ± 0,027	2,087 ± 0,015

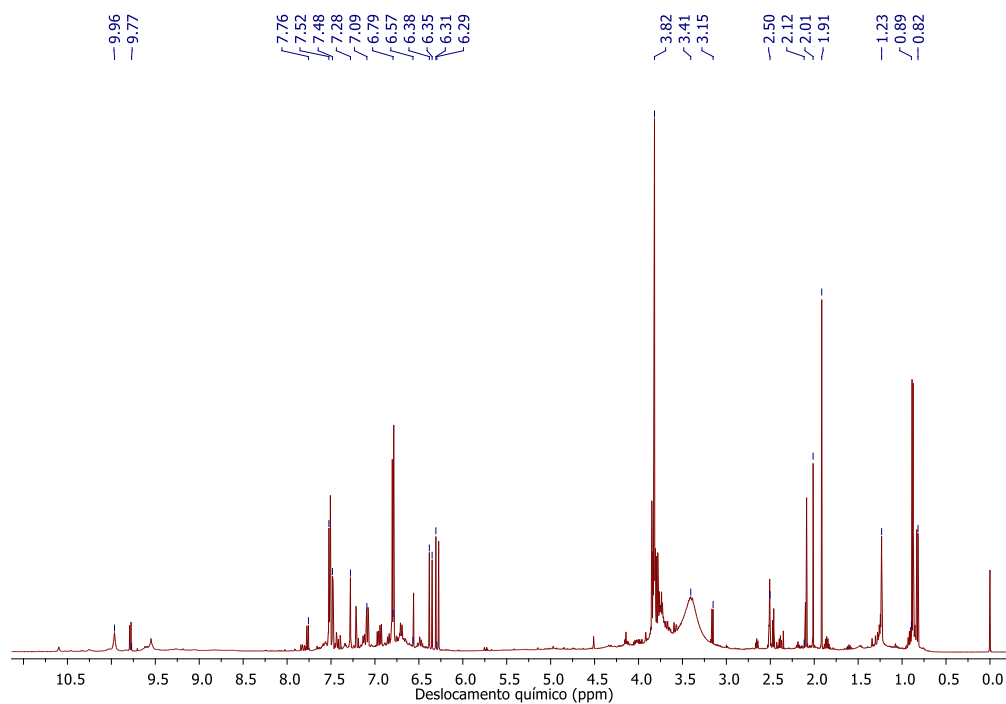
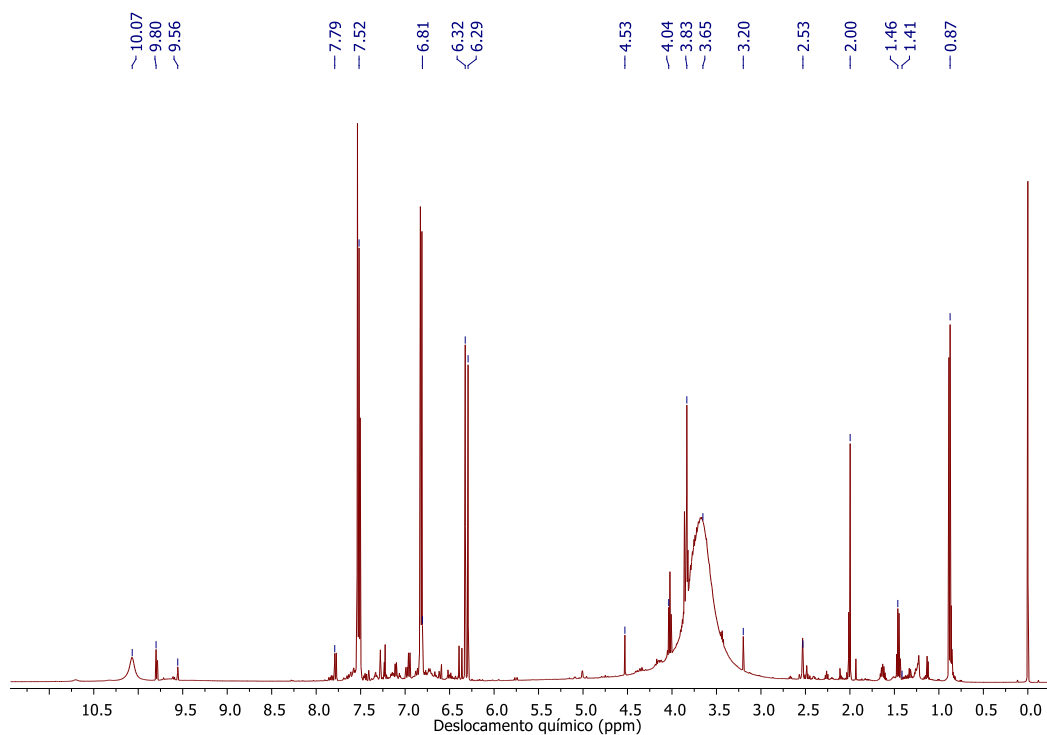
**Tabela F2.** Produtividades específicas e volumétricas em etanol para xilose, hidrolisado evaporado e hidrolisados destoxificados pelo processo de extração líquido-líquido.

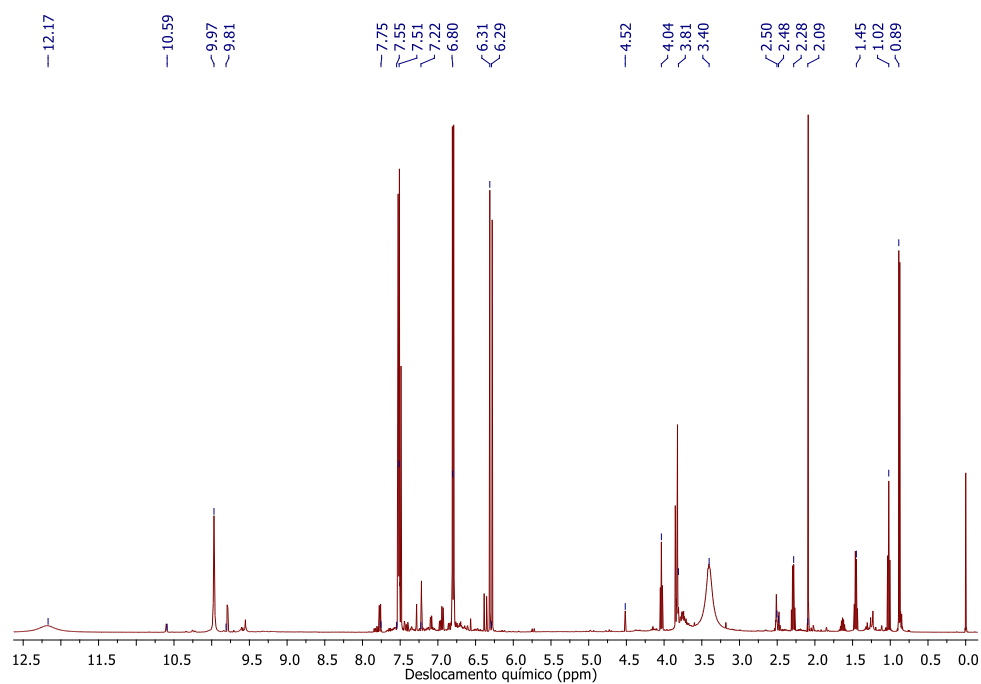
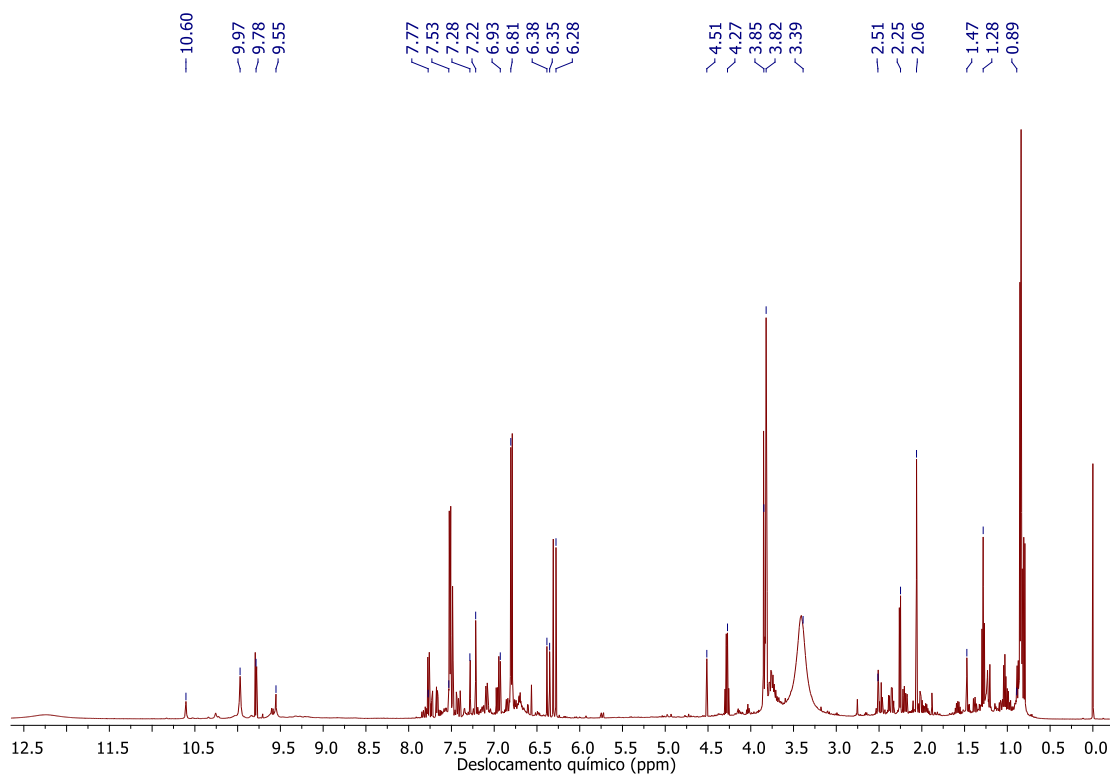
<i>Solventes</i>	<i>S. passalidarum</i>		<i>S. stipitis</i>	
	Produtividade específica (g <sub>EiOH</sub> g <sub>DWCW</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Produtividade volumétrica (g/L.h)	Produtividade específica (g <sub>EiOH</sub> g <sub>DWCW</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Produtividade volumétrica (g/L.h)
Xilose	2,60 ± 0,07	0,893 ± 0,01	0,352 ± 0,005	1,93 ± 0,04
HH evaporado	1,64 ± 0,13	0,269 ± 0,02	0,028 ± 0,001	0,34 ± 0,04
Butanol	2,12 ± 0,01	0,174 ± 0,01	0,022 ± 0,001	0,30 ± 0,01
Álcool isoamílico	2,60 ± 0,13	0,386 ± 0,07	0,111 ± 0,002	0,99 ± 0,04
2-Etilhexanol	1,99 ± 0,01	0,385 ± 0,01	0,107 ± 0,016	0,98 ± 0,15
1-Decanol	2,18 ± 0,05	0,402 ± 0,02	0,040 ± 0,002	0,86 ± 0,25
Ac. butila	1,14 ± 0,23	0,120 ± 0,01	0,032 ± 0,001	0,62 ± 0,01
Ac. isobutila	2,20 ± 0,08	0,392 ± 0,05	0,146 ± 0,002	1,22 ± 0,03
Ac. isoamila	2,18 ± 0,01	0,392 ± 0,01	0,091 ± 0,002	0,81 ± 0,28
Prop. isoamila	2,35 ± 0,02	0,398 ± 0,01	0,195 ± 0,011	1,52 ± 0,11
Ac. heptila	0,21 ± 0,02	0,023 ± 0,01	0,000 ± 0,000	0,00 ± 0,00
MIBK	2,17 ± 0,01	0,411 ± 0,01	0,258 ± 0,002	1,74 ± 0,11
DIBK	1,91 ± 0,02	0,385 ± 0,01	0,236 ± 0,001	1,67 ± 0,02
Biod. coco	0,49 ± 0,03	0,056 ± 0,01	0,004 ± 0,000	0,01 ± 0,08
Biod. mamona	1,58 ± 0,14	0,280 ± 0,01	0,002 ± 0,000	0,05 ± 0,03
MTBE	2,23 ± 0,08	0,407 ± 0,02	0,233 ± 0,004	1,65 ± 0,05

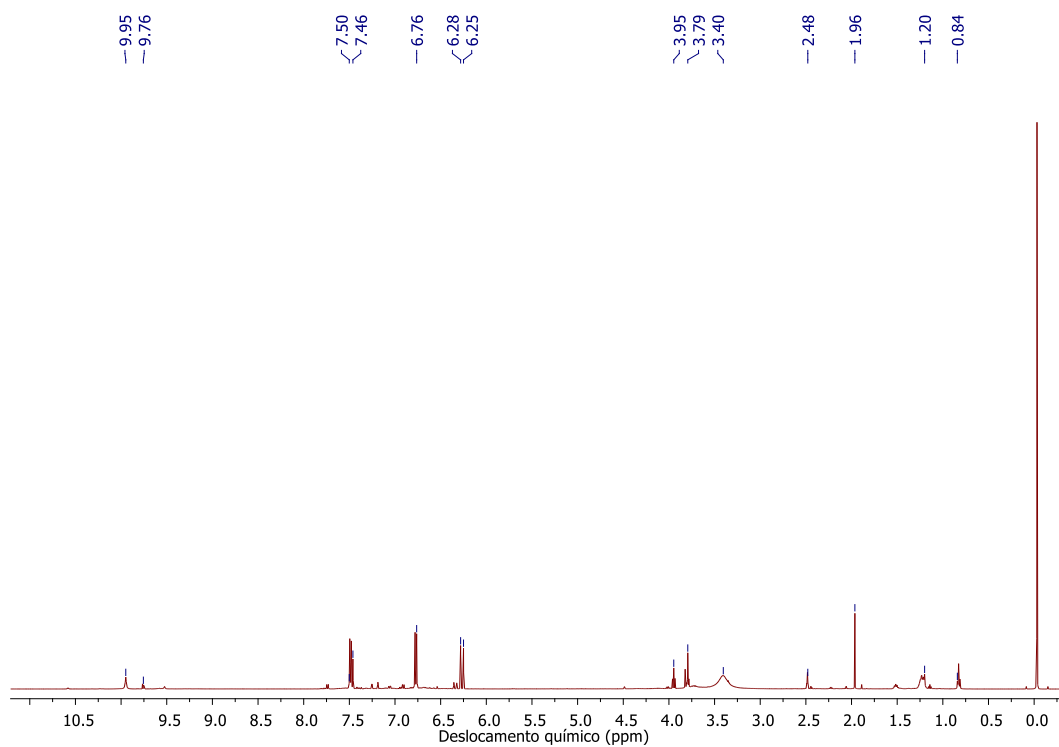
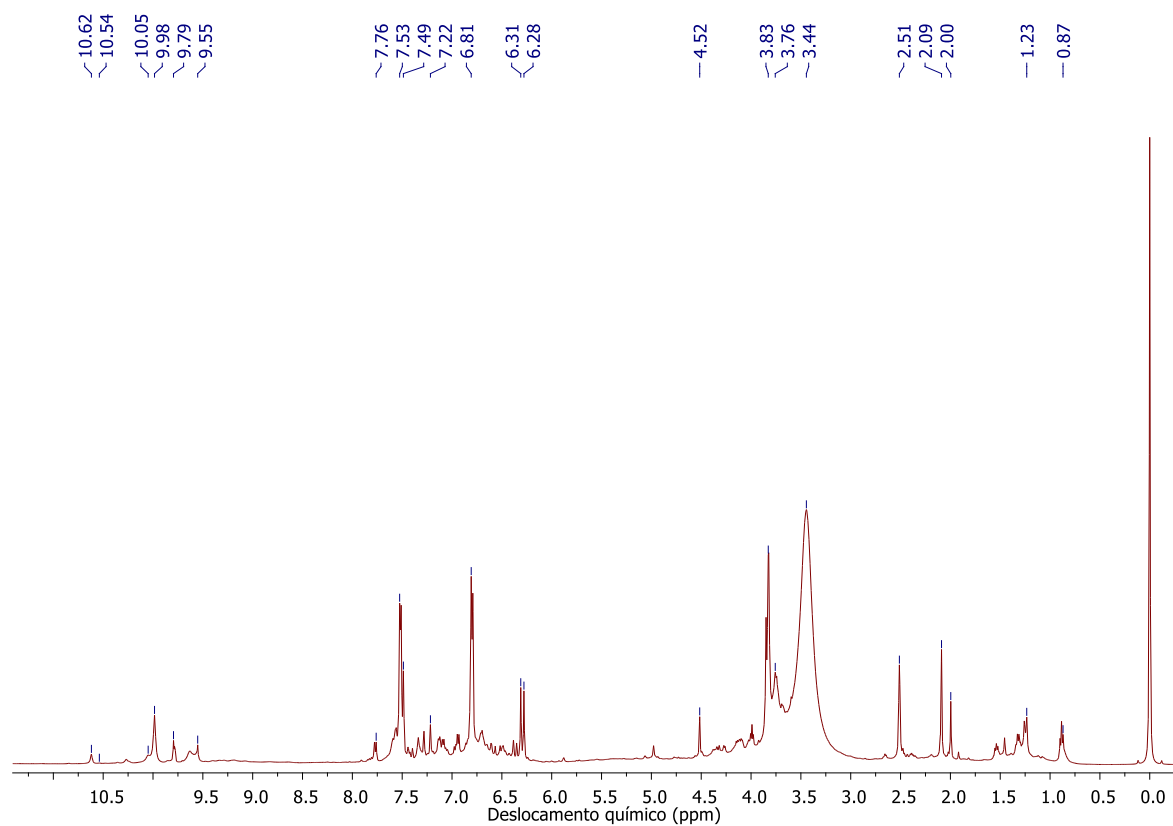
## ANEXO G

**Figura G1.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com MIBK.**Figura G2.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com MTBE.



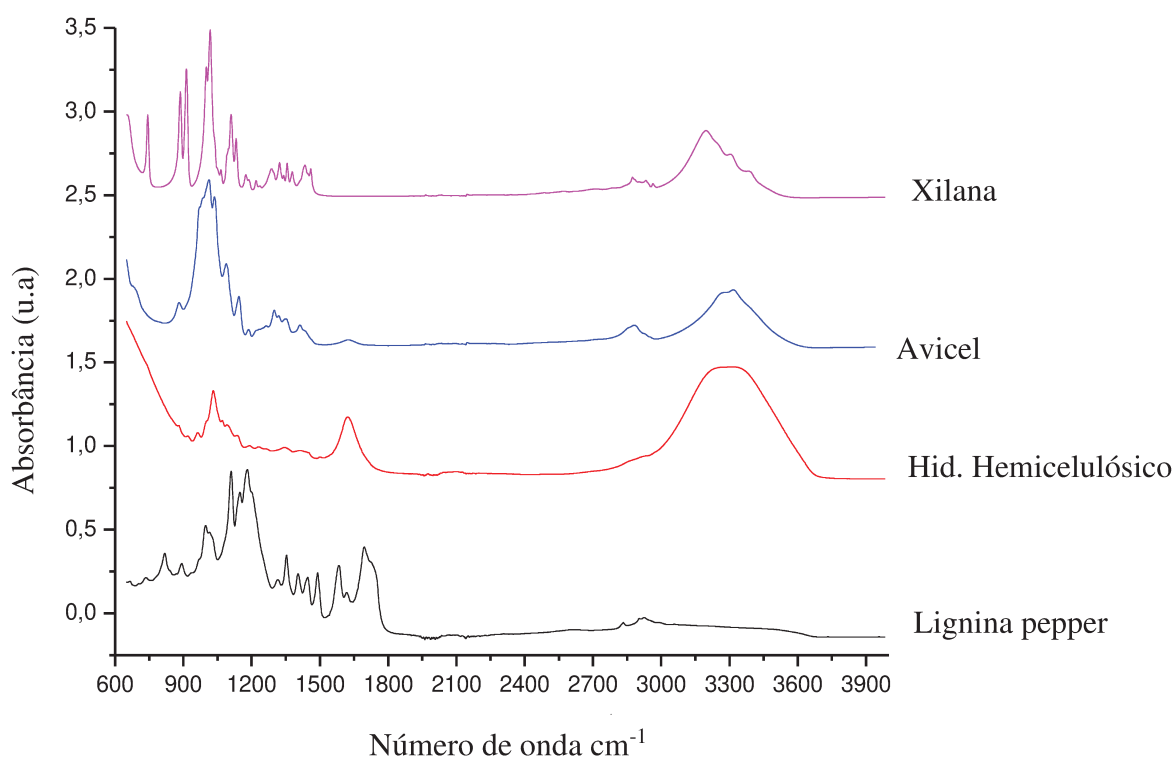
**Figura G3.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com acetato de isobutila.**Figura G4.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com acetato de isoamila.

**Figura G5.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com propionato de isoamila.**Figura G6.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com DIBK.

**Figura G7.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com acetato de heptila.**Figura G8.** Espectro de  $^1\text{H}$ NMR da fração fenólica extraída com acetato de butila.

## ANEXO H

**Figura H1.** Espectro de Infravermelho dos padrões celulose microcristalina, xilose 97%; hidrolisado hemicelulósico proveniente de pré-tratamento com ácido diluído sem concentrar; e lignina obtida pelo método de extração pepper.



**Figura H2.** Picos característicos e suas atribuições para celulose, xilose, lignina pepper, hidrolisado hemicelulósico.

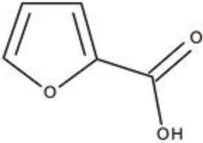
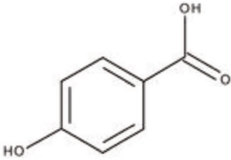
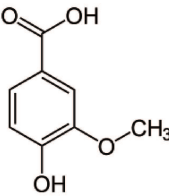
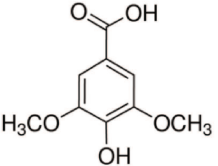
Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Celulose	Xilose	Lignina pepper	Lignina Padrão *	Hidrolisado evaporado	Atribuições
3500-3000	3322	3207	-	-	3300	Banda forte e larga - ligação O-H
3000-2800	2885	2887	2909	-	-	Deformação - ligação C-H
1700-1600	1620	-	-	-	1630	Estiramento - ligação O-H conjugada com vibração da ligação C=O
1600-1550	-	-	1593	1599	-	Estiramento forte - vibrações do anel aromático, estiramento da ligação C-O, estiramento da ligação C=O
1550-1500	-	-	1502	1511	-	Estiramento assimétrico - Vibração do anel aromático, ligação C=C –
1500-1450	-	-	1459	1467	-	Deformação assimétrica C-H, em -CH <sub>3</sub> , e -CH <sub>2</sub> -
1450-1400	1418	-	1415	1429	-	1418 - Deformação assimétrica C-H; 1415 - Vibração do anel aromático com deformação C-H do plano
1400-1350	1353	-	1365	-	-	Banda característica ligação C-H
1350-1200	1310	-	-	-	-	Vibração CH <sub>2</sub>
1200-1150	-	-	1190	1157	-	Vibrações anel aromático - Estiramento C-O e C=O

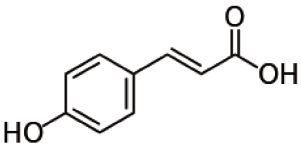
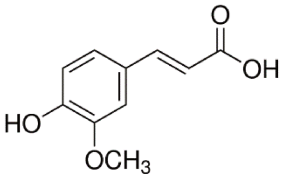
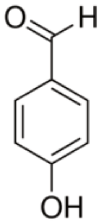
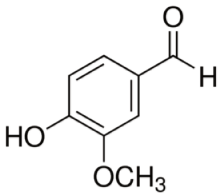
1150-1100	-	1147 1124	1123	-	-	1147, 1124 - Estiramento ligação glicosídica ; 1123 - Deformação C-H do anel típico de unidades siringila.
1100-1000	-	-	-	-	1050	Estiramento ligação C-O-C anel;
1050-950	1020	1032	1009	-	-	1032 - Estiramento característico ligação C-O, C=C e C-C-O; 1020 - Estiramento ligação C-O; 1009 - Deformação no plano - deformação de C-O de álcool primário
950-800	-	928 - 901	828	-	-	Deformação ligação C-H fora do plano

\*Referência ADAPA, et al., (2011)

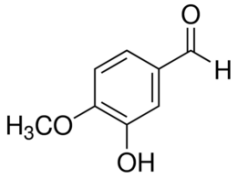
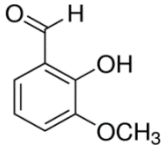
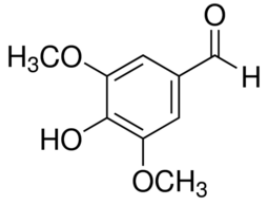
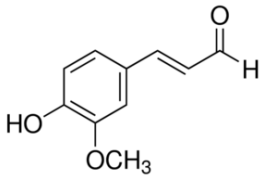
## ANEXO I

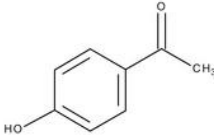
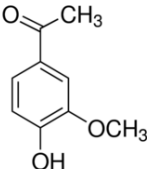
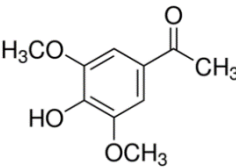
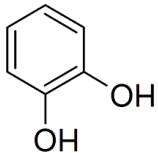
**Tabela II.** Estruturas químicas, massa molecular e massa empregadas no preparo das soluções padrões para análise em UPLC-MSMS.

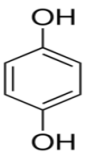
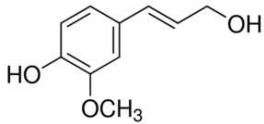
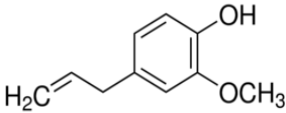
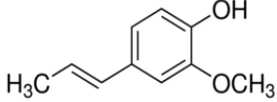
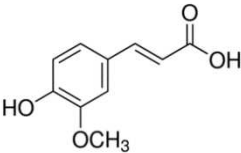
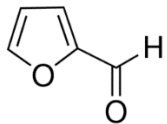
Item	Composto	Estrutura	Massa Molar g/mol	Quantidade pesada (g)	Volume de água Mili Q (L)	Concentração mol/L
1	Ácido 2-furanoico: Sigma- Aldrich (Fluka)		112,08	0,0011	0,010	0,001
2	Ácido 4-hidroxibenzoico: Merck.		138,12	0,0014	0,010	0,001
3	Ácido vanilínico, Marca: Sigma-Aldrich (Fluka)		168,15	0,0017	0,010	0,001
4	Acido siringico: Sigma- Aldrich.		198,17	0,0020	0,010	0,001

5	Ácido 4-hidroxicinâmico (ou para-coumaric acid): Sigma Aldrich		164,16	0,0016	0,010	0,001
6	Ácido ferulico (ou ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico), Marca: Merck		194,18	0,0019	0,010	0,001
7	<i>p</i> -hidroxibenzaldeído, Marca: Sigma-Aldrich.		122,12	0,0012	0,010	0,001
8	Vanilina, - $\geq 99,0\%$ , Marca: Merck.		152,15	0,0015	0,010	0,001

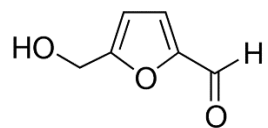


9	Iso-vanilina, Marca: Sigma-Aldrich (Fluka).		152,15	0,0015	0,010	0,001
10	Orto-vanilina (ou 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldeido), 99%, Marca: Sigma-Aldrich,		151,15	0,0015	0,010	0,001
11	Siringaldeido (ou 3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldeido),: Sigma-Aldrich (Fluka),		182,17	0,0018	0,010	0,001
12	Coniferil (ou 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde e tambem Coniferyl aldehyde), ensaio 98%,: Sigma Aldrich,		178,18	0,0018	0,010	0,001

13	4-hidroxiacetofenona, Padrao Marca: Sigma-Aldrich (Fluka)		136,15	0,0014	0,010	0,001
14	Acetovanilona, Padrao analitico, Marca: Sigma- Aldrich (Fluka),		166,17	0,0017	0,010	0,001
15	Acetosiringona (ou acetosyringone e tambem 3',5'-Dimethoxy-4'- hydroxyacetophenone), ensaio 97%, Marca: Sigma- Aldrich,		196,2	0,0020	0,010	0,001
16	Catecol (ou 1,2- Dihydroxybenzene e tambem Pirocatecol), ensaio $\geq 99\%$ , Marca: Sigma-Aldrich,		110,11	0,0011	0,010	0,001

17	Hidroquinona, Marca: Sigma-Aldrich,		110,11	0,0011	0,010	0,001
18	Alcool coniferil, ensaio 98%, Marca: Sigma-Aldrich,		180,2	0,0018	0,010	0,001
19	Eugenol, Padrao analitico, Marca: Sigma-Aldrich (Fluka)		164,2	0,0016	0,010	0,001
20	Isoeugenol, Padrao analitico, Marca: Sigma-Aldrich (Fluka)		164,2	0,0016	0,010	0,001
21	Ácido trans ferúlico, Padrao analitico, Marca: Sigma- Aldrich;		194,18	0,0019	0,010	0,001
22	Furfural (2-Furaldehyde, Furan-2-carboxaldehyde)		96,08	0,0010	0,010	0,001

23 Hidroximetilfurfural



126,11

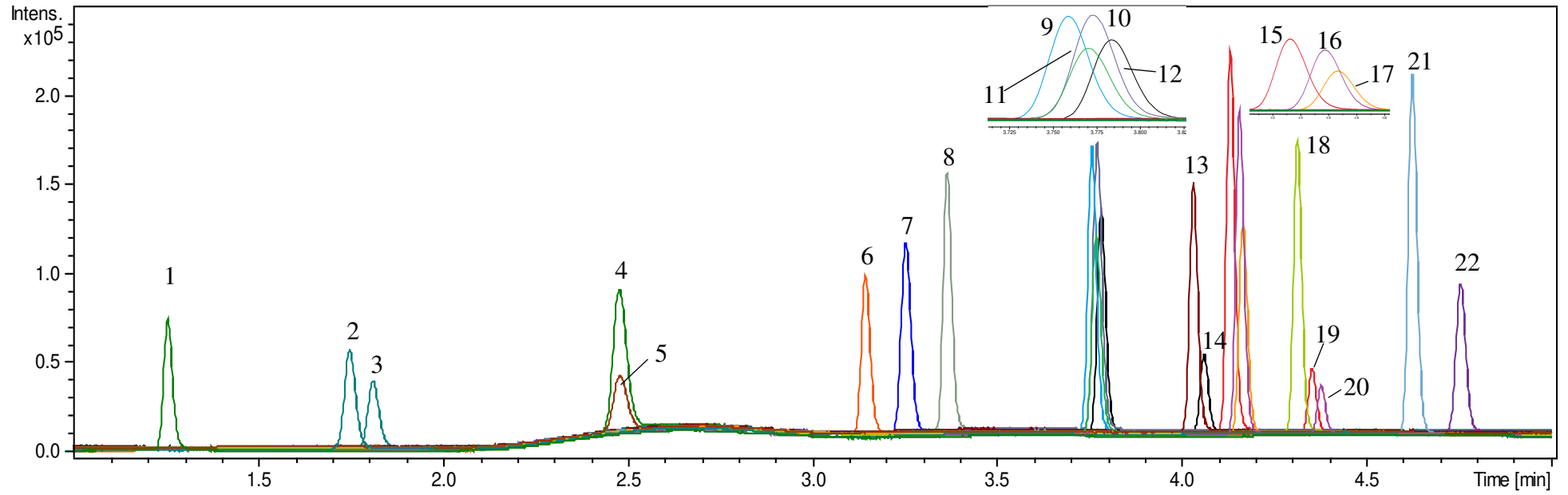
0,0013

0,010

0,001

---

**Figura 11.** Espectro de massas dos padrões utilizados na análise de caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos.



**Tabela I2.** Tempos de retenção dos padrões utilizados na análise de caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos.

ID	Tempo de retenção (min)	Composto	ID	Tempo de retenção (min)	Composto
1	1,26	HMF (126,11 g/mol)	12	3,79	Ácido 4 hidroxicinâmico
2	1,75	Furfural (96,08 g/mol)	13	4,03	Siringaldeído
3	1,82	Ácido furanóico (112,08)	14	4,06	Ácido 4 hidroxicinâmico
4	2,48	Ácido 4 – hidroxibenzóico (138,12 g/mol)	15	4,13	Ácido ferulico
5	2,48	Catecol (110,1 g/mol)	16	4,16	Ácido transferulico
6	3,15	Ácido vanilínico (modo negativo)	17	4,17	Acetovanilona
7	3,25	4 – hidroxibenzaldeído (122,11)	18	4,31	Acetosiringona
8	3,37	Ácido siríngico	19	4,33	Ácido ferulico
9	3,76	Iso vanilinina	20	4,38	Ácido trans ferulico
10	3,78	Vanilina	21	4,63	Alcool coniferílico
11	3,77	p-hidroxiacetofenona	22	4,75	Orto vanilina