

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Bioadsorção dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa  
lignocelulósica em biorrefinarias**

MARINA BARBOSA MALUF RIBEIRO

São Carlos – SP

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Bioadsorção dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa  
lignocelulósica em biorrefinarias**

MARINA BARBOSA MALUF RIBEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Engenharia Bioquímica.

Orientadora: Cristiane Sanchez Farinas

São Carlos – SP

2020

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARINA BARBOSA MALUF RIBEIRO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 29 DE ABRIL DE 2020.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas

**Orientadora, EMBRAPA/UFSCar**



p/

Francisco Guilherme Esteves Nogueira

**UFSCar**



p/

Elaine Cristina Paris

**EMBRAPA**

*“Tudo o que fizerem, façam de  
todo o coração, como para o  
Senhor, e não para os homens.”*

*Colossenses 3:23*

*Dedico este trabalho à  
Deus por ter me dado esta  
oportunidade e a meus pais pelo  
incentivo, apoio e amor  
incondicionais.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela Sua fidelidade e infinita bondade com a minha vida. Por ter me dado essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional e por ter colocado tantas pessoas maravilhosas ao meu redor. Por sempre guardar a minha vida em todos os momentos e, principalmente, nessas tantas idas e vindas na estrada para rever minha família.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Silmara, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo longe, me apoiando e me aconselhando em todos os momentos, por não medirem esforços para me ver feliz e realizada. Obrigada por sempre acreditarem em mim e não me deixar desistir. Meu amor e gratidão por vocês é imensurável. Ao meu irmão Murilo, obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela cumplicidade e por sempre me incentivar a ser melhor.

Ao meu namorado Túlio, obrigada pelo amor e companheirismo, por sempre tentar me ajudar no que fosse possível, mesmo longe, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, e por fazer o que estivesse ao seu alcance para me ver bem. E principalmente por ter paciência comigo nos momentos de crise.

Aos meus amigos da turma de Mestrado 2018 do PPGEQ UFSCar, minha eterna gratidão a todo nosso companheirismo e parceria nessa jornada árdua, obrigada por fazerem essa caminhada mais feliz e leve em meio a tantas dificuldades. Os momentos ficarão para sempre em meu coração. Em especial a Brenda, Tássia, Gui, Rafa, Leo e Vittor, obrigada por tantos momentos especiais. Aos colegas do DEQ, que de alguma forma impactaram e fizeram diferença na minha vida, obrigada!

Às minhas queridas companheiras de Lab da Embrapa, meu muito obrigada por todo conhecimento compartilhado, pelo companheirismo no dia a dia, por sempre tentarem me ajudar no possível e por deixarem meus dias difíceis, mais fáceis, sendo com um simples gesto de carinho, um abraço, um conselho amigo. Em especial à Ludi, Camila, Bruno, Thalita, Juliana, Monique, Thamara, Marina, obrigada por tudo!

Agradeço a minha orientadora Cristiane Farinas, por sempre me auxiliar e orientar no caminho certo, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desse mestrado. À CAPES e CNPq por contribuir com este trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar pela possibilidade de realizar este projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, ajudaram de alguma forma, sendo com um sorriso de incentivo ou conhecimento compartilhado, auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigada!

## RESUMO

Na etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias são gerados compostos que podem atuar como inibidores das etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica. Dentre estes inibidores, os compostos fenólicos originados da degradação da lignina podem inibir ou desativar as enzimas durante a reação de hidrólise, impactando significativamente o rendimento global da conversão da biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis. Dessa forma, novas estratégias que contribuam para mitigar o efeito negativo destes inibidores se tornam necessárias para viabilizar as futuras biorrefinarias. Neste contexto, uma potencial estratégia é o uso de biomassa microbiana como bioadsorvente para a remoção dos compostos fenólicos gerados na etapa de pré-tratamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da biomassa microbiana de *Aspergillus niger* para a adsorção de compostos fenólicos presentes no licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar. O cultivo do fungo foi feito para obter a biomassa microbiana e três tratamentos foram realizados: autoclave, ácido e básico. As biomassas de *A. niger* pré-tratadas e moídas foram usadas como bioadsorventes para remoção dos compostos fenólicos. Testes com amostras sintéticas de vanilina (monômero) e ácido tânico (oligômero) mostraram que os adsorventes têm maior afinidade de adsorver moléculas maiores, como o ácido tânico, por ser um material pouco poroso. Avaliou-se também o efeito da carga de adsorvente, pH e temperatura na capacidade de adsorção. Foi obtida uma remoção de 98% de ácido tânico pela biomassa tratada com hidróxido de sódio, enquanto que para a vanilina a afinidade foi menor, com uma remoção de pouco mais de 30%. Para os fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento, foi obtida uma remoção em torno de 40%. Os ensaios de hidrólise enzimática do bagaço hidrotérmico na presença do licor após a remoção dos inibidores pelos bioadsorventes apresentaram um aumento de 50% na liberação de glicose. Os resultados obtidos indicam que a biomassa fúngica tem um potencial interessante para a remoção dos inibidores presentes no licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar de modo a melhorar a conversão dos açúcares na etapa de hidrólise enzimática em biorrefinarias.

**Palavras-chave:** Bioadsorção, biomassa microbiana, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

In the pretreatment stage of lignocellulosic biomass in biorefineries can release compounds that act as inhibitors of the enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation steps. Among the inhibitors, the phenolic compounds originated from lignin degradation can inhibit or deactivate the enzymes during the hydrolysis reaction, significantly impacting the overall yield of the conversion of biomass into soluble sugars. Therefore, new strategies that contribute to mitigate the negative effect of these inhibitors are necessary to enable the viability of future biorefineries. In this context, a potential strategy is the use of microbial biomass as a low-cost biosorbent for the removal of the phenolic compounds generated in the pretreatment stage. Thus, the aim of this work was to evaluate the use of *Aspergillus niger* microbial biomass for adsorption of the phenolic compounds present in the liquor of the hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse. The fungal cultivation was made to obtain the microbial biomass and three types of treatments (autoclave, acidic and basic solutions) were used to prepare the biosorbents. Tests with synthetic samples of vanillin (monomer) and tannic acid (oligomer) showed that the biosorbents have a greater affinity for adsorbing larger molecules, such as tannic acid, as it is a low porous material. The effect of the adsorbent load, pH and temperature on the adsorption capacity was also evaluated. A 98% removal of tannic acid was obtained by the biomass treated with sodium hydroxide, whereas for vanillin the affinity was lower, with a removal of just over 30%. For the total phenolics present in the pre-treatment liquor, a removal of around 40% was obtained. The enzymatic hydrolysis assays of the hydrothermal bagasse in the presence of the liquor after the removal of the inhibitors by the biosorbents showed a 50% increase in the glucose release. The results obtained indicate that the fungal biomass has an interesting potential for the removal of the inhibitors present in the liquor of the pretreatment of the sugarcane bagasse in order to improve the conversion of the sugars in the enzymatic hydrolysis stage in biorefineries.

**Keywords:** biosorption, microbial biomass, phenolic compounds.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Processo de conversão da biomassa em biorrefinarias .....	3
2.1.1. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos .....	3
2.1.2. Inibidores gerados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	5
2.2. Métodos para remoção dos compostos inibidores .....	6
2.3. Composição da biomassa microbiana.....	9
2.3.1. Interações envolvidas na adsorção por biomassa fúngica .....	11
2.4. Termodinâmica da Adsorção .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.4.1. Isotermas de Adsorção.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
4.1. Obtenção da biomassa microbiana como bioadsorvente .....	14
4.1.1. Microrganismo .....	14
4.1.2. Fermentação Submersa (FSm).....	14
4.1.3. Preparação dos bioadsorventes.....	15
4.2. Caracterização dos bioadsorventes .....	16
4.2.1. Área superficial e volume de poros .....	16
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	16
4.2.3. Potencial Zeta .....	16
4.2.4. FTIR .....	16
4.2.5. Análise Termogravimétrica .....	17
4.2.6. Difração de raios X (DRX).....	17
4.2.7. Análise Elementar.....	17
4.3. Procedimento experimental de adsorção .....	17

4.3.1.	Adsorção de amostras sintéticas .....	17
4.3.2.	Adsorção da fração líquida do pré-tratamento do bagaço .....	19
4.3.3.	Cinética de adsorção .....	20
4.3.4.	Isotermas de adsorção.....	21
4.3.5.	Análise de concentração de compostos fenólicos.....	23
4.4.	Ensaio de Hidrólise Enzimática .....	24
4.4.1.	Procedimento Experimental .....	24
4.4.2.	Análise da concentração de glicose .....	24
4.4.3.	Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART) .....	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1.	Efeito da fonte de carbono no rendimento dos bioadsorventes .....	26
5.2.	Caracterizações .....	27
5.2.1.	Área superficial e volume de poros .....	27
5.2.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	29
5.2.3.	Potencial Zeta .....	32
5.2.4.	FTIR .....	34
5.2.5.	Análise Termogravimétrica .....	36
5.2.6.	Difração de raios X (DRX).....	38
5.2.7.	Análise Elementar (CHN) .....	39
5.3.	Adsorção com amostras sintéticas .....	40
5.3.1.	Ensaio preliminares .....	41
5.3.2.	Efeito do pH .....	46
5.3.3.	Efeito da temperatura.....	48
5.4.	Adsorção dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento .....	49
5.4.1.	Influência do pH e temperatura.....	51
5.5.	Cinética de adsorção .....	52
5.5.1.	Ajuste aos modelos cinéticos .....	54

5.6. Termodinâmica da adsorção .....	56
5.6.1. Isotermas de adsorção .....	56
5.7. Hidrólise Enzimática.....	61
6. CONCLUSÕES.....	64
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
APÊNDICE .....	78

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biomassa lignocelulósica sujeita ao pré-tratamento .....	4
Figura 2 – Esquema da estrutura geral da parede celular de fungos. ....	10
Figura 3 – Estrutura química da quitina e glucano. ....	11
Figura 4 – Estrutura química da vanilina (a) e ácido tânico (b). ....	18
Figura 5 – Estufa utilizada nos experimentos de adsorção. ....	19
Figura 6 – Tipos de isotermas de acordo com a classificação da IUPAC. ....	28
Figura 7 – Isotermas de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> para os adsorventes produzidos com glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico. ....	27
Figura 8 – Imagens de microscopia da biomassa cultivada com glicose e sujeita aos tratamentos autoclave (a), ácido (b) e básico (c). ....	30
Figura 9 – Imagens de microscopia da biomassa cultivada com glicerol e sujeita aos tratamentos autoclave (a), ácido (b) e básico (c). ....	31
Figura 10 – Imagens de microscopia da biomassa básica após o contato com solução de ácido tânico. ....	32
Figura 11 – Análise do potencial zeta em função do pH da solução para os adsorventes produzidos a partir de glicose (a) e glicerol (b) como fonte de carbono, submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico. ....	33
Figura 12 – Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) para os bioadsorventes submetidos aos três tratamentos (autoclave, ácido e básico) e produzidos com glicose (a) e glicerol (b). ....	34
Figura 13 – Curva termogravimétrica (a) e DTG (b) para os adsorventes produzidos com glicose e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico. ....	37
Figura 14 – Curva termogravimétrica (a) e DTG (b) para os adsorventes produzidos com glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico. ....	38

Figura 15 – Difractogramas de raios X para os bioadsorventes autoclave, ácido e básico produzidos com glicerol. ....	39
Figura 16 – Percentual de remoção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes produzidos com glicose em diferentes cargas (1, 3, 5 e 8 % m/v), em pH 3 e 30 °C.....	41
Figura 17 – Percentual de remoção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes produzidos com glicerol em diferentes cargas (1, 3, 5 e 8 % m/v), em pH 3 e 30 °C. ....	43
Figura 18 – Percentual de remoção de catecol, ácido p-coumárico e ácido 4-hidroxibenzóico com carga de 3% (m/v) dos bioadsorventes autoclave, ácido e básico em pH 3 e 30 °C.....	44
Figura 19 – Estrutura química dos compostos fenólicos. ....	45
Figura 20 – Percentual de remoção de vanilina e ácido tânico para os três adsorventes (autoclave, ácido e básico) produzidos e carvão ativado comercial (CAC) em pH 3 e 30 °C. ....	46
Figura 21 – Efeito da variação do pH na adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes, para 3% (m/v) de carga, a 30 °C. ....	47
Figura 22– Efeito da temperatura na adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes, para 3% (m/v) de carga, em pH 5. ....	49
Figura 23 – Percentual de remoção dos fenólicos totais do licor para diferentes cargas (1, 3 e 5%) dos adsorventes autoclave, ácido e básico a 30 °C e pH original do licor. ....	50
Figura 24 – Percentual de remoção de fenólicos totais do licor com carga de 5% (m/v) para os 6 adsorventes produzidos, a 30 °C e pH original do licor. ....	51
Figura 25 – Curvas de cinética de adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) para 5% (m/v) de bioadsorvente básico e carvão ativado comercial (CAC), a 30 °C, pH 5 e Co de 3 g/L. ....	53
Figura 26 – Capacidade de adsorção (mg/g) do bioadsorvente básico em função do tempo (min) em relação a vanilina (a) e ácido tânico (b). ....	55
Figura 27 – Isotermas de equilíbrio de adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico. ....	58

Figura 28 – Isotermas de adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b), a 30 °C, pH 5, 30 rpm com ajuste dos modelos. ....	60
Figura 29 – Isotermas de ácido tânico no bioadsorvente básico a 30 e 50 °C.....	62
Figura 30 – Concentração de glicose e ART liberadas após a hidrólise enzimática do bagaço e celuflok a 50 °C, 30 rpm, por 24 h. ....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo. ....	15
Tabela 2 – Rendimento médio do cultivo de biomassa para produção de adsorventes utilizando glicose e glicerol como fonte de carbono. ....	26
Tabela 3 – Valores de área superficial BET e volume de poros para os adsorventes produzidos a partir de glicose e glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.....	29
Tabela 4 – Grupos funcionais correspondentes às bandas obtidas no FTIR dos adsorventes..	35
Tabela 5 – Porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) presentes nos adsorventes obtidos com glicose e glicerol e submetidos aos tratamentos físico-químicos. ...	40
Tabela 6 – Porcentagens de remoção de fenólicos totais do licor em diferentes pHs (3,4 e 5) e temperaturas (30 e 50 °C) com 5% (m/v) de adsorvente. ....	52
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste aos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para a adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico..	56
Tabela 8 – Parâmetros estimados das equações das isotermas utilizadas para descrever os dados experimentais da adsorção de ácido tânico e vanilina a 30 °C. ....	60
Tabela 9 – Coeficientes de correlação (R <sup>2</sup> ) e critério de informação de Akaike corrigido (AICc) das equações das isotermas utilizadas para descrever os dados experimentais.....	60

## 1. INTRODUÇÃO

O rápido crescimento da população mundial e o conseqüente aumento da demanda por alimentos, energia e água são e irão continuar sendo grandes desafios para o mundo nas próximas décadas. A sociedade atual não pode mais depender somente de fontes de energia não renováveis e poluentes. Assim, o uso de fontes de energia renováveis se torna um desafio científico-industrial e uma demanda social (SPERANDIO; FERREIRA FILHO, 2019). Neste contexto desafiador, as biorrefinarias tem o potencial de suprir boa parte dessa demanda de energia e insumos para diversos setores industriais de forma ambientalmente sustentável.

O uso da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos tem ganhado força nos últimos anos (LIGUORI; FARACO, 2016). No processo de produção de Etanol de Segunda Geração (2G) e outros bioprodutos nas biorrefinarias é necessária uma etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica a fim de romper a estrutura recalcitrante de sua parede celular e aumentar a acessibilidade das enzimas durante o processo de conversão dos polissacarídeos em açúcares simples. No entanto, nessa etapa de pré-tratamento também são gerados compostos que podem atuar como inibidores das reações bioquímicas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica (KO *et al.*, 2015; MES-HARTREE; SADDLER, 1983; MOSIER *et al.*, 2005; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Os compostos fenólicos provenientes da degradação da lignina estão entre os principais inibidores das reações de hidrólise enzimática da biomassa vegetal, causando inibição e/ou desativação de enzimas do complexo celulolítico (KIM *et al.*, 2011; MALGAS *et al.*, 2016; MHLONGO *et al.*, 2015; QIN *et al.*, 2016; TEJIRIAN; XU, 2011; XIMENES *et al.*, 2011; XIMENES *et al.*, 2010). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de estratégias para minimizar o impacto negativo dos compostos inibidores gerados, de modo a melhorar o rendimento global das biorrefinarias.

O processo de adsorção tem se mostrado como uma boa alternativa para a remoção de compostos orgânicos e inorgânicos de soluções aquosas, uma vez que é um dos métodos que vem sendo mais utilizado para esse tipo de tratamento, sendo o carvão ativado o adsorvente mais empregado (DELGADO *et al.*, 2019; DING *et al.*, 2018; MARTÍN *et al.*, 2018; MUKHERJEE *et al.*, 2007; MUSSATO; ROBERTO, 2004). Embora o carvão ativado seja bastante eficiente como adsorvente, é um material que apresenta um alto custo de obtenção e regeneração. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de adsorventes de baixo custo, mas que proporcionem uma eficiente remoção dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa, de modo a aumentar a eficiência do processo de hidrólise enzimática e contribuir para a utilização efetiva dos açúcares solúveis gerados.

O uso da biomassa microbiana como bioadsorvente se mostra como uma alternativa de baixo custo e vem sendo amplamente estudado para a remoção de compostos indesejados de efluentes industriais. Estudos de bioadsorção de compostos fenólicos, metais pesados e corantes já demonstraram a eficiência e viabilidade da aplicação da biomassa microbiana de fungos, bactérias e algas como adsorvente (DING *et al.*., 2019a; MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; ÖNAL, 2010; SHROFF; VAIDYA, 2012; VALE *et al.*., 2016).

A parede celular de fungos é composta, principalmente, de polissacarídeos e proteínas em várias proporções. Esses componentes estruturais garantem a presença de diferentes grupos funcionais, como grupos amino e hidroxila, que são capazes de se ligar a vários tipos de moléculas, estando, assim, envolvidos na bioadsorção de diversos compostos. Devido a essas propriedades, a biomassa de fungo vem ganhando destaque em estudos sobre diferentes tipos de bioadsorventes (CRINI; BADOT, 2008; FARKAS, 2003; TIGINI *et al.*., 2012).

Desta forma, considerando que a biomassa microbiana de fungos poderia ser gerada nas biorrefinarias como um coproduto do processo de produção de enzimas celulolíticas ou ácidos orgânicos (CUNHA *et al.*., 2017; DA SILVA DELABONA *et al.*., 2016; DEZAM *et al.*., 2017; SQUINCA *et al.*., 2018), por exemplo, se torna plausível considerar que esse adsorvente estaria disponível para aplicação sem significativo custo adicional.

Apesar do potencial já demonstrado destes bioadsorventes em remover compostos fenólicos, ainda não há estudos que avaliem sua aplicação no contexto das biorrefinarias. Portanto, é de interesse o estudo da utilização da biomassa microbiana de *Aspergillus niger* como bioadsorvente para a remoção dos compostos fenólicos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica visando contribuir para aumentar o rendimento global da conversão da biomassa vegetal nas biorrefinarias.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Processo de conversão da biomassa em biorrefinarias**

O conceito de biorrefinaria remete à ideia de integração de processos de conversão de biomassa, com o objetivo de produzir combustíveis, energia e produtos químicos. O conceito é análogo ao das refinarias de petróleo, onde são gerados produtos a partir de matérias-primas fósseis, de forma integrada e otimizada. No entanto, nas biorrefinarias são utilizadas matérias-primas renováveis, como biomassas e resíduos industriais, para a conversão em biocombustíveis e outros produtos (CHANDEL *et al.*, 2018; CLARK, 2007). A ideia de biorrefinarias industriais vem crescendo como uma alternativa bastante promissora para a criação de novas indústrias do futuro, especialmente do ponto de vista da sustentabilidade.

O etanol de segunda geração (2G) é um dos produtos inseridos neste contexto, pois é produzido a partir da biomassa residual da produção do etanol de primeira geração (1G) a partir da cana-de-açúcar. Os principais constituintes da biomassa lignocelulósica são a celulose, em torno de 35-50%, hemicelulose de 20-35%, 5-30% de lignina e outras substâncias de 1-10% (MENON e RAO, 2012). As etapas do processo de produção do etanol 2G compreendem o pré-tratamento da biomassa vegetal, hidrólise enzimática, fermentação alcoólica e a separação do produto final, o etanol (KUMAR *et al.*, 2016).

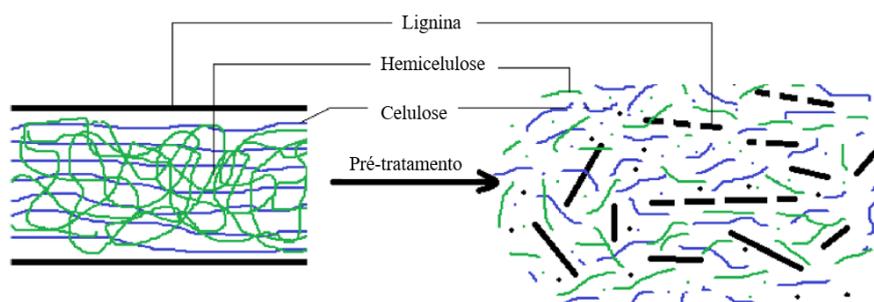
A acessibilidade das enzimas na etapa de hidrólise é dificultada devido à recalcitrância natural da parede celular vegetal. Assim, se faz necessária a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para aumentar a eficiência das enzimas na hidrólise, pois as enzimas apresentam um elevado custo para o processo e estão entre os itens de maior custo na produção do etanol lignocelulósico (MACRELLI *et al.*, 2012). Entretanto, no pré-tratamento da biomassa são gerados compostos que podem atuar como inibidores nas etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica. Dessa forma, um método eficiente de pré-tratamento é aquele em que há o rompimento do complexo lignocelulósico, aumentando a acessibilidade da celulose, mas com uma baixa produção de compostos inibidores (CHANDEL *et al.*, 2018).

#### **2.1.1. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos**

O pré-tratamento da biomassa vegetal lignocelulósica tem como objetivo alterar ou remover impedimentos estruturais de modo a elevar o rendimento da etapa de hidrólise enzimática. A biomassa vegetal, na forma como é encontrada na natureza, limita o acesso das enzimas devido a sua estrutura recalcitrante. Dessa forma, o pré-tratamento é uma etapa indispensável para tornar a biomassa mais acessível, desestruturando a lignina e a hemicelulose e aumentando o acesso das enzimas ao polímero de celulose (MOSIER *et al.*, 2005; ZHU *et al.*,

2008). O processo de pré-tratamento age desintegrando a celulose, hemicelulose e lignina, de forma a converter esses polímeros em fragmentos menores (Figura 1), de mais fácil acesso às enzimas (SHARMA; XU; QIN, 2019). Este processo deve aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, evitar a degradação dos carboidratos e a formação de compostos inibidores e ser economicamente viável (SUN; CHENG, 2002).

Figura 1 – Biomassa lignocelulósica sujeita ao pré-tratamento



Fonte: Adaptado de Sharma *et al.*, 2019.

Durante os processos de pré-tratamento são gerados diversos tipos de compostos que podem atuar como inibidores das enzimas na hidrólise e de leveduras na fermentação alcoólica. Os tipos e a concentração desses inibidores dependem da composição da biomassa e das condições de operação de cada tipo de pré-tratamento. Dentre estes inibidores estão os compostos fenólicos, gerados a partir da degradação da lignina, e os furanos, produtos de degradação dos açúcares (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009; MES-HARTREE; SADDLER, 1983; MOSIER *et al.* 2005; PASMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). Vários tipos de pré-tratamento vêm sendo propostos e estudados pela literatura a fim de separar e aproveitar estes materiais lignocelulósicos, incluindo processos físicos, químicos, biológicos, mecânicos ou a combinação destes (ALVIRA *et al.*, 2010).

Dentre eles, os pré-tratamentos hidrotérmicos são os tipos mais comumente utilizados nos processos de conversão da biomassa e estão sendo amplamente estudados (ALVIRA *et al.*, 2010; NITSOS *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2016; ZHUANG *et al.*, 2016). Estes métodos utilizam água a alta pressão e alta temperatura para causar a solubilização da hemicelulose, tornando a celulose mais acessível às enzimas durante a hidrólise. Quando submetida a altas pressões e temperaturas, a água aumenta seu grau de ionização e os íons hidroxila gerados atuam como catalisadores da hidrólise da hemicelulose. As principais variáveis que interferem na eficiência dos processos de pré-tratamento hidrotérmico são o tempo de retenção e a temperatura do processo (OVEREND; CHORNET, 1987; GUILHERME, 2014; SOUZA, 2016).

Dentre as principais vantagens do pré-tratamento hidrotérmico está o fato do processo não utilizar reagentes químicos, que é importante no ponto de vista ambiental e econômico; não necessitar de reatores resistentes a corrosão para o processo; ocorrer a hidrólise de grande parte da hemicelulose presente no material; além de ter uma menor produção de compostos inibidores dos processos enzimáticos e fermentativos quando comparados a outros processos (ALVIRA *et al.*, 2010; GUILHERME, 2014; SOUZA, 2016). Eles podem ser classificados como pré-tratamento a vapor e aquoso:

- Explosão a vapor: é o pré-tratamento físico-químico mais empregado para biomassa lignocelulósica. A biomassa é sujeita a um vapor a alta pressão por um período de tempo que pode variar de segundos até minutos, e depois é despressurizada. Esse tratamento combina forças mecânicas e efeito químicos devido a autohidrólise de grupos acetil presentes na hemicelulose. Com a hidrólise e solubilização da hemicelulose, a lignina é redistribuída e parcialmente removida do material. A remoção da hemicelulose expõe a superfície da celulose, aumentando a acessibilidade das enzimas à mesma. A principal desvantagem deste método é que a degradação parcial da hemicelulose gera compostos que podem inibir as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação (OLIVA *et al.* , 2003; PAN *et al.* , 2005; ALVIRA *et al.* , 2010).
- Água líquida quente (LHW): alta pressão é aplicada para manter a água em estado líquido a altas temperaturas (160-240 °C) e provocar alterações na estrutura da biomassa lignocelulósica. O objetivo deste tratamento é solubilizar grande parte da hemicelulose, tornar a celulose mais acessível e evitar a formação de inibidores. Após o tratamento é obtida uma fração sólida rica em celulose e uma fração líquida rica em açúcares derivados da hemicelulose. Para evitar a formação de compostos inibidores, o pH do processo deve ser mantido entre 4 e 7 (MOSIER *et al.* , 2005).

### **2.1.2. Inibidores gerados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos**

Os compostos gerados na etapa de pré-tratamento da biomassa podem ser divididos em quatro grupos principais: produtos de degradação do açúcar, produtos de degradação da lignina, compostos derivados da estrutura de lignocelulose e íons de metais pesados.

Os produtos de degradação do açúcar são formados, principalmente, de furanos, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) (MES-HARTREE; SADDLER, 1983). Entre os compostos provenientes da degradação da lignina estão aromáticos e aromáticos policíclicos com uma grande variedade de constituintes, que são considerados mais tóxicos que os anteriores para as enzimas da etapa de hidrólise, mesmo em baixas concentrações (MICHELIN *et al.* ,

2016; ZHAI, HU, SADDLER, 2016). Durante a etapa de pré-tratamento também são liberados compostos derivados de extrativos e ácido acético derivado do grupo acetil presente na hemicelulose. Já os íons de metais pesados podem originar se a partir da corrosão dos equipamentos de hidrólise e também podem inibir a ação das enzimas (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

No pré-tratamento hidrotérmico, a hidrólise das ligações mais termolábeis da lignina é favorecida, o que leva à formação de novas ligações e à fragmentação de partes da lignina, liberando os compostos fenólicos (TANAHASHI, 1990). Os compostos fenólicos consistem de um anel aromático, que possuem ligação com grupos do tipo hidroxila, carboxila, metoxila e outras estruturas cíclicas não aromáticas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). O tipo de composto fenólico e a concentração dos fenólicos totais podem variar com o tipo de biomassa e o tipo de pré-tratamento, bem como da carga de sólidos utilizada no pré-tratamento e na hidrólise enzimática

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam a inibição dos compostos fenólicos sobre as enzimas utilizadas na conversão da biomassa vegetal. Ximenes *et al.* (2010) caracterizaram a inibição de enzimas por fenólicos e oligossacarídeos liberados durante o pré-tratamento hidrotérmico e a hidrólise do resíduo da produção de etanol de milho, e constataram que a vanilina foi o maior inibidor das enzimas estudadas. Tejirian e Xu (2011) utilizaram uma série de compostos fenólicos simples e oligoméricos, a fim de representar os compostos de lignina ou seus produtos de degradação na inibição enzimática, e verificaram que compostos oligoméricos, como o ácido tânico, apresentaram maior efeito inibitório. Kim *et al.* (2011) identificaram os principais inibidores solúveis gerados durante o pré-tratamento hidrotérmico (LHW) de madeira de conífera, que foram o ácido acético, HMF, furfural, e compostos fenólicos. Seus estudos verificaram que uma forma destes compostos afetarem o rendimento da hidrólise enzimática é precipitando as enzimas utilizadas durante a reação de hidrólise.

Tendo em vista que estes compostos inibidores alteram significativamente o desempenho das enzimas na hidrólise, mesmo em baixas concentrações, se fazem necessários métodos para a sua remoção, de modo a aumentar o rendimento geral do processo de conversão da biomassa vegetal em biorrefinarias. Porém, para a aplicação desses métodos ser viável, eles devem ser eficientes e não gerar altos custos adicionais ao processo.

## **2.2. Métodos para remoção dos compostos inibidores**

O processo de adsorção é um dos métodos de separação mais eficientes e mais comumente utilizados para remover compostos indesejados de soluções aquosas (DELGADO

*et al.*, 2019; DING *et al.*, 2018; MARTÍN *et al.*, 2018). O processo em si consiste no acúmulo de partículas (adsorbato) presentes em um meio líquido, na superfície do adsorvente. O fenômeno que ocorre na superfície é controlado por interações complexas entre os três componentes envolvidos: o adsorvente, o adsorbato e o solvente. A afinidade entre o adsorbato e o solvente também exerce influência na adsorção, embora o processo seja controlado principalmente pela interação entre o adsorvente e o adsorbato (FURUYA *et al.*, 1997).

A adsorção pode ter um caráter químico, físico ou de troca iônica. A adsorção química, ou quimissorção, envolve a reação entre o adsorbato e o adsorvente resultando em uma mudança na configuração química do adsorbato. Esta interação pode ser irreversível. Em alguns casos, a interação pode ocorrer entre moléculas do adsorbato e grupos funcionais presentes na superfície do adsorvente, o que não resulta em transformações do adsorbato. A fissionorção resulta da ação de forças de Van der Waals, que são compostas de forças de dispersão de London e forças eletrostáticas clássicas, sendo, em geral, um fenômeno com baixo grau de especificidade. A troca iônica envolve forças eletrostáticas de ligação de espécies iônicas para os locais de carga oposta à superfície de um adsorvente, com deslocamento subsequente destas espécies por outro adsorbato iônico de grande afinidade eletrostática (BANSAL; GOYAL, 2005; SLEJKO, 1985).

Há uma extensa variedade de materiais que podem ser aplicados como adsorventes, como: carvões ativados, zeólitas, resinas de troca iônica, alumina, sílica gel, entre outros. Dentre eles, um dos mais utilizados, devido a sua alta eficiência e afinidade com uma grande variedade de compostos, é o carvão ativado. Este material possui um alto grau de porosidade e extensa área de superfície, características que geralmente influenciam e favorecem a capacidade de adsorção (BANSAL; GOYAL, 2005; LIN; JUANG, 2009). Embora apresente grandes vantagens em relação à adsorção, possui desvantagens de alto custo de fabricação e regeneração.

O interesse em pesquisas para a produção de adsorventes alternativos vem se fortalecendo nos últimos anos, em especial, estudos sobre adsorventes de baixo custo e que possuam boa capacidade de adsorção e remoção de compostos indesejados. Materiais como bagaço de cana, lama vermelha, argila, ou determinados resíduos de operações industriais, tais como cinzas, carvão e resíduos da indústria agrícola são classificados como adsorventes de baixo custo (LIN; JUANG, 2009; FREITAS; FARINAS, 2017). Além disso, alguns trabalhos da literatura tem reportado a viabilidade do uso de biomassa microbiana como bioadsorvente em processos de adsorção para remoção de compostos indesejados de soluções aquosas, tais como efluentes industriais contendo metais pesados, corantes e compostos fenólicos (BANO *et*

al., 2018; BORIOVÁ *et al.*, 2019; JAVANBAKHT; ALAVI; ZILOUEI, 2014; MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; REN *et al.*, 2018; SHROFF; VAIDYA, 2012). Assim, o processo em que se usa materiais biológicos como adsorventes é chamado de bioadsorção; um processo físico-químico definido como a remoção de substâncias de uma solução por um material biológico (GADD, 2009). Diversos estudos relatam a eficiência do uso da biomassa microbiana como bioadsorvente para remoção de substâncias indesejadas de soluções aquosas. Alguns estudos também avaliam o efeito de pré-tratamentos realizados na biomassa de modo a aumentar sua capacidade de adsorção dos compostos estudados.

Kapoor e Viraraghavan (1998) realizaram experimentos com biomassa microbiana de *Aspergillus niger* não tratada e pré-tratada para determinar a eficiência da biomassa para remoção de chumbo, cádmio, cobre e níquel. Eles observaram que a biomassa possui uma boa eficiência como bioadsorvente, e que o pré-tratamento aumenta a capacidade de adsorção. Mas a magnitude do aumento depende do tipo e do método do pré-tratamento. Os experimentos realizados com biomassa tratada com hidróxido de sódio, detergente e formaldeído apresentaram resultados de remoção dos metais bem melhores em comparação com os experimentos com biomassa não tratada.

Rao e Viraraghavan (2002) conduziram estudos sobre a bioadsorção de fenol de uma solução aquosa por biomassa de *A. niger*. Cinco tipos de biomassa inviabilizadas pré-tratadas foram utilizadas como bioadsorventes para a remoção do fenol, sendo que a tratada com ácido sulfúrico apresentou-se como a mais eficiente. A dessorção do fenol usando água deionizada foi de aproximadamente 5%, sugerindo uma boa bioadsorção do composto pela biomassa.

Mathialagan e Viraraghavan (2009) estudaram a adsorção de pentaclorofenol (PCP) em solução aquosa utilizando biomassa inviabilizada de *Aspergillus niger* como bioadsorvente. Eles trataram a biomassa com vários compostos químicos para obter diferentes biomassas quimicamente condicionadas e estudaram sua eficiência na remoção de PCP de solução aquosa. A adsorção não mostrou dependência com a variação de pH mas observou-se uma diminuição na quantidade de PCP adsorvido com o aumento da temperatura. A biomassa tratada com CTAB (cetiltrimetil brometo de amônia), um surfactante catiônico, foi a que apresentou melhor capacidade de adsorção do composto, com uma remoção de 100%. O pré-tratamento da biomassa com CTAB deixou sua superfície mais positiva, aumentando a atração das moléculas de PCP pelo bioadsorvente.

Javaid e colaboradores (2011) avaliaram o potencial da biomassa quimicamente pré-tratada de *A. niger* para remover íons de Cu(II) e Ni(II) em fase aquosa. Eles trataram a biomassa com soluções básicas, ácidas e de sais, e observaram que os melhores resultados

foram com as biomassas tratadas com soluções alcalinas. Também avaliaram a influência da concentração da solução do pré-tratamento na capacidade de adsorção, e perceberam que o aumento na concentração não produz um efeito significativo na remoção dos compostos.

Em estudo sobre a remoção de resíduos de corante de águas residuais da indústria têxtil, Khalaf (2008) analisou a viabilidade da aplicação de biomassa inviabilizada de fungo e alga como bioadsorventes no processo. Ele observou que ambas as biomassas possuem alta eficiência de adsorção dos compostos estudados, e ainda observou que elas podem ser utilizadas repetidas vezes.

Shroff e Vaidya (2012) estudaram o efeito de diferentes pré-tratamentos na biomassa inviabilizada de *Rhizopus arrhizus* para a adsorção de íons Cr (VI). Os tratamentos foram realizados com soluções ácidas e básicas, sendo que a melhor capacidade de adsorção foi observada para a biomassa tratada com ácido nítrico. Também foi observado que os tratamentos físico-químicos realizados na biomassa promovem um pequeno aumento em sua área superficial, o que pode estar favorecendo a adsorção.

Ding e colaboradores (2019) prepararam microesferas de *A. niger* imobilizadas com alginato de sódio para serem utilizadas como bioadsorventes para remoção de íons Th de águas residuais radioativas e obtiveram uma alta capacidade de adsorção de 303,95 mg/g, e mesmo após seis ciclos de utilização, a eficiência de adsorção se manteve em mais de 80%.

No contexto das biorrefinarias, o processo de adsorção se aplica para a remoção dos inibidores gerados na etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal. Dentre estes compostos inibidores estão diversos compostos fenólicos gerados a partir da degradação da lignina. Assim, estudos de adsorventes alternativos e de baixo custo que consigam remover estes compostos fenólicos é de grande interesse, motivando o estudo sobre a viabilidade de aplicação da biomassa microbiana de *A. niger* como um bioadsorvente. Vale destacar ainda que essa biomassa microbiana poderá ser obtida dentro do contexto das biorrefinarias, como biomassa residual dos processos de produção de enzimas e/ou ácidos orgânicos.

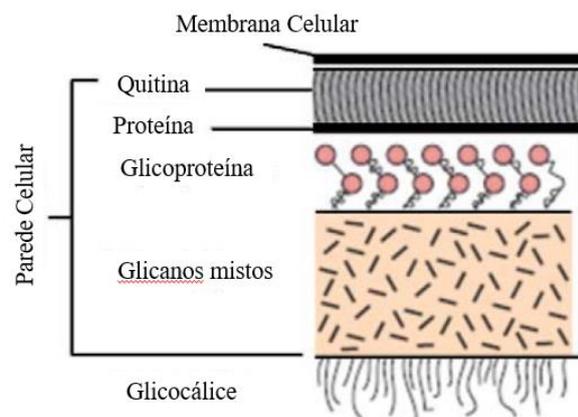
### **2.3. Composição da biomassa microbiana**

Alguns detalhes dos mecanismos de bioadsorção ainda são desconhecidos, mas certamente eles envolvem processos independentes do metabolismo dos microrganismos, os quais acontecem em sua parede celular. Assim, a composição da parede celular desempenha um importante papel na escolha dos potenciais microrganismos a serem explorados para aplicação como bioadsorventes (GADD, 2009).

A parede celular de fungos é uma estrutura macromolecular complexa que consiste, sobretudo, de polissacarídeos e proteínas em várias proporções, ligados entre si por ligações covalentes e não covalentes. A composição da parede celular é característica de cada gênero, mas pode variar de acordo com as condições ambientais e da fase de crescimento. Dentre os polissacarídeos presentes, tem-se a quitina e/ou quitosana, os glucanos e mananos. A quitina é um constituinte importante da parede celular dos fungos e pode ser encontrada em uma proporção de 10 a 20 % em fungos filamentosos (FUKUDA *et al.*, 2009). Essa variedade de componentes estruturais garantem a presença de diferentes grupos funcionais, como grupos amino e hidroxila, que são capazes de se ligar a vários tipos de moléculas, estando, assim, envolvidos na bioadsorção de corantes, metais pesados e compostos fenólicos (CRINI; BADOT, 2008; FARKAS, 2003).

A Figura 2 apresenta a estrutura geral da parede celular de fungos, estrutura rígida, composta de camadas complexas de polissacarídeos e proteínas, sendo que 80 a 90 % da parede celular dos fungos é composta de polissacarídeos. Podem ser observadas duas camadas na estrutura da parede celular (Figura 2): uma fina camada externa consistente de glicanos mistos (como glucanos, mananos e galactanos), e uma camada interna microfibrilar grossa de fibras de polissacarídeos compostos de cadeias de quitina (WANG; CHEN, 2009).

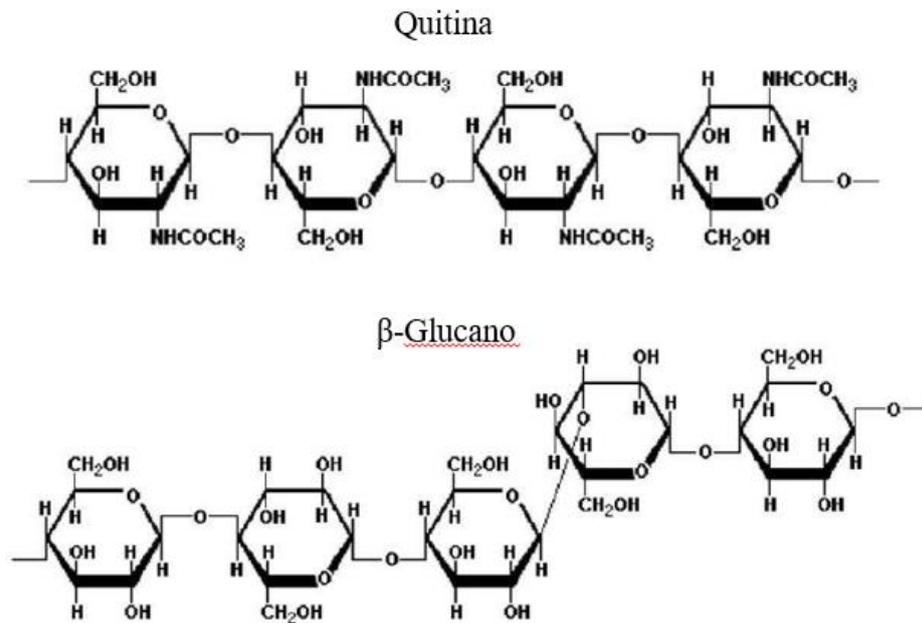
Figura 2 – Esquema da estrutura geral da parede celular de fungos.



Fonte: Adaptado de Talaro e Talaro (2002).

A estrutura química da quitina e glucano é mostrada na Figura 3. Os grupos funcionais presentes em suas estruturas desempenham papéis importantes no processo de bioadsorção utilizando a biomassa de fungo como adsorvente.

Figura 3 – Estrutura química da quitina e glucano.



Fonte: Wang e Chen, 2009.

A grande diversidade de espécies e as diferenças na composição química da parede celular dos fungos faz com que eles possam ser aplicados em processos de bioadsorção de ambos contaminantes catiônicos e aniônicos. Por essas razões, a biomassa de fungo vem ganhando destaque em estudos sobre diferentes tipos de bioadsorventes (TIGINI *et al.*, 2012; CRINI; BADOT, 2008; FARKAS, 2003).

### 2.3.1. Interações envolvidas na adsorção por biomassa fúngica

A biomassa de fungo viabilizada, ou invializada, podem ser usadas em processos de adsorção devido, principalmente, à composição única de sua parede celular (GÁPLOVSKÁ *et al.*, 2018). Materiais biológicos possuem estruturas complexas e uma variedade de mecanismos podem estar envolvidos no processo de adsorção, dadas determinadas condições. A variedade de componentes estruturais presentes na biomassa faz com que muitos grupos funcionais possam interagir com diferentes tipos de compostos, desempenhando um papel importante em sua capacidade de adsorção (GADD, 2009).

Kapoor e Viraraghavan (1997) conduziram estudos sobre os sítios de ligação de metais pesados existentes na biomassa de *Aspergillus niger*. Eles modificaram os grupos funcionais presentes na superfície da biomassa de modo a avaliar a influência de cada um na capacidade de adsorção dos metais. Seus resultados sugeriram que ambos os grupos carboxila e amina desempenham um papel importante na bioadsorção de metais pesados, enquanto que os grupos

fosfatos e a fração lipídica exercem pouca influência. Grupos amina em quitina e quitosana são importantes para a quelação de íons metálicos. Entretanto, o comportamento da adsorção ainda depende do íon em questão e da espécie de fungo utilizado.

Em estudo sobre os sítios de bioadsorção da biomassa de *A. niger* para quatro diferentes tipos de corante, Fu e Viraraghavan (2002) modificaram os grupos carboxila, amina e fosfato e também extraíram a fração lipídica da biomassa. Eles observaram que os mecanismos de adsorção para os corantes em biomassa de *A. niger* são dependentes da estrutura química e dos grupos funcionais presentes em cada tipo de corante. Os diferentes grupos funcionais modificados na biomassa fúngica desempenharam papéis diferentes na bioadsorção dos diferentes corantes.

Mathialagan e Viraraghavan (2009) estudaram o papel dos grupos funcionais da superfície, lipídios e da carga da superfície na bioadsorção de pentaclorofenol (PCP). Eles modificaram os grupos carboxila, amina e fosfato, e extraíram as frações lipídicas da biomassa, o que resulta no bloqueio desses grupos e lipídios em fazer parte da bioadsorção. Os resultados sugeriram que os grupos carboxila desempenham um papel na adsorção de PCP, mas os grupos amino e fosfato e as frações lipídicas podem não ter parte na adsorção. Concluíram que grupos amidas e hidroxilas podem ter contribuído para a adsorção de PCP.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi estudar a utilização da biomassa microbiana de *Aspergillus niger* como bioadsorvente para remoção de compostos fenólicos inibidores gerados no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em biorrefinarias. De modo a atingir este objetivo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

1. Realizar o cultivo do fungo *Aspergillus niger* para obter a biomassa microbiana, utilizando glicose e glicerol como fonte de carbono;
2. Realizar pré-tratamentos físico-químicos na biomassa microbiana para aplicação como bioadsorvente;
3. Caracterizar os adsorventes obtidos em termos da área superficial, morfologia da superfície, grupos funcionais da superfície, carga superficial, cristalinidade e estabilidade térmica;
4. Avaliar a adsorção de compostos fenólicos sintéticos (vanilina e ácido tânico) em diferentes condições de pH, temperatura e carga de adsorvente;
5. Avaliar a adsorção dos inibidores fenólicos de amostras reais (licor/fração líquida) provenientes do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições;
6. Determinar a cinética de adsorção de vanilina, ácido tânico e fenólicos totais do licor para os adsorventes que apresentaram melhores resultados;
7. Determinar as isotermas de adsorção para a vanilina e ácido tânico com os adsorventes que apresentarem melhores resultados.
8. Realizar ensaios de hidrólise enzimática de fonte de celulose com o licor tratado e o licor não tratado pelos bioadsorventes.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção da biomassa microbiana como bioadsorvente**

#### **4.1.1. Microrganismo**

A linhagem de fungo filamentosos *Aspergillus niger* C (BRMCTAA 82) foi obtida da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Foi feito um estoque deste fungo para uso ao longo de todo o desenvolvimento do projeto. Todo o material utilizado para a obtenção da biomassa foi previamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121°C e 124 kPa, e o procedimento experimental foi conduzido em meio estéril em capela de fluxo laminar.

Para a solução de estoque foi feita a ativação dos esporos de *A. niger*, mantidos a -18°C, por incubação em placa petri contendo meio batata ágar dextrose (PDA) 39 g/L, por 96 h a 30°C. Após os 4 dias, fez-se a raspagem dos esporos com solução de glicerol (30%) e NaCl (0,9%), colocou-se aproximadamente 1 mL da solução contendo os esporos em microtubos do tipo eppendorf de 1,5 mL, que foram mantidos em congelador a -18°C para uso futuro.

Para o cultivo do fungo por fermentação submersa, foi feita inicialmente a ativação dos esporos em estoque por incubação em placa petri contendo PDA 39 g/L, por 96 h a 30°C. Os esporos foram coletados das placas utilizando-se uma solução 1% de *Tween 80* (Polissorbato 80%) e filtrados com auxílio de uma gaze. A concentração de esporos da solução foi determinada através da câmara de Neubauer utilizando microscópio (AAKER, Brasil).

#### **4.1.2. Fermentação Submersa (FSm)**

O meio de cultivo empregado na FSm foi baseado e adaptado do meio proposto por Rao e Viraraghavan (2002), e tem a seguinte composição (Tabela 1). Também foi avaliada a substituição de glicose por glicerol como fonte de carbono, por ser um componente de menor custo de obtenção, visto que é um subproduto abundante do processo de produção do biodiesel e co-produto das biorrefinarias integradas, e ainda que a glicerina possua larga utilização como matéria-prima em diversos ramos da indústria, sua oferta ainda é bastante superior à sua demanda (MONTEIRO *et al.*, 2018). Assim, também foram realizados cultivos utilizando glicerina 20 g/L no lugar da dextrose.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Dextrose anidra	20
Peptona de soja	10
Extrato de levedura	3

A FSm foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, a partir da adição de um volume de suspensão de esporos de concentração  $1,2 \times 10^7$  esporos/mL de meio de cultivo (KLAIC *et al.*, 2017). A incubação foi realizada por 5 dias em Incubadora Shaker Innova 42 (New Brunswick), que possui agitação orbital, a 30°C e 220 rpm, sob condições aeróbicas. Após este período, o material resultante foi filtrado a vácuo utilizando papel de filtro e lavado com abundante água deionizada para retirar resquícios do meio de cultivo ainda aderidos à superfície da biomassa.

Os cultivos estão sendo realizados durante todo o desenvolvimento do projeto à medida em que há a demanda de biomassa para produção dos bioadsorventes.

#### **4.1.3. Preparação dos bioadsorventes**

Foram escolhidos três tipos de tratamentos físico-químicos para serem feitos na biomassa com base na metodologia utilizada por Rao e Viraraghavan (2002), afim de avaliar a mudança na capacidade de adsorção dos compostos fenólicos pela biomassa fúngica. A biomassa lavada foi tratada em três modos diferentes:

- Autoclavada por 30 minutos a 121°C e 124 kPa;
- Imersa em solução 0,1 M de Ácido Sulfúrico por 1 hora, lavada novamente com abundante água deionizada e então autoclavada por 30 minutos a 121°C e 124 kPa;
- Imersa em solução 0,1 M de Hidróxido de Sódio por 1 hora, lavada novamente com abundante água deionizada e então autoclavada por 30 minutos a 121°C e 124 kPa.

As biomassas obtidas após os tratamentos foram espalhadas em placas petri para secagem em estufa a 60°C por 36 h. Após a secagem, as biomassas foram moídas por 3 minutos em moinho do tipo almofariz RM 200, marca Retsch e passadas em peneira com abertura de 300 µm para posteriormente serem usadas como bioadsorventes.

## **4.2. Caracterização dos bioadsorventes**

### **4.2.1. Área superficial e volume de poros**

Utilizou-se para a análise cerca de 1 g de cada amostra. As amostras foram secas a 45 °C e mantidas sobre vácuo (10  $\mu$ mHg) overnight (10 horas aproximadamente) a fim de livrar a superfície das amostras de alguma impureza fisicamente adsorvida. Foi utilizado um porosímetro modelo ASAP 2020 (Micromeritics USA) empregando-se a técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77 K para a determinação da área superficial e distribuição de poros dos adsorventes. A área superficial foi calculada pela equação de Brunauer, Emmett y Teller (BET) e o volume de poros pelo método t-plot.

### **4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

De modo a analisar a diferença na morfologia da superfície de todos os tipos de adsorvente, foram obtidas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando o equipamento JEOL modelo JSM-6510/GS. As amostras foram dispostas em uma ponta de aço inoxidável com fita adesiva dupla face, em seguida recobertas com uma fina camada de ouro sob vácuo para aumentar a condução eletrônica e melhorar a qualidade das imagens.

### **4.2.3. Potencial Zeta**

Para a determinação do potencial zeta, 25 mg de cada amostra foram adicionados a 25 mL de água deionizada e foram dispersos com o auxílio de um ultrassom de alta potência (Ultrassom de Ponteira Branson). O pH do meio variou de 2 a 10, sendo as soluções ajustadas com NaOH ou HCl. O potencial das soluções de suspensão foram medidos em mV através do equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Mavern Instruments.

### **4.2.4. FTIR**

Os grupos funcionais presentes nos adsorventes foram determinados através de Análise por infravermelho de Reflectância Total Atenuada (ATR). Análises de infravermelho foram realizadas através da técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando-se Espectrômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier (FTIR), modelo Vertex 70, marca Bruker (Alemanha). O acessório ATR possui um cristal de diamante e foram tomados 32 espectros com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  de cada amostra, na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.2.5. Análise Termogravimétrica**

As medidas foram realizadas em equipamento da TA Instruments, modelo TGA Q500, em um intervalo de temperatura de 25 a 700 °C, com uma taxa de 10 °C/min. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (vazão 60 mL/min).

#### **4.2.6. Difração de raios X (DRX)**

A cristalinidade dos adsorventes foi determinada pelo método de difração de raios X (DRX), utilizando um difratômetro da Shimadzu XRD 6000 (Japão). A intensidade foi gravada em uma escala de difração ( $2\theta$ ) °5-100. A velocidade de varredura foi de  $1^\circ \text{ min}^{-1}$ , com tensão e corrente do tubo de raios X de 30 kV e 30 mA, respectivamente.

#### **4.2.7. Análise Elementar**

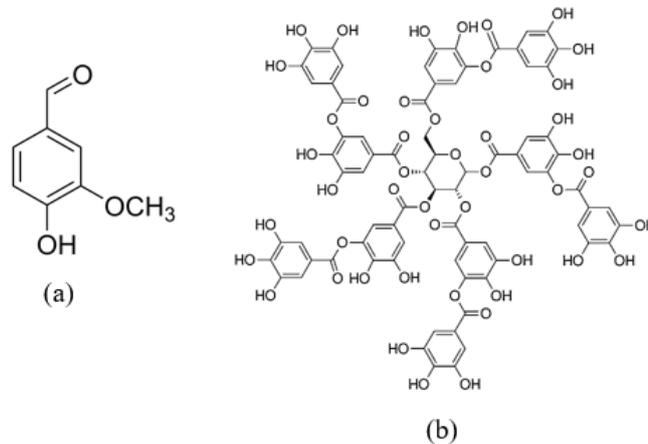
A análise elementar dos bioadsorventes foi realizada em Analisador Elementar, modelo CHN 2400 da marca Perkin Elmer. O padrão utilizado para calibração foi Acetanilida P. A. (C = 71,09%, H = 6,71%, N = 10,36%).

### **4.3. Procedimento experimental de adsorção**

#### **4.3.1. Adsorção de amostras sintéticas**

Estudos sobre a inibição de enzimas por compostos fenólicos relatam que a vanilina está entre os principais inibidores de enzimas celulolíticas (MALGAS *et al.* , 2016; XIMENES *et al.* , 2010; QIN *et al.* , 2016) e Ximenes *et al.* (2011) relataram o ácido tânico como o maior inibidor para todas as atividades enzimáticas analisadas. Assim, a vanilina, por ser um composto monomérico, e o ácido tânico, um composto oligomérico, foram escolhidos para o estudo da adsorção das soluções sintéticas, a fim de se ter um conhecimento prévio da adsorção de dois dos principais inibidores de enzimas, e que estão entre os inibidores gerados no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, pelos bioadsorventes estudados. As estruturas químicas da vanilina e do ácido tânico estão apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Estrutura química da vanilina (a) e ácido tânico (b).



A concentração estabelecida para os ensaios com essas amostras sintéticas foi de 3 g/L, que está na faixa de concentração média encontrada de compostos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento de diferentes biomassas (XIMENES *et al.*, 2011).

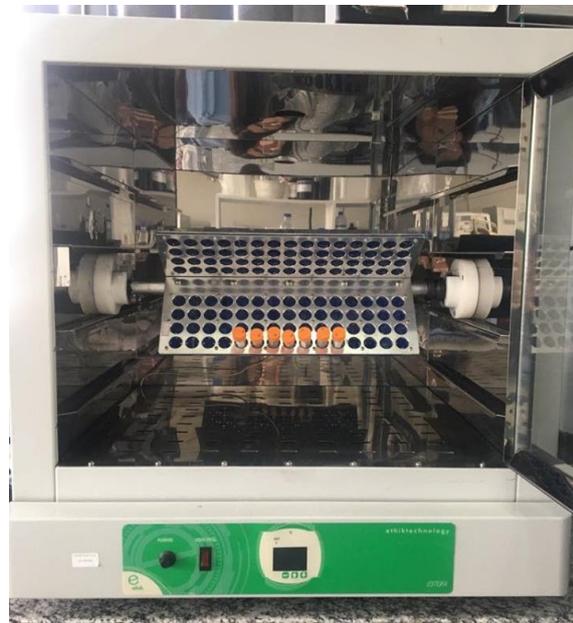
Primeiramente, foram realizados testes preliminares variando a carga de adsorvente em 1, 3, 5 e 8% (m/v), em pH 3 (pH próximo ao do licor do pré-tratamento do bagaço de cana) e 30 °C, para os seis adsorventes produzidos. Também foram realizados ensaios com carvão ativado comercial para efeito comparativo. Avaliou-se também os efeitos do pH da solução e da temperatura de adsorção para os adsorventes que apresentaram melhores resultados, com uma carga de adsorvente preestabelecida. O pH variou de 2 a 6 em 30 °C e as temperaturas de adsorção de 30 a 50 °C em pH 5, para 3% de adsorvente. Uma vez que as condições de hidrólise enzimática são pH 5 e 50 °C, foram estabelecidas as condições máximas de pH e temperatura avaliados nos experimentos, até 6 para o pH da solução e 50 °C para a temperatura de adsorção.

Após os primeiros testes preliminares com vanilina e ácido tânico, optou-se por realizar testes com outros compostos fenólicos que também podem ser gerados a partir da degradação da lignina durante o pré-tratamento do bagaço de cana. Estes compostos foram o catecol, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido p-coumárico. Os testes foram realizados com uma concentração menor do que a utilizada para vanilina e ácido tânico, para se ter um conhecimento prévio da capacidade de adsorção desses compostos pelos bioadsorventes. Foi utilizada a concentração de 1 g/L destes compostos, 3% de carga de adsorvente, em pH 3 e 30° C.

Todos os experimentos de adsorção, tanto para as amostras sintéticas quanto para o licor do pré-tratamento (item 4.3.2), foram realizados em batelada em tubos de 5 mL, por 24h. Utilizou-se 2 mL da solução a ser adsorvida e a massa de adsorvente correspondente a carga a

ser estudada. Foi utilizada estufa da marca Ethik Technology (Figura 5), a qual protege contra a entrada de luz para evitar a fotodegradação dos compostos e possui um eixo na posição horizontal que permite a acomodação das amostras em movimento rotatório de 360°, promovendo, assim, a mistura das soluções durante todo o processo. A rotação utilizada nos experimentos foi de 30 rpm. Após cada ensaio de adsorção, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi separado da fração sólida para a posterior determinação da concentração final do processo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. No início de cada experimento, foi determinada a concentração inicial real de cada solução pelo método descrito no item 4.3.5.

Figura 5 – Estufa utilizada nos experimentos de adsorção.



#### **4.3.2. Adsorção da fração líquida do pré-tratamento do bagaço**

O licor do pré-tratamento utilizado neste trabalho foi disponibilizado pelo LNBR/CNPEM. O bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C por 10 minutos, em uma proporção de 1:10 (m/v). A fração líquida proveniente do tratamento foi mantida em congelador a -18 °C para uso ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Foram realizados testes com a fração líquida e todos os bioadsorventes com pH original do licor, carga de adsorvente variando em 1, 3 e 5%, a 30 °C e 30 rpm, a fim de avaliar se os diferentes tratamentos da biomassa microbiana e a diferença na fonte de carbono do cultivo do fungo influenciavam na capacidade de adsorção dos fenólicos totais presentes no licor. Com os adsorventes que apresentaram os melhores resultados, foram feitos testes com carga de 5%

variando a temperatura entre 30 e 50 °C, com pH original do licor (próximo de 3) e pH ajustado para 5, de modo a verificar o efeito do pH e da temperatura na adsorção. Os testes foram realizados em batelada por 24 h e após isso as amostras foram centrifugadas para a determinação da concentração de fenólicos totais presente no sobrenadante pelo método descrito no item 4.3.5.

### 4.3.3. Cinética de adsorção

Para o adsorvente que mostrou a melhor capacidade de remoção dos compostos, foram obtidas curvas de cinética de adsorção para as amostras sintéticas de vanilina e ácido tânico com uma concentração inicial de 3 g/L, realizadas com 5% de carga de adsorvente, em pH 5 e 30 °C. Para estes ensaios de adsorção também foi utilizado o carvão ativado comercial como adsorvente, a fim de ter um comparativo da capacidade atingida pelo bioadsorvente em relação a um adsorvente comercial.

Vários tubos contendo a mesma massa de adsorvente e o mesmo volume da solução estudada, foram colocados na estufa com rotação a 30 rpm e retirados em intervalos de tempo diferentes. A concentração na fase sólida, isto é, a capacidade de adsorção ( $q$ ) foi obtida a partir do balanço de massa (Equação 5) para cada intervalo de tempo.

$$q = V \cdot \frac{C_0 - C_t}{m} \quad (5)$$

Na Equação 1,  $q$  é a capacidade de adsorção em mg de adsorbato/g de adsorvente.  $C_0$  e  $C_t$  (mg/L) são as concentrações inicial e no tempo  $t$  do adsorbato, respectivamente.  $V$  é o volume da solução (L) e  $m$  a massa do adsorvente (g). As curvas de cinética foram expressas em termos de capacidade de adsorção ( $q$ ) em função do tempo.

Os dados cinéticos foram ajustados a modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem utilizando o software Origin 8.0 e as Equações 6 e 8.

#### 4.3.3.1. Modelo de pseudo-primeira ordem

A Equação 9 é conhecida como equação de Lagergren e se baseia na capacidade de adsorção de sólidos em um meio líquido. Esta equação descreve este modelo e sua forma linearizada é a Equação 10 (AZIZIAN, 2004; ÖNAL, 2010).

$$q = q_e (1 - e^{-k_1 t}) \quad (6)$$

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t \quad (7)$$

Nas Equações 6 e 7,  $k_1$  é a constante cinética de pseudo-primeira ordem em  $\text{min}^{-1}$  e  $q_e$  e  $q_t$  são as capacidades de adsorção do adsorvente no equilíbrio e no tempo  $t$  (min), respectivamente (mg/g).

#### 4.3.3.2. Modelo de pseudo-segunda ordem

A Equação 11 representa o modelo de pseudo-segunda ordem e sua forma linearizada é representada na Equação 12 (HO, 2006).

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (8)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (9)$$

Nas Equações 8 e 9,  $k_2$  é a constante cinética de pseudo-segunda ordem, em  $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ .

#### 4.3.4. Isotermas de adsorção

A isoterma de adsorção é a relação de equilíbrio entre a quantidade de soluto adsorvido e a concentração da fase fluida a uma temperatura constante. As isotermas são utilizadas para representar o estado de equilíbrio de um sistema de adsorção, e podem fornecer diversas informações a respeito do adsorbato, do adsorvente e do processo.

Para a obtenção de uma isoterma são geradas várias concentrações de equilíbrio ( $C_e$ ), quando a relação entre a concentração inicial ( $C_0$ ) e a massa de adsorvente ( $m$ ) é alterada. Os valores da capacidade de adsorção ( $q_e$ ) são obtidos a partir da Equação 1, que representa o balanço de massa do sistema. A representação gráfica dos valores de  $q_e$  em função de  $C_e$  é denominada de isoterma de adsorção (COONEY, 1998).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{m} \quad (1)$$

onde  $V$  é o volume da fase líquida.

Foram obtidas curvas de isotermas de adsorção de ácido tânico, vanilina e dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento utilizando o bioadsorvente que apresentou os melhores resultados. A faixa de concentração utilizada para o ácido tânico no bioadsorvente foi de 0,2 a 8,3 g/L, com acréscimo de 0,5 para cada ponto, e de 0,2 a 6,6 g/L para a vanilina, com acréscimo de 0,8. As condições utilizadas foram pH 5, 30 rpm, 1% (m/v) de bioadsorvente, por 24 h. As temperaturas estudadas foram 30 e 50 °C.

A capacidade de adsorção ( $q$ ) foi calculada a partir do balanço de massa (Equação 1) após o equilíbrio ter sido alcançado. Na equação 1,  $C_0$  e  $C_e$  (g/L) são as concentrações inicial

e de equilíbrio do adsorbato, respectivamente.  $V$  é o volume da solução (L) e  $m$  a massa do adsorvente (g). Os ajustes aos dados experimentais das isotermas obtidas foram feitos a partir dos modelos de Langmuir (Eq. 2), Freundlich (Eq. 3) e Redlich-Peterson (Eq. 4). Para estes ajustes foi utilizado o software Origin 9.0.

- Isoterma de Langmuir

O modelo de Langmuir assume que em um processo de adsorção, quando o equilíbrio é atingido, o fluxo de moléculas que adsorvem no sólido e que deixam a superfície são iguais (COONEY, 1998). Ele se baseia nas hipóteses de que a adsorção ocorre em um número definido de sítios; a adsorção ocorre em monocamada, ou seja, cada sítio pode abrigar somente uma molécula; a energia de adsorção é igual para todos os sítios; e que não existe força de interação entre moléculas adsorvidas adjacentes, porque o número de sítios por unidade de massa é fixo, então a adsorção pode ocorrer até que a condição de equilíbrio seja satisfeita.

Para isotermas sólidos-líquidos a equação é usualmente escrita da seguinte forma (Equação 2):

$$q = \frac{Q \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (2)$$

Onde  $q$  é a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa de adsorvente,  $Q$  é a capacidade limite da adsorção,  $C_e$  é a concentração de soluto na fase líquida residual no equilíbrio e  $K_L$  é a constante da isoterma.

- Isoterma de Freundlich

Geralmente, o modelo de Freundlich represente a maioria dos dados obtidos para fase líquida (COONEY, 1998). Este modelo é consistente com superfícies heterogêneas e distribuição exponencial de energias locais. Em 1926, Freundlich estabeleceu que os dados de equilíbrio de adsorção foram melhores descritos pela Equação 3 (SLEJKO, 1985).

$$q = K_F \cdot C_e^{\frac{1}{n}} \quad (3)$$

Onde  $K_F$  e  $n$  são constantes características e  $C_e$  é a concentração de soluto na fase líquida residual no equilíbrio.

- Isoterma de Redlich-Peterson

Este modelo foi desenvolvido a partir das isotermas de Langmuir e Freundlich e pode ser aplicado à sistemas homogêneos e heterogêneos. A equação 4 representa o modelo de Redlich-Peterson.

$$q = \frac{K \cdot C_e}{1 + a \cdot C_e^b} \quad (4)$$

K, a e b são os parâmetros da isoterma de Redlich-Peterson. O parâmetro b apresenta valores entre 0 e 1. Quando b tende a 0, a isoterma se reduz à forma da isoterma de Freundlich, e quando b tende a 1, a isoterma se reduz à forma de Langmuir.

Para encontrar os melhores modelos de isotermas que representam os dados experimentais foi utilizado o critério de Informação de Akaike corrigido (AICc), que tem sido comumente adotado para a escolha de modelos de isoterma de adsorção. Foi utilizado o AICc ao invés do AIC puro devido ao pequeno tamanho de amostras utilizadas ( $N/p < 40$ ) (BONATE, 2011). O AICc está representado pela Equação 10, em que o menor valor obtido entre diferentes modelos de um mesmo conjunto de dados experimentais corresponde ao melhor que pode ser utilizado para descrevê-los.

$$AICc = N \cdot \ln \left( \sum_{i=1}^N \frac{(Y_i - \hat{Y}_i)^2}{N} \right) + 2p + \frac{2p(p+1)}{N-p-1} \quad (10)$$

Onde, N é o número de observações experimentais,  $Y_i$  é o valor observado,  $\hat{Y}_i$  é o valor predito, p é o número total de parâmetros estimados pelo modelo + 1.

#### 4.3.5. Análise de concentração de compostos fenólicos

A determinação das concentrações de todas as soluções, tanto das soluções de fenólicos monocomponente, quanto dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento, foram realizadas pelo método de redução de fenólicos utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (SIGMA). Em cubetas apropriadas, colocou-se na seguinte ordem: 20  $\mu$ L de amostra (diluída seis vezes) + 1580  $\mu$ L de água destilada + 100  $\mu$ L de Folin-Ciocalteu, homogeneizou-se as soluções, esperou-se 3 minutos e então acrescentou-se 300  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio anidro (20%), homogeneizou-se novamente, e após 25 minutos, realizou-se as leituras. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro Genesys 10 UV Scanning a 765 nm. Foram feitas curvas de calibração para a vanilina e o ácido tânico, e para o licor as concentrações foram determinadas usando o ácido gálico como padrão, e o conteúdo de fenólicos totais do licor foi expresso em g ácido gálico equivalentes por L de solução (g AGE/L) (XU; CHANG, 2009). As curvas de calibração para cada composto estão disponíveis no Apêndice A.

As concentrações finais de cada experimento foram calculadas através das curvas de calibração (Apêndice) para cada composto e a porcentagem de remoção dos compostos foi calculada pela Equação 11.

$$\% \text{ Remoção} = \left( 1 - \frac{C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (11)$$

Na equação  $y$ ,  $C_f$  é a concentração final e  $C_i$  a concentração inicial (g/L) da solução.

#### 4.4. Ensaios de Hidrólise Enzimática

Avaliou-se a inibição da Cellic CTec2 (231 FPU/mL and 85 mg protein/mL; Novozymes Latin America (Araucaria, Brazil)) pelos compostos fenólicos inibidores presentes no licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar através da hidrólise da celulose comercial (Celuflok 200, São Paulo, Brazil) e do bagaço hidrotérmico.

##### 4.4.1. Procedimento Experimental

Após o bagaço de cana-de-açúcar ser tratado com água quente à 195 °C por 10 min (Silva *et al.*, 2011), este foi seco em estufa a 50 °C até chegar à umidade final de 7-10%. Após este procedimento, o bagaço foi moído em moinho de facas, e em seguida, peneirado em peneira com abertura de 0,5 mm. Partículas menores que 0,5 mm foram utilizadas nos ensaios de hidrólise.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram feitos utilizando o bagaço hidrotérmico e a Celuflok como fonte de celulose, variando o meio líquido entre licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço e licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço após o processo de remoção dos inibidores fenólicos pelos bioadsorventes, de modo a avaliar a inibição da enzima pelos compostos fenólicos presentes. O pH do licor tratado e do não tratado foi ajustado para pH 5 para a realização da hidrólise. Os ensaios foram conduzidos a uma temperatura de 50 °C, rotação de 30 rpm, por 24 h. A concentração de enzima Cellic CTec2 utilizada foi de 2 FPU/g de substrato. Ao final de cada experimento, a concentração de glicose e ART foi determinada a partir da metodologia citada nos itens 4.4.2. e 4.4.3., respectivamente.

##### 4.4.2. Análise da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada por meio de uma reação enzimática GOD-POD, utilizando um kit de determinação de glicose Liquiform da marca Labtest. Em tubos de ensaio foram colocados 10 µL de amostra + 1 mL do reagente, e a mistura foi colocada em banho a 37 °C por 10 minutos. O mesmo procedimento foi feito para o padrão de glicose, e a concentração de glicose de cada amostra foi calculada utilizando as equações 12 e 13.

$$\text{Glicose} = \text{Abs teste} \times \text{Fator de calibração} \quad (12)$$

$$\text{Fator de calibração} = \frac{100}{\text{Abs padrão}} \quad (13)$$

As leituras foram feitas em cubetas de 1 mL em espectrofotômetro Genesis 10 UV Scanning a 505 nm e a concentração de glicose é dada em mg/dL.

#### **4.4.3. Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)**

Os açúcares redutores foram medidos em microplacas usando metodologia adaptada de Miller (1959). Foram colocados em cada poço da microplaca de fundo cônico: 100 µL de amostra diluída + 100 µL de DNS. As microplacas foram colocadas em termomixer da Eppendorf para aquecimento por 5 minutos em 100 °C e 300 rpm. Em seguida, foram colocadas na geladeira para o resfriamento por 10 minutos. As amostras foram transferidas para a microplaca de fundo arredondado e as absorbâncias foram medidas em 540 nm. As concentrações foram determinadas a partir da curva de calibração para o DNS apresentada no Apêndice.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Efeito da fonte de carbono no rendimento dos bioadsorventes

O biodiesel é um combustível renovável e tem se mostrado como uma boa alternativa ao petrodiesel na busca por fontes de energia mais limpas. A produção global de biodiesel vem crescendo nos últimos anos. Estima-se que a produção irá crescer em torno de 4,5% anualmente nos próximos anos, chegando a 41 Mm<sup>3</sup> em 2022. Um dos gargalos ainda existentes neste cenário é a grande produção de glicerol como subproduto da produção de biodiesel. Embora o glicerol já seja utilizado em diversos outros ramos da indústria (indústria farmacêutica, de cuidados pessoais, de alimentos, detergentes, entre outras), é importante encontrar novos usos para essa matéria-prima de modo a assegurar a sustentabilidade da produção global de biodiesel (MONTEIRO *et al.*, 2018; ANUAR; ZUHAIRI, 2016).

Glicerol é um composto versátil e renovável, usado, principalmente, na indústria química. Sua ampla variedade de aplicações industriais, aliada à sua grande oferta no mercado, tem incentivado a pesquisa por novas aplicações. Assim, nesta etapa do estudo foi avaliada a utilização de glicerol como fonte de carbono para o cultivo do fungo *Aspergillus niger*, a fim de obter a sua biomassa para a produção de bioadsorventes, material que pode ser obtido com menor custo ou mesmo como subproduto da produção de biodiesel nas próprias biorrefinarias.

Com o objetivo de comparar a produção de biomassa pelo fungo com as duas fontes de carbono, glicose e glicerol, calculou-se o rendimento da produção de bioadsorvente (biomassa seca e moída após os tratamentos) em grama de adsorvente por grama de fonte de carbono. A concentração utilizada para as duas fontes de carbono foi de 20 g/L e o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo cada. Em 100 mL tem-se 2 g de fonte de carbono. Dessa forma, o rendimento foi calculado a partir da biomassa total final obtida após a moagem, dividido pela massa de fonte de carbono utilizada. A Tabela 2 mostra a média com o desvio padrão do rendimento da produção de bioadsorventes a partir de três cultivos de *A. niger*, em g de bioadsorvente por g de fonte de carbono utilizada.

Tabela 2 – Rendimento médio do cultivo de biomassa para produção de adsorventes utilizando glicose e glicerol como fonte de carbono.

Fonte de carbono	Rendimento (g/g)
Glicose	0,34 ± 0,06
Glicerol	0,32 ± 0,05

Os rendimentos dos cultivos para as duas fontes de carbono foram muito próximos, mostrando que o uso do glicerol como fonte de carbono no cultivo do fungo é uma boa opção para a produção de bioadsorventes, reduzindo ainda mais os custos do processo.

Deve-se ter em mente que a biomassa do fungo também pode ser obtida nas próprias biorrefinarias como coproduto do processo de produção de enzimas e/ou ácidos orgânicos, o que não traria custo adicional significativo ao processo (CUNHA *et al.*, 2017; DEZAM *et al.*, 2017; DA SILVA DELABONA *et al.*, 2016; SQUINCA *et al.*, 2018).

## 5.2. Caracterizações

### 5.2.1. Área superficial e volume de poros

A Figura 6 mostra as isotermas de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> dos adsorventes produzidos com glicerol como fonte de carbono e submetido aos tratamentos autoclave, ácido e básico. Há inúmeros tipos de isotermas conhecidos até hoje, porém todas são variações de seis tipos principais classificados pela IUPAC. Estes seis tipos podem ser observados na Figura 7.

Figura 6 – Isotermas de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub> para os adsorventes produzidos com glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.

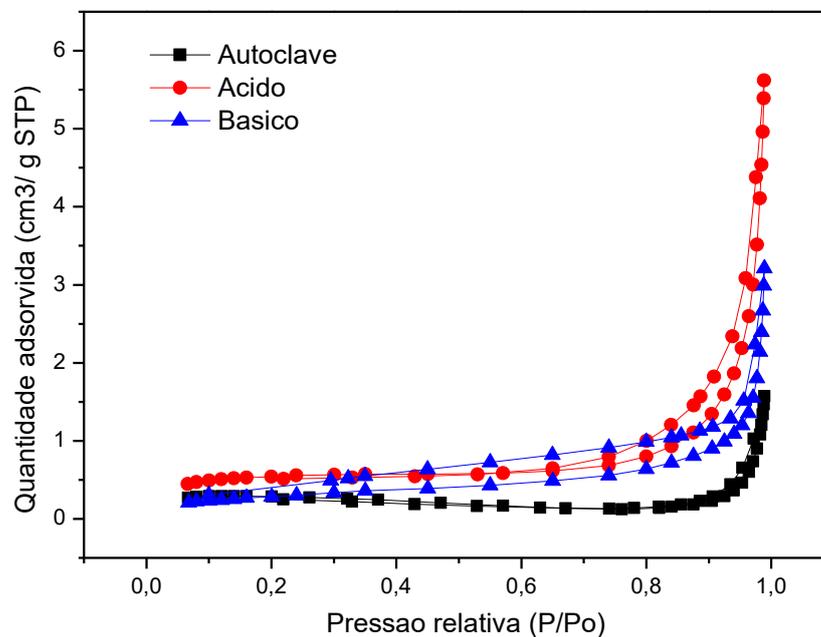
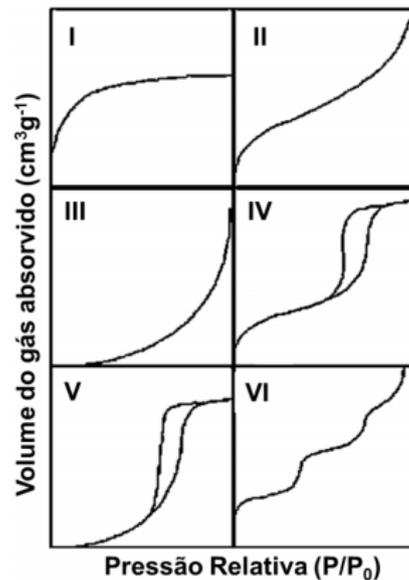


Figura 7 – Tipos de isotermas de acordo com a classificação da IUPAC.



Fonte: Gregg e Sing, 1982.

Os tipos II e III são característicos de materiais onde a adsorção de N<sub>2</sub> acontece em multicamadas, podendo remeter a materiais não porosos, macroporosos ou com mesoporos (GREGG; SING, 1982). As isotermas obtidas para os bioadsorventes (Figura 6) se assemelham a esses tipos, o que sugere a presença de macro e mesoporos e a ausência de microporos nos adsorventes. A presença de macro e mesoporos pode favorecer a adsorção de moléculas maiores, como o ácido tânico. Também pode ser observado que a condensação ocorre em pressões relativas próximas a 1, que sugere a relação aos tipos II e III de isotermas.

A Tabela 3 apresenta os valores de área superficial obtidas pelo método BET e volume total de poros pelo método t-plot para os adsorventes produzidos a partir de glicose e glicerol como fonte de carbono, e submetido aos tratamentos autoclave, ácido e básico. Considerando erros experimentais da análise no equipamento, pode-se considerar que as áreas superficiais para os adsorventes provenientes de diferentes fontes de carbono e diferentes tratamentos, não diferiram significativamente entre si, sendo que os bioadsorventes produzidos a partir das duas fontes de carbono e submetidos ao tratamento ácido apresentaram valores um pouco maiores. De modo geral, todos os adsorventes apresentaram baixos valores de área superficial. Entretanto, estes valores estão de acordo com valores encontrados na literatura para a área superficial de adsorventes produzidos a partir de biomassa de fungo. Mathialagan e Viraraghavan (2009) utilizaram a biomassa de *A. niger* submetida a alguns tratamentos como bioadsorvente e encontraram valores de área superficial específica em torno de 1,3 m<sup>2</sup>/g. Shroff

e Vaidya (2012) produziram bioadsorventes a partir da biomassa prétratada do fungo *Rhizopus arrhizus* e encontraram valores de área superficial próximos a 0,7 m<sup>2</sup>/g.

Tabela 3 – Valores de área superficial BET e volume de poros para os adsorventes produzidos a partir de glicose e glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.

Bioadsorventes		A <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g)	V total de poro (cm <sup>3</sup> /g)
Fonte de carbono	Tratamento		
Glicose	Autoclave	0,3944	0,002225
	Ácido	0,8755	0,003422
	Básico	0,4252	0,001553
Glicerol	Autoclave	0,9666	0,001862
	Ácido	1,9269	0,007019
	Básico	1,0623	0,003708

### 5.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura para todos os bioadsorventes estudados de modo a analisar suas morfologias e estruturas da superfície, e verificar se as diferentes fontes de carbono no cultivo e os diferentes tratamentos realizados na biomassa afetaram essas características. Sob condições de fermentação submersa, o micélio fúngico tende a crescer na forma de pellets por causa da agitação mecânica (LIU *et al.*, 2016). Os pellets de *A. niger* possuem longas hifas e abundantes estruturas fibrosas em sua superfície (VALE *et al.*, 2016). Com base no arranjo das hifas, pode-se inferir que os pellets possuem morfologia heterogênea, o que facilita a difusão de substratos (PAPAGIANNI; 2004). Os emaranhados formados pelas hifas criam espaços vazios no pellet, aumentando sua área superficial específica (BAYRAMOGLU; ARICA, 2008).

A morfologia da superfície das biomassas obtidas a partir de glicose e glicerol, respectivamente, após os tratamentos, estão apresentadas nas Figuras 8 e 9. De modo geral, as características morfológicas da superfície dos bioadsorventes não diferiram muito entre si, tanto de um tratamento para outro, quanto mudando a fonte de carbono do cultivo. As partículas se mostraram heterogêneas, variando em tamanho e formato. A superfície se mostrou bastante rugosa e irregular. Imagens similares foram obtidas para a biomassa do fungo *Rhizopus*

*arrhizus*, que foi utilizada como bioadsorvente para a remoção de íons Cr(VI) por Shroff e Vaidya (2012).

Figura 8 – Imagens de microscopia da biomassa cultivada com glicose e sujeita aos tratamentos autoclave (a), ácido (b) e básico (c).

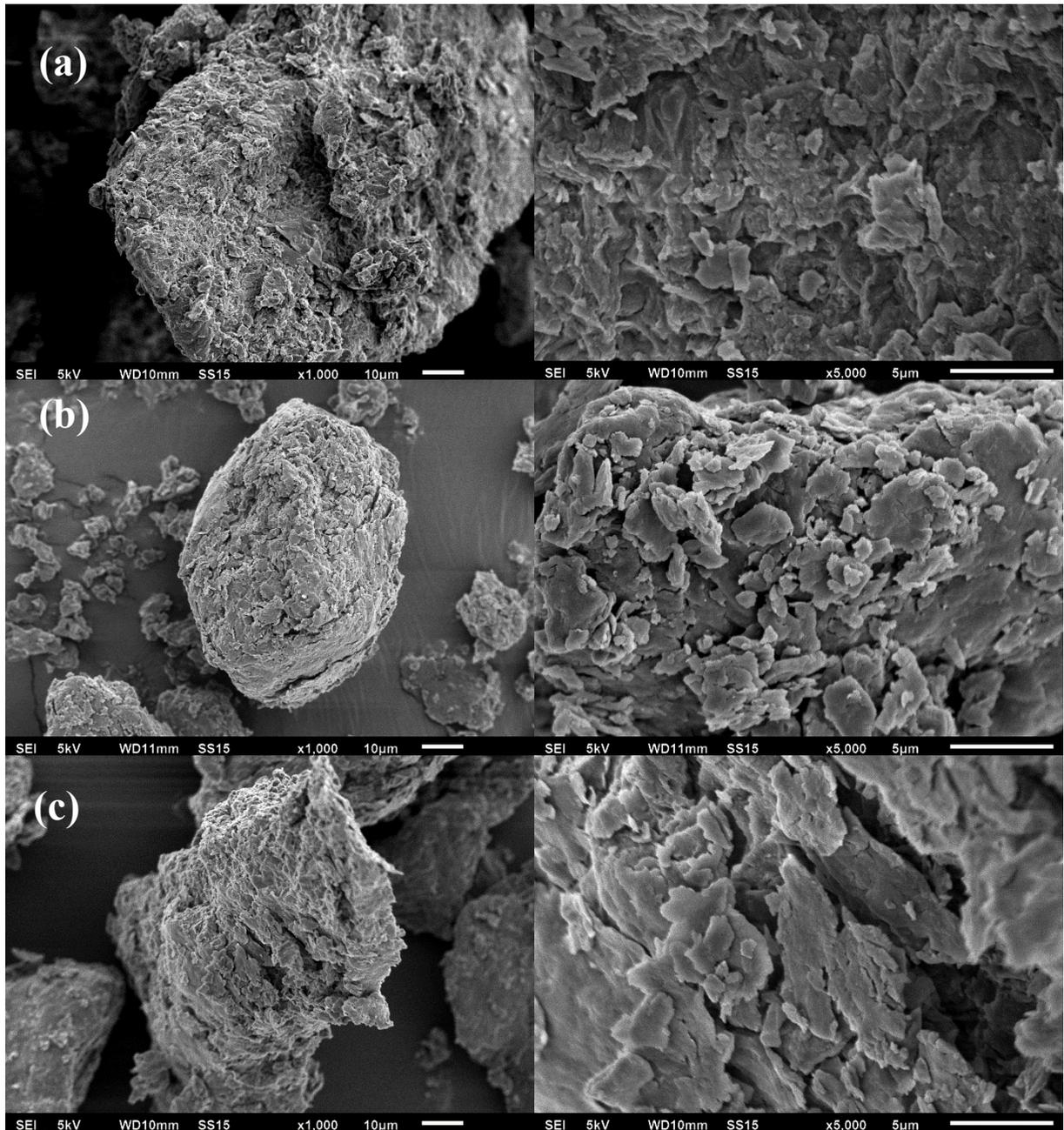
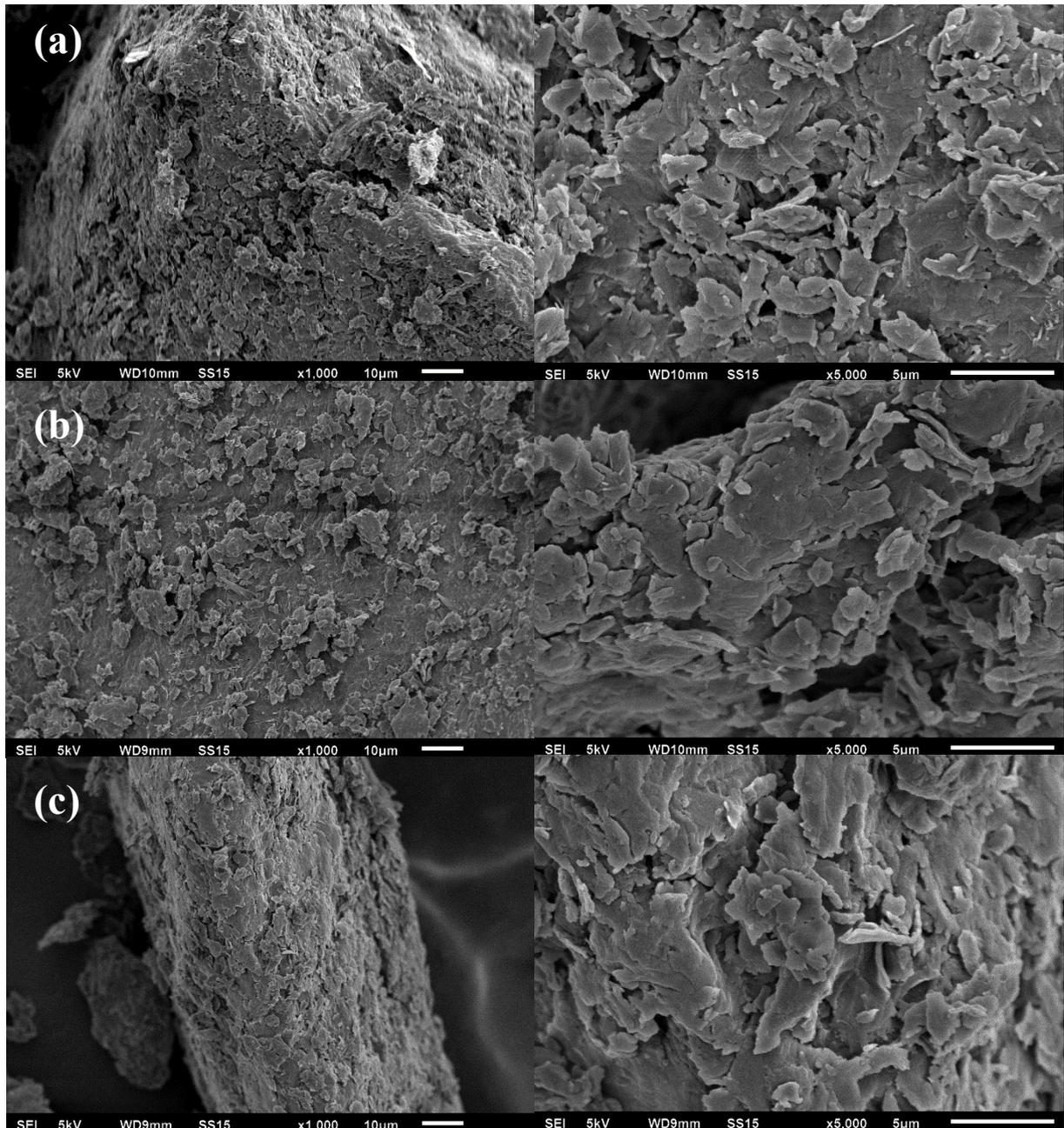


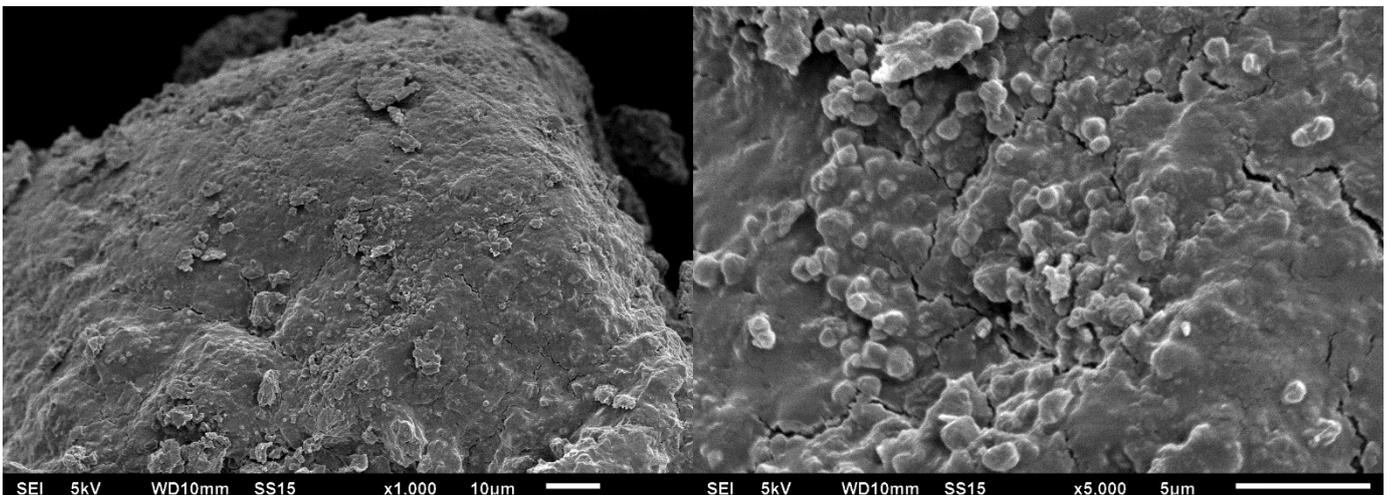
Figura 9 – Imagens de microscopia da biomassa cultivada com glicerol e sujeita aos tratamentos autoclave (a), ácido (b) e básico (c).



As biomassas obtidas após o tratamento básico (Figuras 8 e 9 (c)) apresentaram uma superfície levemente mais desintegrada que as demais, o que pode ter sido, provavelmente, devido à quebra da cadeia de polímeros e ruptura da membrana celular após o tratamento com solução básica. Isto pode ter ocasionado uma maior exposição de grupos funcionais, o que pode levar a um aumento na capacidade de adsorção dos compostos estudados pelos bioadsorventes básicos (SHROFF; VAIDYA, 2012).

Foram também realizadas imagens da biomassa de *A. niger* produzida com glicerol e tratamento básico após a adsorção de ácido tânico, a fim de observar as mudanças na morfologia da superfície do adsorvente após o contato com a solução. Em comparação com a Figura 9 (c), a Figura 10 mostra claramente as mudanças na superfície da biomassa de fungo devido as interações ocorridas entre as moléculas de ácido tânico e o bioadsorvente. A superfície sofreu uma deformação, se tornando menos rugosa. Este fenômeno provavelmente ocorreu devido a ligação de moléculas de ácido tânico aos grupos funcionais presentes na parede celular, propiciando uma mudança na estrutura da superfície da biomassa. Resultados similares de mudanças na superfície da biomassa após a adsorção foram encontrados por outros autores em estudo utilizando a biomassa de fungo como adsorvente para a remoção de metais pesados (HORRUTINER *et al.*, 2011; TUNALI *et al.*, 2005).

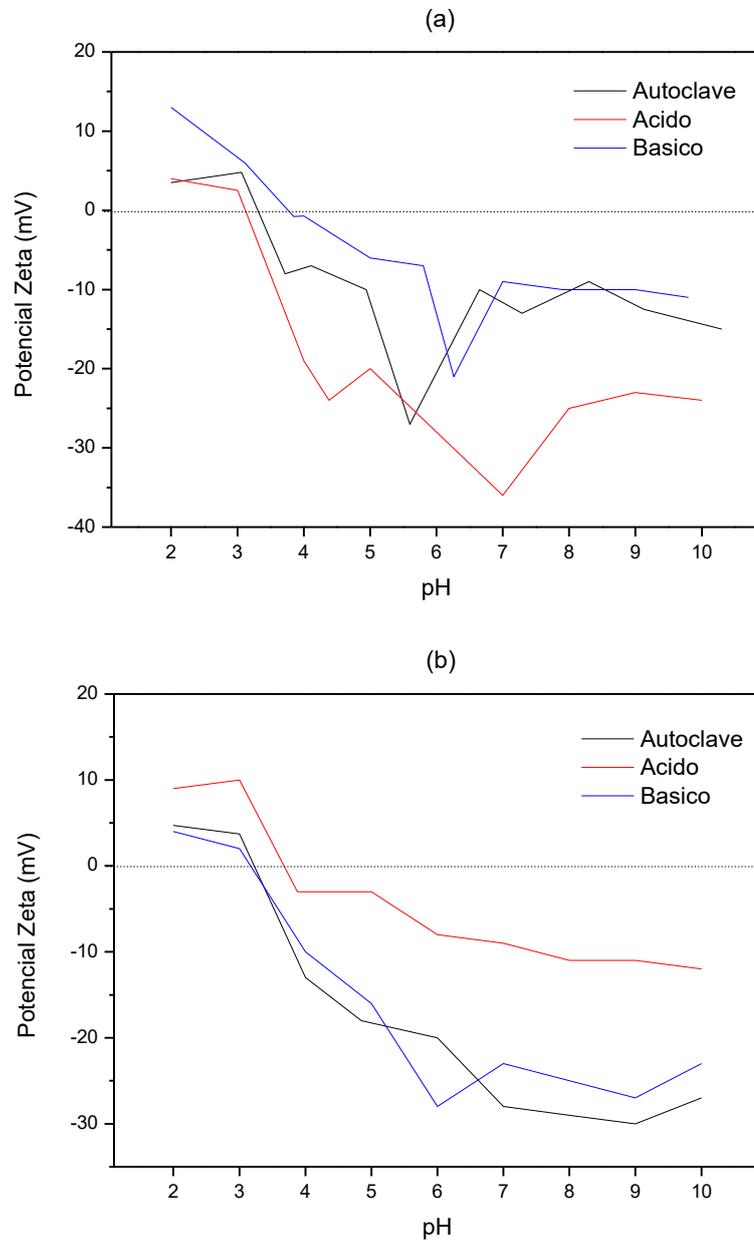
Figura 10 – Imagens de microscopia da biomassa básica após o contato com solução de ácido tânico.



### 5.2.3. Potencial Zeta

Na Figura 11 (a) e (b) estão mostradas as análises do potencial Zeta para os bioadsorventes produzidos com glicose e glicerol, respectivamente, e seus respectivos tratamentos físico-químicos.

Figura 11 – Análise do potencial zeta em função do pH da solução para os adsorventes produzidos a partir de glicose (a) e glicerol (b) como fonte de carbono, submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.



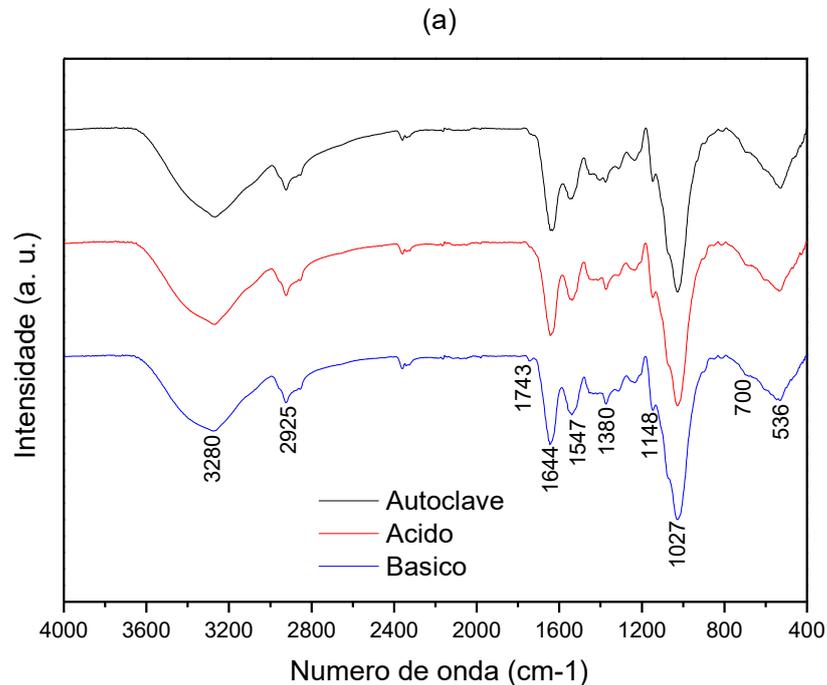
Como pode ser observado pelas Figura 11 (a) e (b), o ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{pcz}}$ ) para todos os adsorventes avaliados está entre 3 e 4. Em pHs acima do  $\text{pH}_{\text{pcz}}$ , os adsorventes estão carregados negativamente e adsorção de cátions pode ser favorecida, e abaixo do  $\text{pH}_{\text{pcz}}$  o adsorvente está carregado positivamente, e a adsorção de ânions pode ser favorecida (VIEIRA *et al.*, 2009).

Os compostos fenólicos são naturalmente ácidos fracos e tendem a desprotonar com o aumento do pH. Assim, é esperado que a capacidade de adsorção para pHs mais altos decresça, devido à repulsão entre as moléculas desprotonadas e a superfície negativa dos adsorventes.

#### 5.2.4. FTIR

O espectro de infravermelho com transformada de Fourier para os adsorventes produzidos com glicose e glicerol como fonte de carbono e submetidos aos três tratamentos são mostrados na Figura 12. De modo geral, o espectro para todos os adsorventes foi similar, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos realizados ou entre as fontes de carbono utilizadas no cultivo. As bandas correspondentes foram semelhantes para todos, com uma pequena diferença na intensidade relativa. A Tabela 4 apresenta os possíveis grupos funcionais característicos das bandas observadas nos espectros.

Figura 12 – Espectro de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) para os bioadsorventes submetidos aos três tratamentos (autoclave, ácido e básico) e produzidos com glicose (a) e glicerol (b).



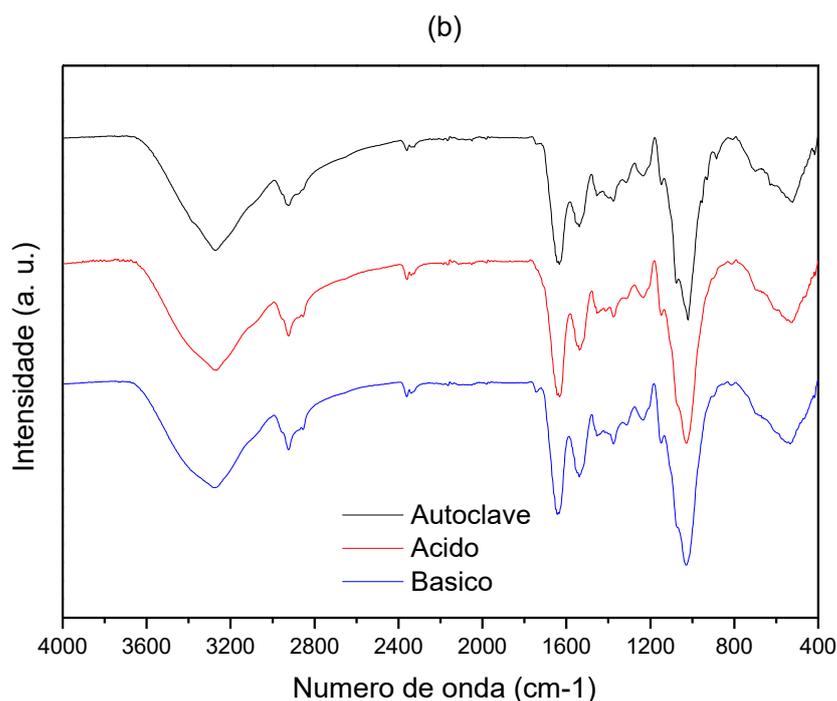


Tabela 4 – Grupos funcionais correspondentes às bandas obtidas no FTIR dos adsorventes.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais	Referências
1380	Grupos carboxílicos	LI <i>et al.</i> , 2011
1547	Ligações N–H de amidas primárias e secundárias	MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009
1644	Modo de alongamento C=O de amidas I e II	MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009
2925	Estiramento C–H de grupos carboxila de compostos alifáticos	SAYGIDEGER <i>et al.</i> 2005
3500-3200	Grupos hidroxílicos (O–H)	PAVIA <i>et al.</i> 1979

Para os bioadsorventes autoclave e básico, de ambas as fontes de carbono, foram encontradas bandas mais intensas próximas à 1743 cm<sup>-1</sup>, que podem indicar vibrações carboxila não ionizadas de ácidos carboxílicos. No geral, para todos os bioadsorventes, também foram encontradas bandas próximas de 1083 cm<sup>-1</sup> (aproximadamente 1076 cm<sup>-1</sup>) que indicam

vibrações C–O e O–H de estruturas fenólicas (ISHIZAKI e l., 1981; BINIAK *et al.*, 1991). Os grupos aldeídos e cetonas podem ser observados em bandas próximas a 1388 e 1151  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Bandas na região de 700-1028  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibrações de estiramento de –P–O, –S–O e –CH aromáticas. Bandas próximas a 540  $\text{cm}^{-1}$  podem indicar ligações C–O. Bandas na região de 1150 a 900  $\text{cm}^{-1}$  podem indicar a presença de grupos fosfato, como ligação P=O próxima a 1150  $\text{cm}^{-1}$ , grupo ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) próximo a 1079  $\text{cm}^{-1}$  e ligações P–OH próximo a 1039  $\text{cm}^{-1}$  (LOUKIDOU *et al.*, 2003; ROBINSON, 1991). Bandas próximas a 1550 e 1033  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de quitina, como é esperado encontrar na parede celular de um fungo (SPANELOVA; MACHOVIC; BREZINA, 2003). O estiramento C–O de ácidos carboxílicos podem ser encontrados na faixa de 1320-1210  $\text{cm}^{-1}$ , os picos em 1308 e 1231  $\text{cm}^{-1}$  podem ser indicativos da presença desses (PAVIA *et al.*, 1979).

As bandas encontradas para os bioadsorventes deste trabalho estão de acordo com bandas e grupos funcionais encontrados na literatura para a biomassa de *A. niger* e outras biomassas microbianas utilizadas como bioadsorvente (VALE *et al.*, 2016; MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; SHROFF; VAIDYA, 2012). Em estudo sobre os grupos funcionais da superfície da biomassa de *A. niger*, Mathialagan e Viraraghavan (2009) também encontraram bandas correspondentes a grupos amina, amidas, hidroxila, ligações de C-O de ácidos carboxílicos e grupos funcionais fosfato.

### 5.2.5. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram realizadas de modo a analisar a estabilidade térmica e a perda de massa em função da temperatura para os bioadsorventes. As curvas de termogravimetria (TG) e as derivadas termogravimétricas (DTG) dos adsorventes submetidos aos tratamentos físico-químicos e produzidos a partir de glicose e glicerol são apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Entre uma fonte de carbono e outra, as curvas de TG e DTG foram similares. Os adsorventes tiveram perdas de massa de mais de 70 % até 700 °C, sendo que as biomassas tratadas com solução ácida apresentaram uma perda de massa em torno de 5 % menor que os outros tratamentos. Houve uma pequena perda de massa entre 40 e 100 °C, devido a saída de moléculas de água adsorvidas fisicamente na estrutura dos materiais. Os adsorventes apresentaram boa estabilidade térmica, em que a perda de massa significativa começa a partir de 250 °C, sendo que o adsorvente tratado com solução básica apresentou uma maior estabilidade térmica, começando a ser degradado a uma temperatura maior, próxima a 300 °C.

Pela curva de DTG, é possível observar três eventos térmicos principais, como destacado nas Figuras 13 e 14 (b). No primeiro, pode-se observar que o evento ocorre para os bioadsorventes autoclave e ácido, mas para o básico não há o pico. E no terceiro evento, o pico para o bioadsorvente básico é muito pequeno.

Após o tratamento da biomassa com solução básica, o líquido proveniente possuía uma coloração escura, o que não era observado no tratamento com solução ácida. Possivelmente, o hidróxido de sódio reagiu com compostos presentes na biomassa, lixiviando materiais com pontos de ebulição menores, por isso a ausência de picos em determinadas temperaturas para os bioadsorventes básicos.

Figura 63 – Curva termogravimétrica (a) e DTG (b) para os adsorventes produzidos com glicose e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.

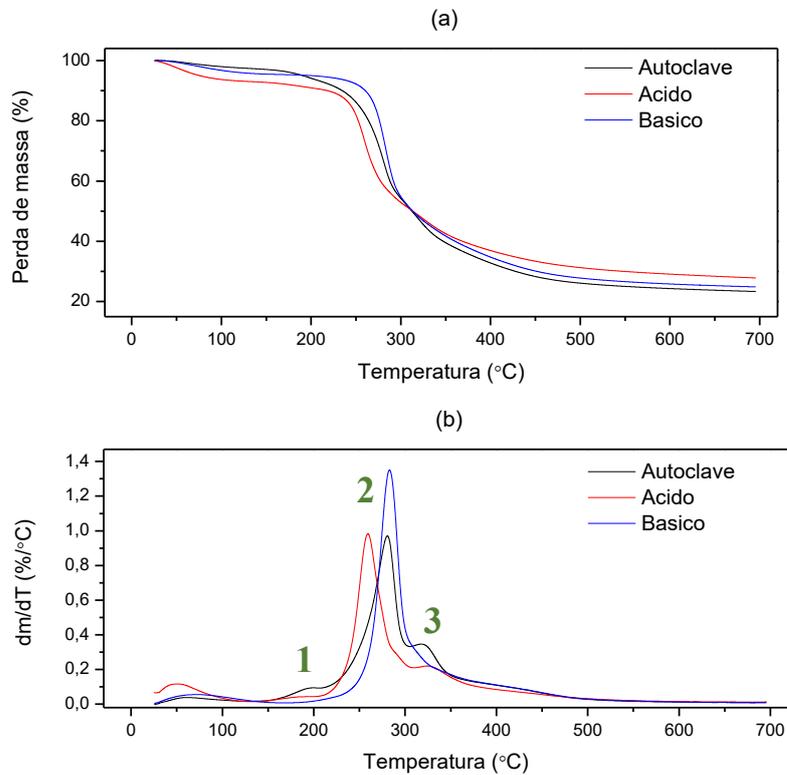
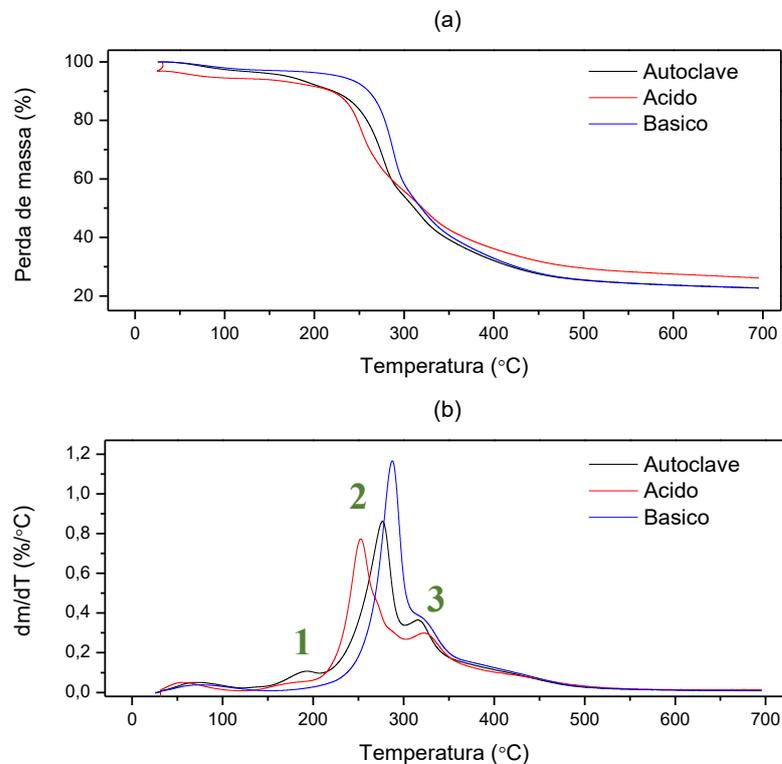


Figura 14 – Curva termogravimétrica (a) e DTG (b) para os adsorventes produzidos com glicerol e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico.

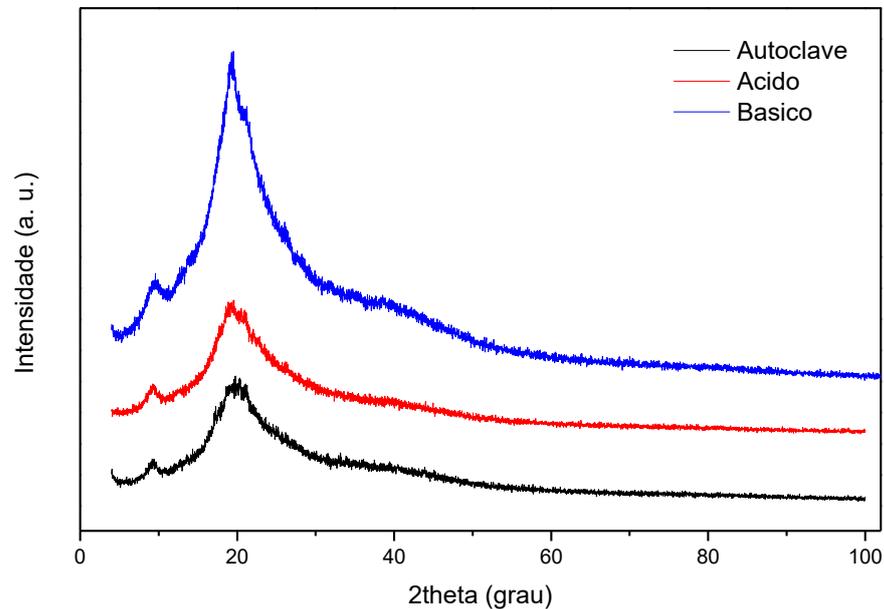


As curvas de TG e DTG obtidas para os materiais estudados neste trabalho estão de acordo com curvas encontradas na literatura para biomassa de fungo e compostos como quitina, que também está presente na composição da biomassa fúngica (BARBOSA *et al.*, 2019; BORGES; DE SOUSA COSTA; DRUZIAN, 2014).

### 5.2.6. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X dos adsorventes produzidos com glicerol como fonte de carbono e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico são mostrados na Figura 15. Pode ser observado que a biomassa tratada com solução básica exibe uma intensidade maior e sinais menos alargados no pico próximo a  $20^\circ$  que os adsorventes sujeitos aos outros tratamentos, o que evidencia que o adsorvente básico é mais cristalino que os demais. Estas diferenças sugerem que o tratamento com solução básica está modificando a organização estrutural da biomassa, devido, provavelmente, às reações ocorridas entre o hidróxido de sódio e compostos presentes na superfície da biomassa, causando um rearranjo estrutural do material. Os picos encontrados para os adsorventes são similares a picos encontrados em difratogramas de raios X de materiais como quitina, que está presente na parede celular da biomassa de fungos (CAMPANA F<sup>o</sup>; SIGNINI, 2001; CARDOSO, 2008).

Figura 15 – Difratomogramas de raios X para os bioadsorventes autoclave, ácido e básico produzidos com glicerol.



### 5.2.7. Análise Elementar (CHN)

A análise elementar em relação aos compostos carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) para os adsorventes produzidos a partir de glicose e glicerol como fonte de carbono e submetidos aos tratamentos autoclave, ácido e básico está apresentada na Tabela 5.

A porcentagem presente de cada composto para os adsorventes obtidos com as duas fontes de carbono diferentes (glicose e glicerol) foi similar. Entretanto, houve uma variação na porcentagem de carbono nas amostras entre os três diferentes tratamentos (autoclave, ácido e básico) realizados. A biomassa tratada com solução básica apresentou uma porcentagem de carbono maior em relação a tratada com solução ácida e a somente autoclavada, tanto a obtida com glicose como fonte de carbono, quanto para glicerol. Essa diferença na porcentagem de carbono corrobora a hipótese de que com o tratamento básico houve a reação do hidróxido de sódio com compostos presentes na biomassa, promovendo a lixiviação desses compostos no licor proveniente do tratamento, aumentando a porcentagem de carbono em relação aos outros compostos presentes na biomassa.

Tabela 5 – Porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) presentes nos adsorventes obtidos com glicose e glicerol e submetidos aos tratamentos físico-químicos.

Bioadsorventes		% de cada composto		
Fonte de carbono	Tratamento	C	H	N
Glicose	Autoclave	39,69	4,19	5,51
	Ácido	41,40	4,29	4,94
	Básico	44,41	4,46	4,95
Glicerol	Autoclave	39,82	4,47	6,12
	Ácido	39,95	4,29	6,06
	Básico	44,43	4,45	5,76

### 5.3. Adsorção com amostras sintéticas

Foi conduzido um estudo com amostras sintéticas de dois compostos que estão entre os compostos provenientes da degradação da lignina a fim de se ter um conhecimento prévio da capacidade de adsorção desses compostos pelos bioadsorventes estudados. Estes são a vanilina, um monômero, e o ácido tânico, um oligômero. Estes compostos fenólicos estão entre os principais inibidores de enzimas celulolíticas (MALGAS *et al.*, 2016; QIN *et al.*, 2016; XIMENES *et al.*, 2011).

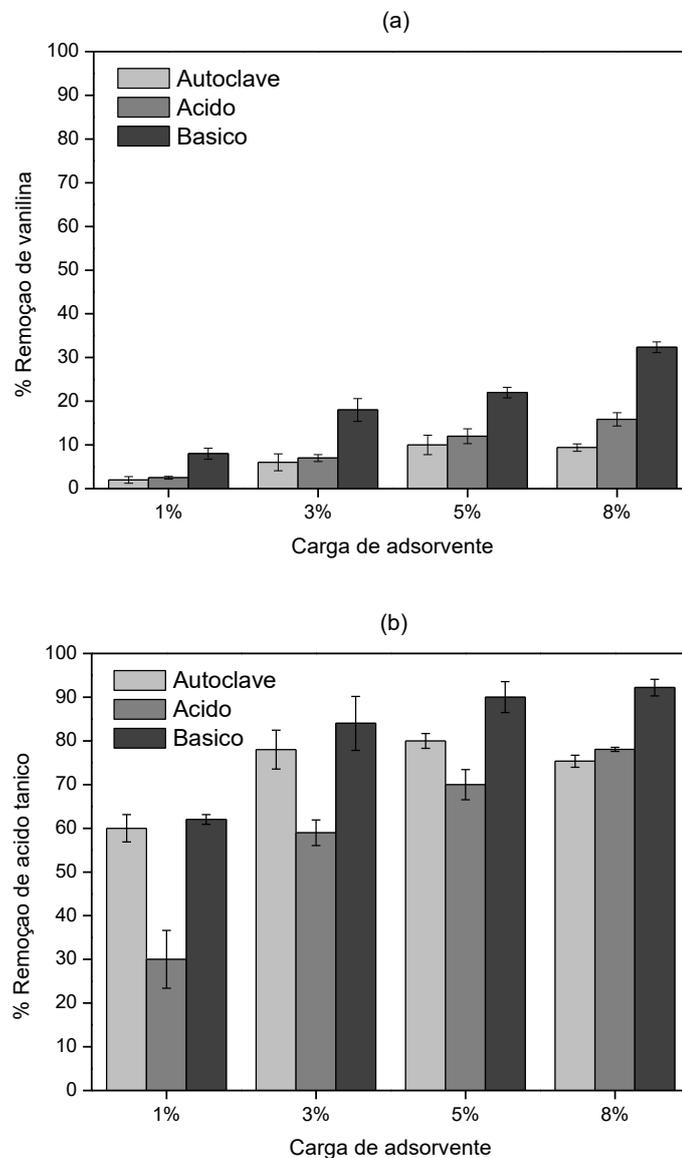
Após o cultivo da biomassa de *A. niger* com glicose como fonte de carbono, foram realizados os tratamentos na biomassa e os ensaios de adsorção foram realizados com os três bioadsorventes obtidos nos diferentes tratamentos. Foram realizados ensaios variando a carga de adsorvente, o pH da solução e a temperatura de adsorção, a fim de avaliar o efeito dessas variáveis no processo. A concentração inicial utilizada de vanilina e ácido tânico foi de 3 g/L, que está na faixa de concentração média encontrada para os compostos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento hidrotérmico de diferentes biomassas lignocelulósicas (XIMENES *et al.*, 2011).

Posteriormente, foi realizado o cultivo com glicerol como fonte de carbono e os subsequentes tratamentos na biomassa. Os mesmos ensaios, variando carga, pH e temperatura, foram conduzidos para estes três adsorventes. Também foi feito um estudo comparativo entre os bioadsorventes obtidos a partir das duas fontes de carbono, de modo a avaliar se esta mudança estava afetando a capacidade de adsorção.

### 5.3.1. Ensaios preliminares

Foram feitos testes variando a carga dos adsorventes autoclavado, ácido e básico obtidos com glicose como fonte de carbono. A carga variou entre 1, 3, 5 e 8% (m/v), para uma concentração inicial de vanilina e ácido tânico de 3 g/L, em tampão citrato de sódio pH 3 e 30 °C. A Figura 16 (a) e (b) mostra a influência da carga de adsorvente na adsorção de vanilina e ácido tânico, respectivamente. Todos os testes foram realizados a uma rotação de 30 rpm, por 24 horas.

Figura 16 – Percentual de remoção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes produzidos com glicose em diferentes cargas (1, 3, 5 e 8 % m/v), em pH 3 e 30 °C.



O aumento da carga de adsorvente de 1 a 8 % (m/v) proporcionou um aumento significativo da porcentagem de remoção dos compostos pelos bioadsorventes. Os resultados mostram que os adsorventes foram eficientes na remoção de ácido tânico, sendo que o tratamento que proporcionou uma melhor adsorção foi o realizado com solução básica. Com 8% de carga de adsorvente tratado com base foi possível remover mais de 90% de ácido tânico, e com apenas 1% obteve-se um resultado razoável, com uma remoção de 60%.

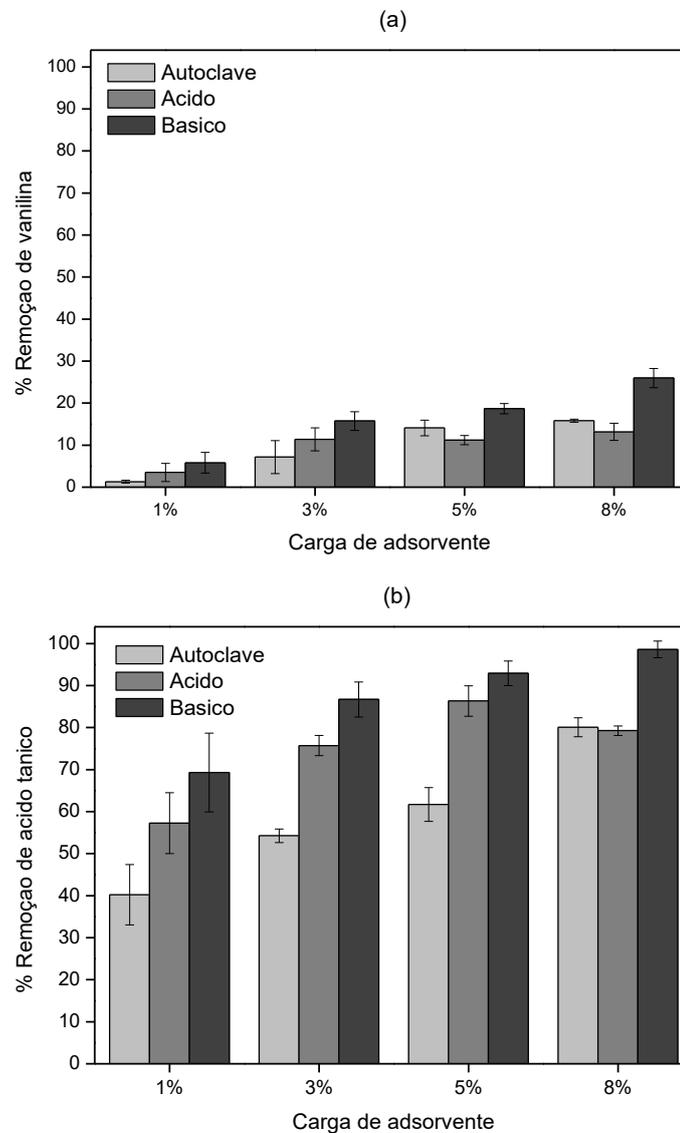
Para a vanilina, a afinidade com os adsorventes foi menor. A biomassa tratada com base também se mostrou a mais eficaz, porém com uma remoção de pouco mais de 30% para 8% de carga de adsorvente.

No estudo de Rao e Viraraghavan (2002) da adsorção de fenol em diferentes biomassas de *A. niger* pré-tratadas, o tratamento com hidróxido de sódio se destacou, com uma das maiores porcentagens de remoção do composto estudado. Foi demonstrado que pré-tratamentos alcalinos podem ser responsáveis por destruir enzimas autolíticas que causam degradação da biomassa e por remover lipídios e proteínas que mascaram sítios reativos (MURALEEDHARAN; VENKOBACHAR, 1990). Gallagher *et al.* (1997) sugeriram que o tratamento com hidróxido de sódio pode aumentar a porcentagem de quitina/quitosana na parede celular, dissolvendo alguns biopolímeros presentes na parede celular, e que, assim, as unidades de quitina/quitosana podem então ser responsáveis pela adsorção de fenol no caso da biomassa tratada com NaOH.

Como visto nas caracterizações dos adsorventes, as análises de DRX (Figura 15), termogravimetria (Figuras 13 e 14) e análise elementar (Tabela 5) mostraram que o tratamento com solução básica de NaOH está modificando a estrutura da biomassa, o que está, possivelmente, aumentando sua capacidade de adsorção.

Também foram realizados testes para os bioadsorventes produzidos a partir de glicerol como fonte de carbono. A carga variou entre 1, 3, 5 e 8% (m/v), para uma concentração inicial de vanilina e ácido tânico de 3 g/L, em tampão pH 3, 30 °C, por 24 h. A Figura 17 (a) e (b) mostra a influência da carga de adsorvente na adsorção de vanilina e ácido tânico, respectivamente.

Figura 17 – Percentual de remoção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes produzidos com glicerol em diferentes cargas (1, 3, 5 e 8 % m/v), em pH 3 e 30 °C.



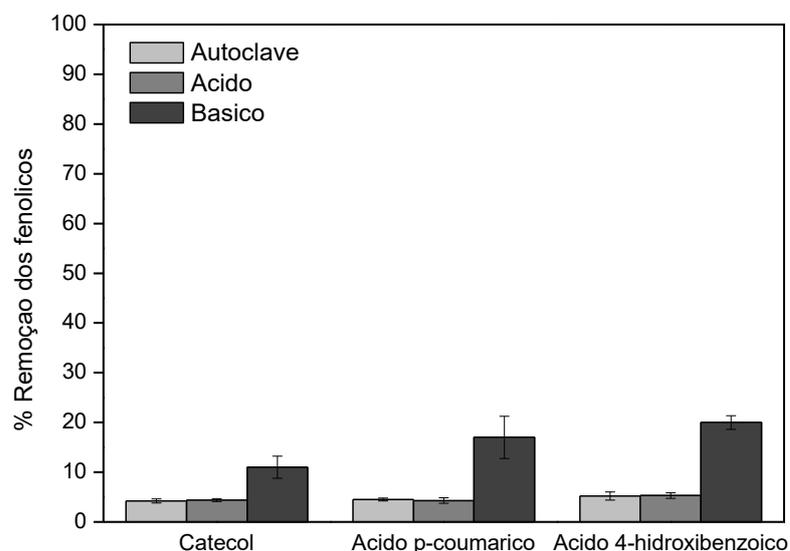
Os resultados obtidos foram similares aos obtidos para os adsorventes produzidos com glicose. A biomassa tratada com base proporcionou a melhor remoção dos compostos, com uma adsorção de quase 100% de ácido tânico com carga de 8%, sendo que apenas 1% foi capaz de remover 70%. A adsorção de vanilina pelos adsorventes também se mostrou desfavorável, com uma remoção de 26% para a carga de 8% do bioadsorvente básico.

Como visto anteriormente nas análises das caracterizações dos bioadsorventes, os adsorventes obtidos com glicose e glicerol não apresentaram diferenças significativas entre si. Dessa forma, como era de se esperar, os adsorventes cultivados com as duas fontes de carbono diferentes apresentaram capacidades de adsorção muito parecidas, sendo que, no geral, os

bioadsorventes produzidos com glicerol tiveram uma porcentagem de remoção de ácido tânico um pouco maior. Tendo em vista também que os rendimentos de produção de biomassa no cultivo com as duas fontes de carbono foram muito parecidos, e como o glicerol é uma matéria-prima abundante e pode ser obtida com um menor custo, ou até como subproduto nas biorrefinarias, optou-se por fixar essa fonte de carbono para os próximos cultivos, utilizando somente a biomassa produzida com glicerol para os experimentos das próximas etapas com as amostras sintéticas.

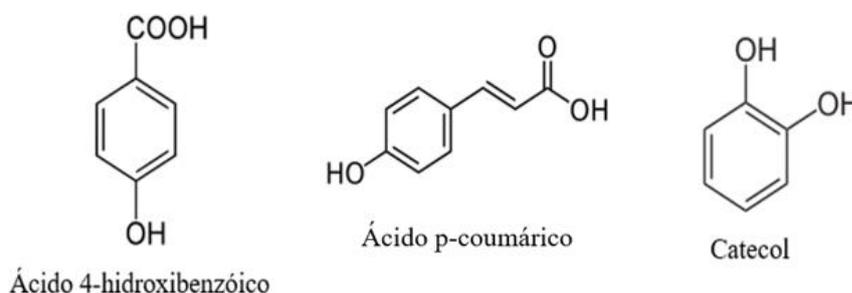
Como a capacidade de adsorção de vanilina pelos bioadsorventes estudados se mostrou pequena, decidiu-se realizar testes de adsorção com outros compostos fenólicos para avaliar a capacidade de adsorção desses pelos bioadsorventes. Os compostos selecionados foram: ácido p-coumárico, catecol e ácido 4-hidroxibenzoico, que também são inibidores de enzimas (MARTIN *et al.* 2002; PINTO; RIBEIRO; FARINAS, 2018). Os experimentos foram realizados com os adsorventes obtidos com glicerol como fonte de carbono. Foi utilizada uma concentração de 1 g/L para a solução desses compostos, carga de 3% dos bioadsorventes, em tampão pH 3 e 30 °C. A Figura 18 mostra a porcentagem de remoção de cada composto pelos bioadsorventes.

Figura 18 – Percentual de remoção de catecol, ácido p-coumárico e ácido 4-hidroxibenzoico com carga de 3% (m/v) dos bioadsorventes autoclave, ácido e básico, em pH 3 e 30 °C.



A adsorção desses compostos pelos bioadsorventes também se mostrou desfavorável, assim como a adsorção da vanilina. As estruturas químicas desses compostos estão apresentadas na Figura 19.

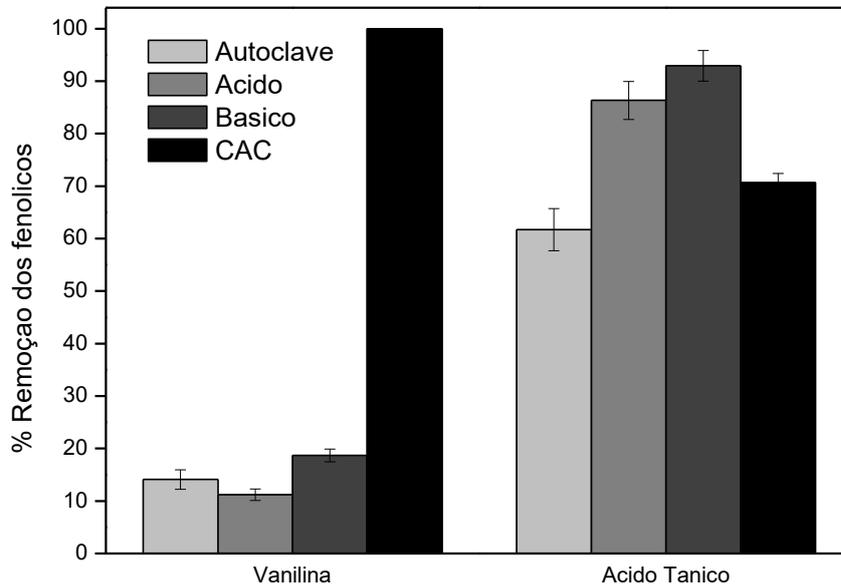
Figura 19 – Estrutura química dos compostos fenólicos.



Uma possível explicação para a diferença na capacidade de adsorção desses compostos (vanilina, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido p-coumárico e catecol) em relação ao ácido tânico é que os adsorventes estão tendo maior facilidade em adsorver compostos maiores (oligômeros), como o ácido tânico. Levando em consideração, também, a análise de área superficial e volume de poros dos adsorventes, é provável que a biomassa microbiana seja composta, majoritariamente, por macro e mesoporos, contendo uma quantidade pequena ou nula de microporos. A presença de mesoporos faz com que o adsorvente tenha maior capacidade para adsorção de moléculas maiores. Freitas e Farinas (2017) estudaram a adsorção de vanilina e ácido tânico utilizando fuligem do bagaço de cana como adsorvente. Este material possui uma proporção maior de microporos em relação aos mesoporos e tiveram resultados de adsorção melhores para a vanilina do que para o ácido tânico, sugerindo que a porosidade do material influencia na remoção de partículas de determinados tamanhos.

De modo a comparar a capacidade de adsorção dos adsorventes em relação a um adsorvente comercial, foram realizados ensaios com os adsorventes produzidos com glicerol e com carvão ativado comercial (CAC) para a adsorção de vanilina e ácido tânico. A carga utilizada para cada um foi de 5%, em pH 3 e 30 °C. A Figura 20 mostra os percentuais de vanilina e ácido tânico removido pelos adsorventes.

Figura 20 – Percentual de remoção de vanilina e ácido tânico para os três adsorventes (autoclave, ácido e básico) produzidos e carvão ativado comercial (CAC) em pH 3 e 30 °C.



O carvão ativado comercial foi capaz de remover 100% da vanilina nas condições avaliadas, diferentemente da biomassa, que teve uma baixa capacidade de adsorção de vanilina. Por outro lado, os adsorventes produzidos a partir da biomassa de fungo e tratados com solução ácida e básica demonstraram uma maior capacidade de adsorção de ácido tânico em relação ao carvão ativado. O carvão ativado comercial é um material altamente microporoso (FREITAS; FARINAS, 2017), o que pode ter favorecido a adsorção de vanilina (composto monômero) e prejudicado a adsorção de ácido tânico (composto oligômero).

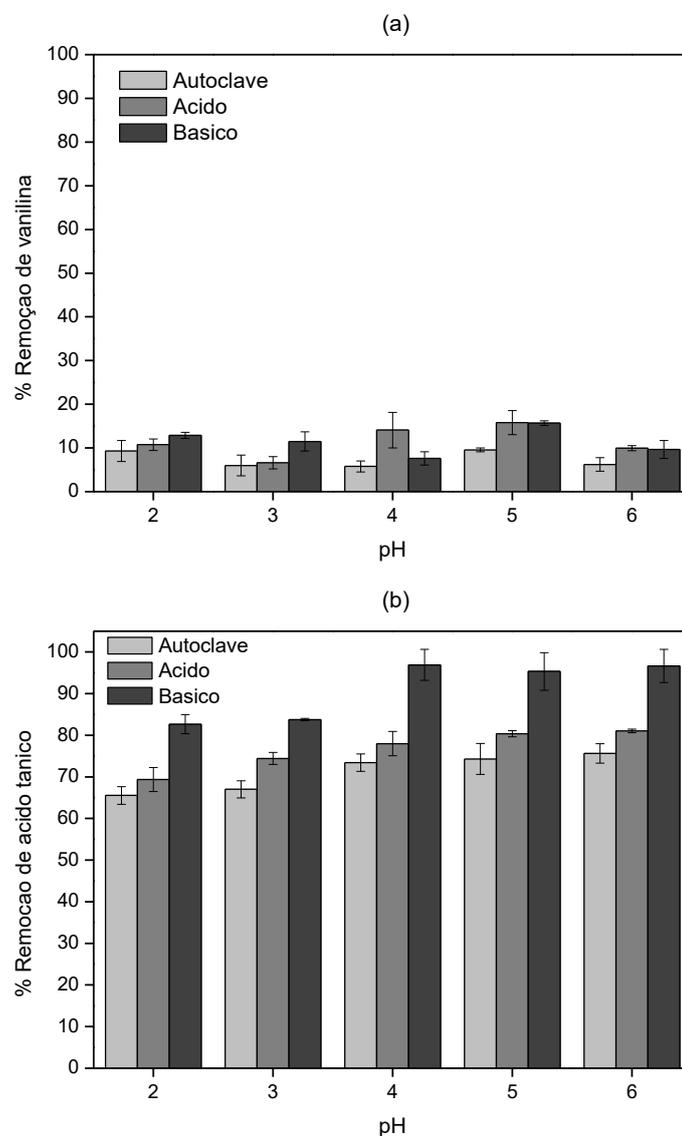
### 5.3.2. Efeito do pH

O pH inicial da solução é um dos parâmetros mais importantes que controlam o processo de bioadsorção. O pH afeta não somente a carga da superfície do adsorvente, mas também o grau de ionização das moléculas de adsorbato na solução (AGARWAL; RAJORIA; RANI, 2018; KHANI; PAHLAVANZADEH; ALIZADEH, 2012). Em pH abaixo do  $pH_{pcz}$ , cargas positivas vão se formando na superfície do adsorvente devido à protonação dos grupos ácidos e básicos, enfraquecendo as interações e aumentando a afinidade com o solvente.

Foi realizado o estudo da influência do pH na adsorção das amostras sintéticas de vanilina e ácido tânico pelos bioadsorventes. Os adsorventes utilizados foram os autoclave, ácido e básico produzidos a partir do cultivo com glicerol. O pH variou de 2 a 6, com uma carga de adsorvente de 3% (m/v), a 30 °C, 30 rpm, por 24 h e uma concentração inicial de vanilina e ácido tânico de 3 g/L. O pH foi ajustado adicionando soluções de NaOH ou HCl.

A Figura 21 (a) e (b) mostra a influência do pH na adsorção de vanilina e ácido tânico pelos bioadsorventes, respectivamente. Os resultados mostraram que a adsorção foi pouco afetada pela variação de pH na faixa estudada, para os dois compostos, com um pequeno aumento na porcentagem de remoção para pHs maiores. A capacidade de adsorção de ácido tânico em pH 4-6 foi favorecida, com uma remoção em torno de 96% de ácido tânico para o bioadsorvente básico (Figura 21 (b)).

Figura 21 – Efeito da variação do pH na adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes, para 3% (m/v) de carga, a 30 °C.



O ácido tânico é um ácido fraco, e sua ionização é fortemente dependente do pH da solução. Ele está em sua forma molecular em  $\text{pH} \leq 4,5$ , acima desse pH as moléculas começam a ionizar e em pH 7 estão quase completamente ionizadas (AN; DULTZ, 2007).

Resultados similares foram obtidos por Wu e Yu (2006) e Rao e Viraraghavan (2002) na adsorção de 2,4-diclorofenol e fenol, respectivamente, utilizando biomassa de fungo como bioadsorvente. Eles também encontraram um pH ótimo para a adsorção desses compostos em torno de 5. Agarwal e colaboradores (2018) estudaram a adsorção de ácido tânico utilizando cinzas tratada com hidróxido de sódio e quitosana como adsorvente. Eles estudaram o efeito do pH na adsorção e observaram que o pH em que houve a máxima capacidade de adsorção foi 5,5. Em estudos sobre a adsorção de ácido tânico em carvão ativado, foi observado que o pH não afetou a capacidade de adsorção na faixa avaliada naquele trabalho, porém em pH acima de 6, houve uma queda na porcentagem de remoção do composto (ÖNAL, 2010).

Xiao e colaboradores (2012) estudaram a adsorção de vanilina em resina modificada por grupos acetoamina e hidroxila. Eles observaram que a vanilina em sua forma molecular foi favorável à adsorção pela resina. Até um pH de 5,31, a capacidade de adsorção de vanilina pela resina teve pouca variação. Acima desse pH as moléculas de vanilina começam a ionizar e a capacidade de adsorção cai gradualmente com o aumento do pH.

Com base nos resultados do potencial zeta dos adsorventes comentados anteriormente, era de se esperar que o aumento do pH da solução desfavorecesse a capacidade de adsorção dos bioadsorventes, devido a desprotonação dos compostos fenólicos. Entretanto, o aumento do pH não provocou esse efeito na capacidade de remoção, o que sugere que as forças eletrostáticas entre os adsorventes e os compostos não estão desempenhando um papel significativo no processo de adsorção.

Assim, foi definido o pH 5 para as etapas seguintes de estudo do efeito da temperatura e obtenção das curvas de cinética e isotermas de adsorção.

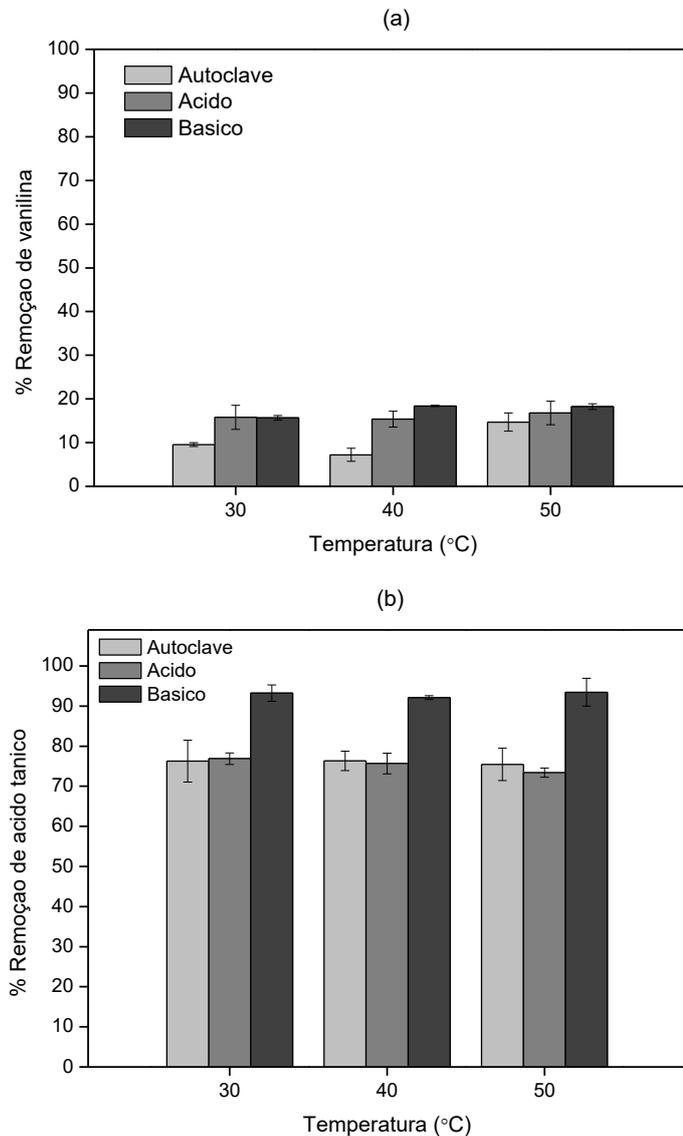
### **5.3.3. Efeito da temperatura**

A temperatura também é um fator importante no processo de adsorção, podendo impactar significativamente a capacidade de remoção do adsorbato pelo adsorvente. O aumento da temperatura pode causar um aumento da energia cinética das moléculas, dificultando a adsorção. Por outro lado, o aumento da temperatura poderia facilitar a difusão das moléculas para o interior do adsorvente.

A Figura 22 (a) e (b) mostram o efeito da temperatura na remoção de vanilina e ácido tânico pelos bioadsorventes, respectivamente. A adsorção ocorreu em diferentes temperaturas (30, 40 e 50 °C), com uma carga de 3% (m/v), em pH 5 e concentração inicial de 3 g/L das amostras sintéticas. Os compostos apresentaram comportamentos semelhantes de adsorção, o

aumento da temperatura de 30 para 50 °C praticamente não alterou a capacidade de adsorção dos compostos pelos adsorventes.

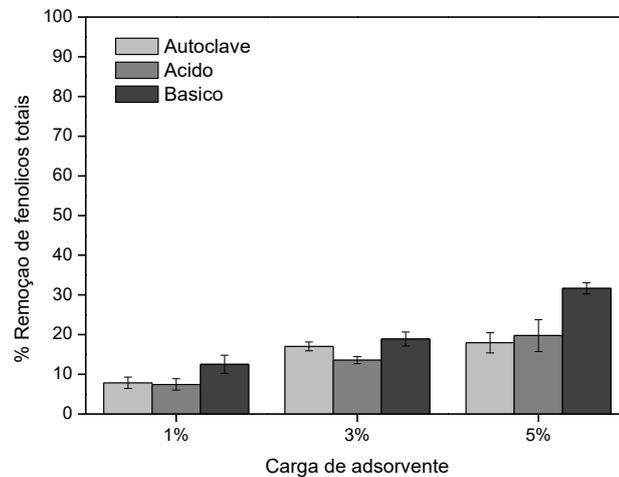
Figura 22 – Efeito da temperatura na adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) pelos bioadsorventes, para 3% (m/v) de carga, em pH 5.



#### 5.4. Adsorção dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento

Foram feitos testes variando a carga de adsorvente em 1, 3 e 5% (m/v) para os três adsorventes produzidos com glicerol como fonte de carbono. Os experimentos foram realizados com o pH original do licor (próximo de 3), a 30 °C, 30 rpm, por 24 h. A Figura 23 mostra a porcentagem de remoção de fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento para cada carga de adsorvente estudada.

Figura 23 – Percentual de remoção dos fenólicos totais do licor para diferentes cargas (1, 3 e 5%) dos adsorventes autoclave, ácido e básico a 30 °C e pH original do licor.



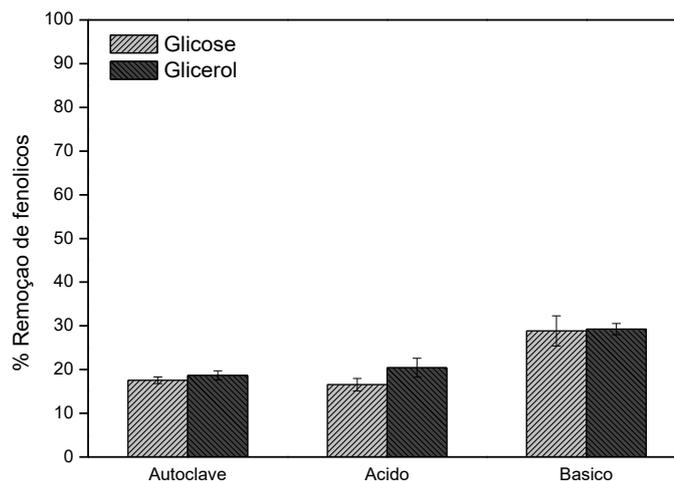
O aumento da carga de adsorvente de 1 para 5% (m/v) proporcionou um aumento na capacidade de adsorção. Da mesma forma que foi observado para as amostras sintéticas, o bioadsorvente que demonstrou uma melhor capacidade de adsorção foi a biomassa tratada com solução básica, com uma remoção em torno de 32% dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para a carga de 5% do adsorvente básico. A capacidade de adsorção foi pequena comparada à capacidade atingida para o ácido tânico. É provável que os adsorventes estão removendo mais os compostos oligoméricos do licor, que estão presentes em menores proporções, do que os monoméricos.

Embora a porcentagem de remoção dos fenólicos totais presentes no licor não tenha sido um valor tão alto, o fato de que provavelmente está adsorvendo mais os compostos oligoméricos é bastante interessante. Foi reportado que compostos oligoméricos, como o ácido tânico, exercem maior inibição na hidrólise enzimática que a vanilina, composto monomérico (FREITAS; FARINAS, 2017, TEIJIRIAN; XU, 2011; XIMENES *et al.*, 2010). Freitas e Farinas (2017) conduziram experimentos de hidrólise enzimática de uma fonte de celulose com soluções de vanilina e ácido tânico antes e após o tratamento dessas com fuligem como adsorvente. Foi observado que não houve liberação de açúcares após a hidrólise nos experimentos conduzidos com a presença de ácido tânico.

Também foram realizados experimentos com todos os bioadsorventes produzidos, de modo a analisar se a diferença na fonte de carbono influenciou a adsorção dos fenólicos. A Figura 24 mostra a porcentagem de remoção de fenólicos totais do licor com uma carga de 5% (m/v) das biomassas autoclave, ácido e básica obtidas com glicose e glicerol, em pH original do licor, 30 °C, 30 rpm, por 24 h.

Os adsorventes tiveram capacidade de adsorção dos fenólicos presentes no licor muito próximas. Como mostrado na análise dos resultados de infravermelho, os grupos funcionais presentes na superfície dos adsorventes produzidos a partir de glicose e glicerol foram praticamente iguais, com uma pequena diferença na intensidade para algumas bandas. De modo geral, para todas as caracterizações realizadas para os bioadsorventes produzidos a partir das duas fontes de carbono, os resultados foram bastante similares, variando apenas entre os diferentes tipos de tratamento. Assim, a diferença na fonte de carbono no cultivo praticamente não interferiu em suas características morfológicas e superficiais. Dessa forma, era de se esperar que as capacidades de adsorção não variassem muito entre os adsorventes obtidos a partir de glicose e glicerol.

Figura 24 – Percentual de remoção de fenólicos totais do licor com carga de 5% (m/v) para os 6 adsorventes produzidos, a 30 °C e pH original do licor.



#### 5.4.1. Influência do pH e temperatura

Uma das formas de aplicação dos bioadsorventes estudados neste trabalho para a remoção dos compostos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é a inserção na etapa de hidrólise enzimática. Assim, é importante conhecer o comportamento da adsorção desses compostos em diferentes condições para analisar qual seria a melhor forma de inserção do bioadsorvente no processo.

Como a hidrólise enzimática é realizada em pH 5 e 50 °C, os ensaios de adsorção dos fenólicos totais presentes no licor do bagaço pré-tratado foram realizados em pH original do licor ( $3,4 \pm 0,2$ ) e pH ajustado para 5, para as temperaturas de 30 e 50 °C, a fim de verificar se as condições de pH e temperatura influenciavam na capacidade de remoção dos compostos

fenólicos pelos bioadsorventes. Os testes foram realizados com uma carga de 5 % (m/v) da biomassa obtida a partir de glicerol e tratada com solução básica, que demonstrou ser a mais eficiente nos ensaios anteriores. A concentração inicial de fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento LHW foi de  $2,56 \pm 0,06$  g AGE/L. Os ensaios foram conduzidos por 24 horas a 30 rpm. As porcentagens de remoção de fenólicos totais do licor para cada condição são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Porcentagens de remoção de fenólicos totais do licor em diferentes pHs (3,4 e 5) e temperaturas (30 e 50 °C) com 5% (m/v) de adsorvente.

Temperatura (°C)	Porcentagem de remoção de fenólicos totais (%)	
	pH original do licor	pH 5
30	$33,25 \pm 1,69$	$26,55 \pm 1,30$
50	$41,81 \pm 1,88$	$30,95 \pm 0,78$

Para uma mesma temperatura, o ajuste do pH a partir do original do licor (próximo de 3,4) para 5, provocou uma diminuição na capacidade de adsorção dos fenólicos. Os compostos fenólicos tendem a desprotonar com o aumento do pH, o que pode ter causado uma repulsão entre a superfície negativa do bioadsorvente e as cargas negativas das moléculas de fenólicos. De modo geral, o aumento da temperatura de adsorção dos fenólicos do licor favoreceu a capacidade de remoção pelo bioadsorvente. O aumento na temperatura pode ter facilitado a difusão das moléculas para o interior do adsorvente.

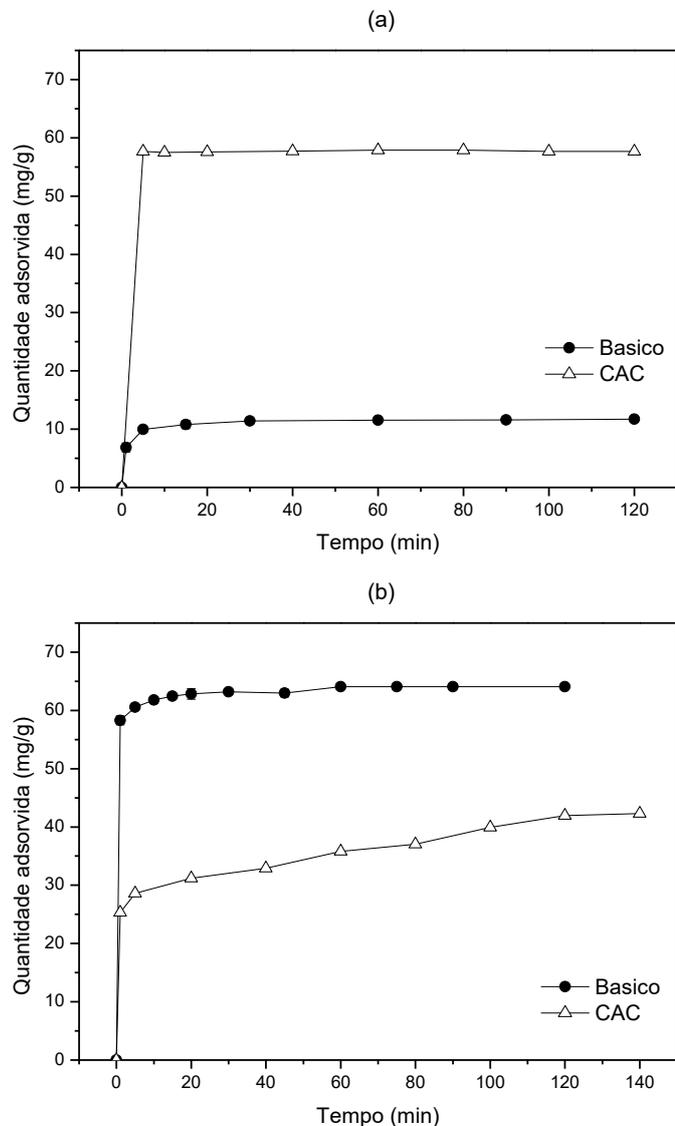
Freitas e Farinas (2017) também estudaram a adsorção dos inibidores presente no licor do pré-tratamento do bagaço de cana. Elas utilizaram fuligem do bagaço como adsorvente e avaliaram a capacidade de adsorção e a influência do pH e temperatura nessas mesmas condições. Não foi observado diferenças significativas na remoção dos fenólicos variando o pH original do licor (próximo de 3) para 5, e temperatura de 30 para 50 °C.

### 5.5. Cinética de adsorção

Foram obtidas curvas de cinética de adsorção para as amostras sintéticas de vanilina e ácido tânico utilizando o adsorvente que proporcionou a maior capacidade de remoção dos compostos, o bioadsorvente produzido com glicerol e tratado com solução básica. As curvas também foram feitas utilizando carvão ativado comercial (CAC) como adsorvente para efeito

comparativo entre suas capacidades de adsorção. Os ensaios foram realizados a 30 °C, pH 5, 30 rpm, com concentração inicial de 3 g/L de soluto e 5 % (m/v) de adsorvente. A Figura 25 (a) e (b) mostra a cinética de adsorção de vanilina e ácido tânico, respectivamente, pelos adsorventes básico e carvão ativado em termos de quantidade adsorvida (mg de adsorbato/g de adsorvente) em função do tempo (minutos). No início do processo de adsorção, os sítios dos adsorventes estão vazios e disponíveis para que ocorra a adsorção, o que faz com que o processo seja bem rápido nos instantes iniciais, e mais lento ao se aproximar do equilíbrio.

Figura 25 – Curvas de cinética de adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b) para 5% (m/v) de bioadsorvente básico e carvão ativado comercial (CAC), a 30 °C, pH 5 e  $C_0$  de 3 g/L.



A adsorção de vanilina em carvão ativado comercial foi praticamente instantânea. Em apenas 5 minutos, a capacidade de adsorção de vanilina, de aproximadamente 57 mg/g, chegou

ao equilíbrio, com uma redução de 97% da concentração inicial. A adsorção de vanilina no bioadsorvente básico também foi rápida. Em 5 minutos, a capacidade de adsorção já estava bem próxima ao equilíbrio, atingido aos 30 minutos com uma capacidade de adsorção próxima de 12 mg/g. Entretanto, a porcentagem de remoção de vanilina pelo bioadsorvente foi bem menor comparada ao carvão ativado comercial, com uma remoção de apenas 17 %.

Para o ácido tânico, a adsorção pelo bioadsorvente básico se mostrou muito rápida. Em apenas 5 minutos, mais de 94% do ácido tânico foi removido. O equilíbrio foi atingido por volta de 60 minutos, com uma capacidade de adsorção de 64 mg/g. Como visto anteriormente nos ensaios preliminares de adsorção das amostras sintéticas, o carvão ativado tem uma capacidade de remoção de ácido tânico menor comparado aos adsorventes produzidos a partir da biomassa de fungo. A adsorção de ácido tânico em carvão ativado chegou ao equilíbrio após 120 minutos do processo, com uma capacidade de adsorção em torno de 42 mg/g.

Interessantemente, a adsorção de ácido tânico no bioadsorvente básico se mostrou mais rápida que em carvão ativado, possivelmente devido a maior quantidade de mesoporos, que podem estar facilitando a difusão das moléculas para os poros do adsorvente. A alta capacidade de adsorção de vanilina em carvão ativado pode ser explicada devido a alta área de superfície deste adsorvente, o que promove uma maior probabilidade de contato das pequenas moléculas de vanilina com os poros do adsorvente (FREITAS; FARINAS, 2017).

### 5.5.1. Ajuste aos modelos cinéticos

Os modelos de pseudo-primeira ordem (Equação 9) e pseudo-segunda ordem (Equação 11) foram ajustados aos dados experimentais das curvas de cinética de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico produzido com glicerol, com o auxílio do software Origin 8.0. A Figura 26 mostra os dados experimentais em termos de capacidade de adsorção do adsorvente (mg/g) em função do tempo (min) para a vanilina (a) e ácido tânico (b) ajustados aos modelos cinéticos. As constantes cinéticas obtidas a partir dos ajustes aos modelos são mostradas na Tabela 7.

$$q = q_e(1 - e^{-k_1t}) \quad (9)$$

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (11)$$

Figura 26 – Capacidade de adsorção (mg/g) do bioadsorvente básico em função do tempo (min) em relação a vanilina (a) e ácido tânico (b).

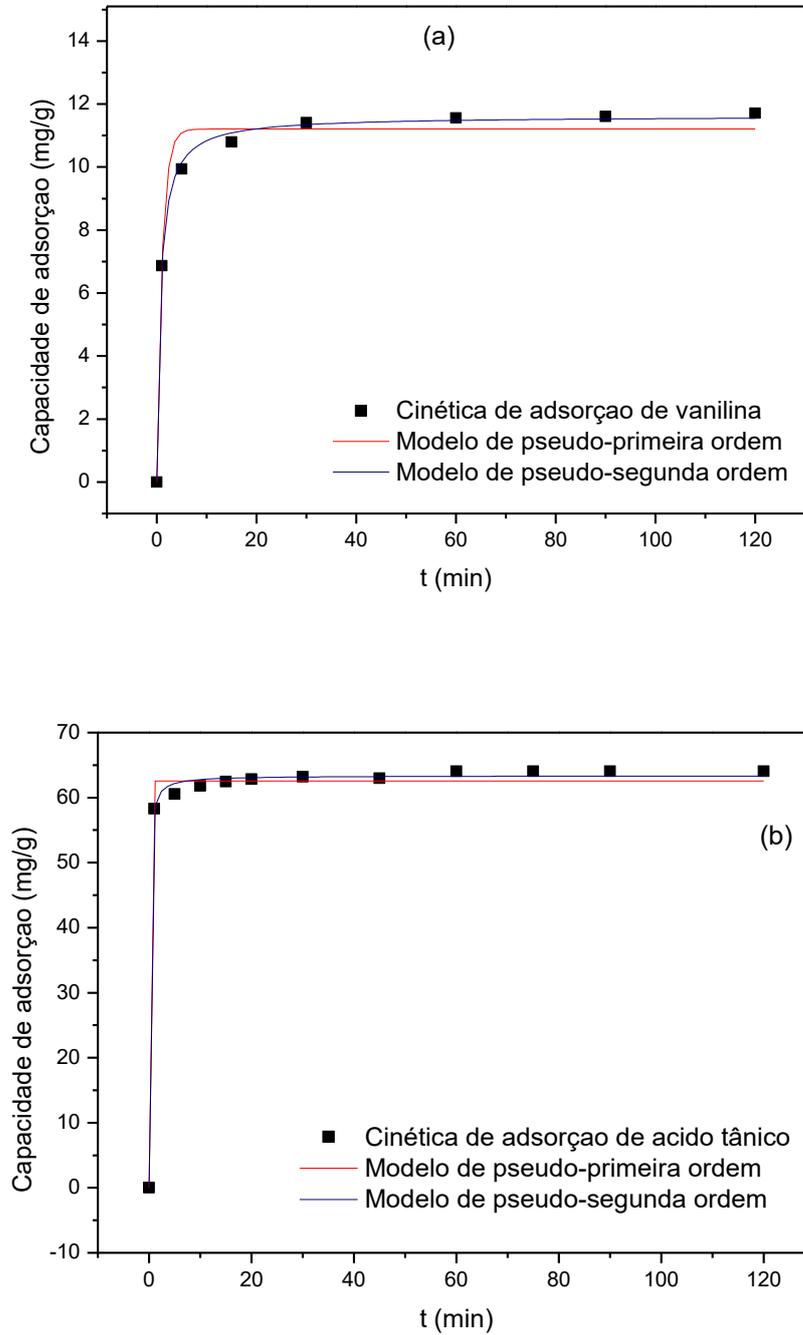


Tabela 7 – Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste aos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para a adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico.

Composto	Modelo de pseudo-primeira	Modelo de pseudo-segunda
	ordem	ordem
Vanilina	$k_1 = 0,9147 \text{ min}^{-1}$	$k_2 = 0,1187 \text{ g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$
	$q_e = 11,205 \text{ mg.g}^{-1}$	$q_e = 11,618 \text{ mg.g}^{-1}$
	$R^2 = 0,979$	$R^2 = 0,998$
Ácido Tânico	$k_1 = 50,705 \text{ min}^{-1}$	$k_2 = 0,1637 \text{ g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$
	$q_e = 62,58 \text{ mg.g}^{-1}$	$q_e = 63,373 \text{ mg.g}^{-1}$
	$R^2 = 0,990$	$R^2 = 0,998$

A partir dos dados apresentados na Tabela 7 e na Figura 26, pode-se afirmar que a adsorção de vanilina no bioadsorvente básico segue uma cinética de pseudo-segunda ordem, devido ao maior valor de  $R^2$ . A cinética de ácido tânico no bioadsorvente se adequou bem aos dois modelos, porém, sendo um pouco melhor também para o modelo de pseudo-segunda ordem. A constante cinética  $k_2$ , relacionada com a velocidade de adsorção, foi maior para a adsorção de ácido tânico no bioadsorvente. O modelo de pseudo-segunda ordem é visto na literatura como sendo amplamente aplicável para a adsorção de vários compostos poluentes por uma variedade de adsorventes (HO; MCKAY, 1999).

## 5.6. Termodinâmica da adsorção

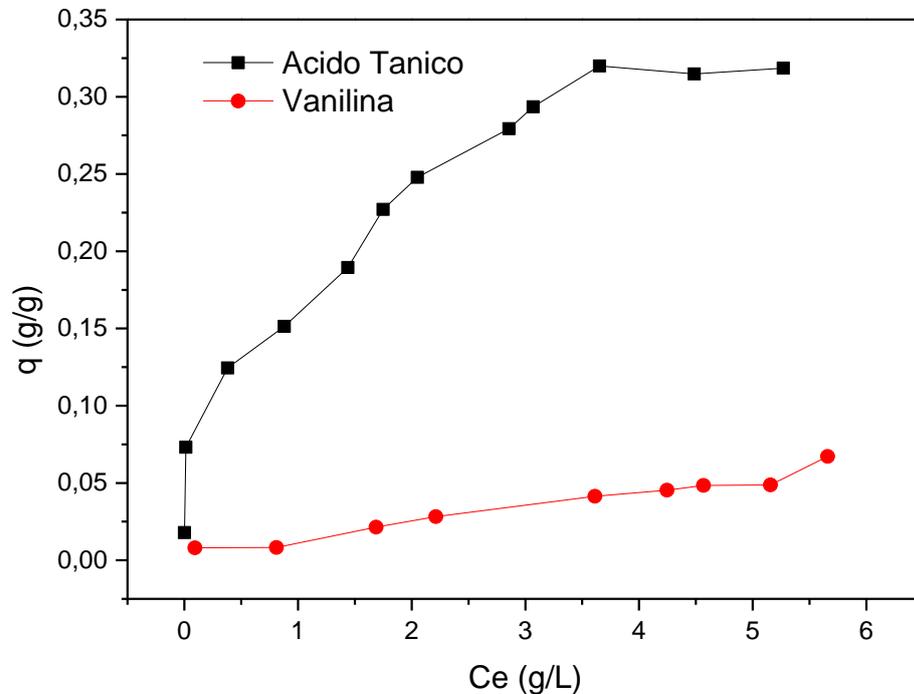
### 5.6.1. Isotermas de adsorção

Estudos de isotermas são importantes para entender melhor o comportamento do equilíbrio entre as fases sólida (adsorvente) e líquida em um sistema a temperatura constante (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009). Geralmente, o equilíbrio é descrito por uma equação de isoterma onde os parâmetros expressam as propriedades superficiais e afinidade do adsorvente em temperatura de pH constantes (GHAEDI *et al.*, 2013).

Assim, foram realizados ensaios de adsorção com as amostras sintéticas de vanilina e ácido tânico utilizando diferentes concentrações de soluto até que fosse atingido o equilíbrio da adsorção para cada condição. Os testes foram realizados na temperatura de 30 °C, pH 5, 30 rpm, utilizando 1% (m/v) de adsorvente, por 24 h. O bioadsorvente utilizado foi o produzido a partir de glicerol como fonte de carbono e sujeito ao tratamento básico, que foi o que apresentou os

melhores resultados de remoção dos fenólicos. A Figura 27 mostra as isotermas obtidas para cada composto.

Figura 27 – Isotermas de equilíbrio de adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico.



Como esperado, obteve-se a maior capacidade máxima de adsorção (mais de 0,30 g/g) para o ácido tânico no bioadsorvente básico (Figura 27), enquanto foi observada uma menor capacidade máxima de adsorção para a vanilina, de menos de 0,07 g/g. Isso pode ser explicado devido ao fato de o bioadsorvente ser um material pouco poroso, com uma área superficial muito pequena e possuir uma baixa ou nula presença de microporos, o que dificulta a adsorção de moléculas menores como a vanilina (monômero), com um tamanho de 0,72 x 0,52 nm (XIAO *et al.*, 2012).

Pode-se observar que, para o ácido tânico, a isoterma é côncava em relação ao eixo de concentração, ou seja, a adsorção é favorável e grandes quantidades de soluto podem ser adsorvidas em baixas concentrações de solventes. Já para a vanilina, a curva tem a tendência praticamente de uma reta, o que indica uma menor afinidade entre o adsorvente e o soluto. A isoterma linear sugere que a massa de adsorbato retida por unidade de massa de adsorvente é proporcional à concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida. Já a isoterma favorável (côncava) informa que a massa do adsorbato retida por unidade de adsorvente é alta para uma baixa concentração de equilíbrio de adsorbato na fase líquida (MOREIRA, 2008).

Os modelos de Langmuir, Freundlich e Redlich-Peterson foram ajustados aos dados experimentais e os parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 8. A Figura 28 (a) e (b) mostram as isotermas de adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico, respectivamente, com as curvas de ajustes dos modelos.

Os parâmetros de ajuste ( $R^2$ ) estimados pelos ajustes dos modelos e os valores do critério de informação de Akaike corrigido (AICc) estão dispostos na Tabela 9. Os valores de AICc foram determinados a fim de encontrar a melhor equação de ajuste para os dados experimentais.

Todos os modelos descreveram bem os dados experimentais da adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico, com valores de  $R^2$  maiores que 0,90 (Tabela 9). Os valores de  $R^2$  foram bem próximos entre os modelos ajustados, tanto para os dados de ácido tânico quanto para vanilina. Os valores indicam que a isoterma de Freundlich é a melhor para descrever as isotermas de adsorção dos compostos, apresentando um valor de  $R^2$  um pouco maior que os demais. Também de acordo com os valores do critério de Akaike corrigido, o modelo que apresentou o melhor ajuste para as isotermas de vanilina e ácido tânico foi o de Freundlich, pois apresentou um valor menor do AICc calculado.

O modelo de Freundlich sugere que a adsorção ocorre na superfície de sítios heterogêneos de adsorção e que os sítios de interações mais fortes são ocupados primeiro (DAVIS *et al.*, 2003). Em geral, em uma adsorção favorável, o valor de  $n$  (constante de Freundlich) tende a estar entre 1 e 10. Quanto maior o valor de  $n$  (menor o valor de  $1/n$ ), mais forte a interação entre o adsorbato e o adsorvente. Por outro lado, quando o valor de  $1/n$  for igual a 1, isso indica que a adsorção é linear, ou seja, as energias são idênticas para todos os sítios de adsorção (DELLE-SITE, 2001). O valor de  $n$  para a adsorção de ácido tânico foi de 2,774 (Tabela 8), indicando uma maior afinidade entre o adsorbato e adsorvente, enquanto o valor de  $n$  para a adsorção de vanilina foi próximo de 1 (1,135; Tabela 8), com isso, o valor de  $1/n$  se aproxima de 1, indicando o comportamento de isoterma linear, onde há uma menor afinidade entre adsorvente e adsorbato.

Figura 28 – Isotermas de adsorção de vanilina (a) e ácido tânico (b), a 30 °C, pH 5, 30 rpm com ajuste dos modelos.

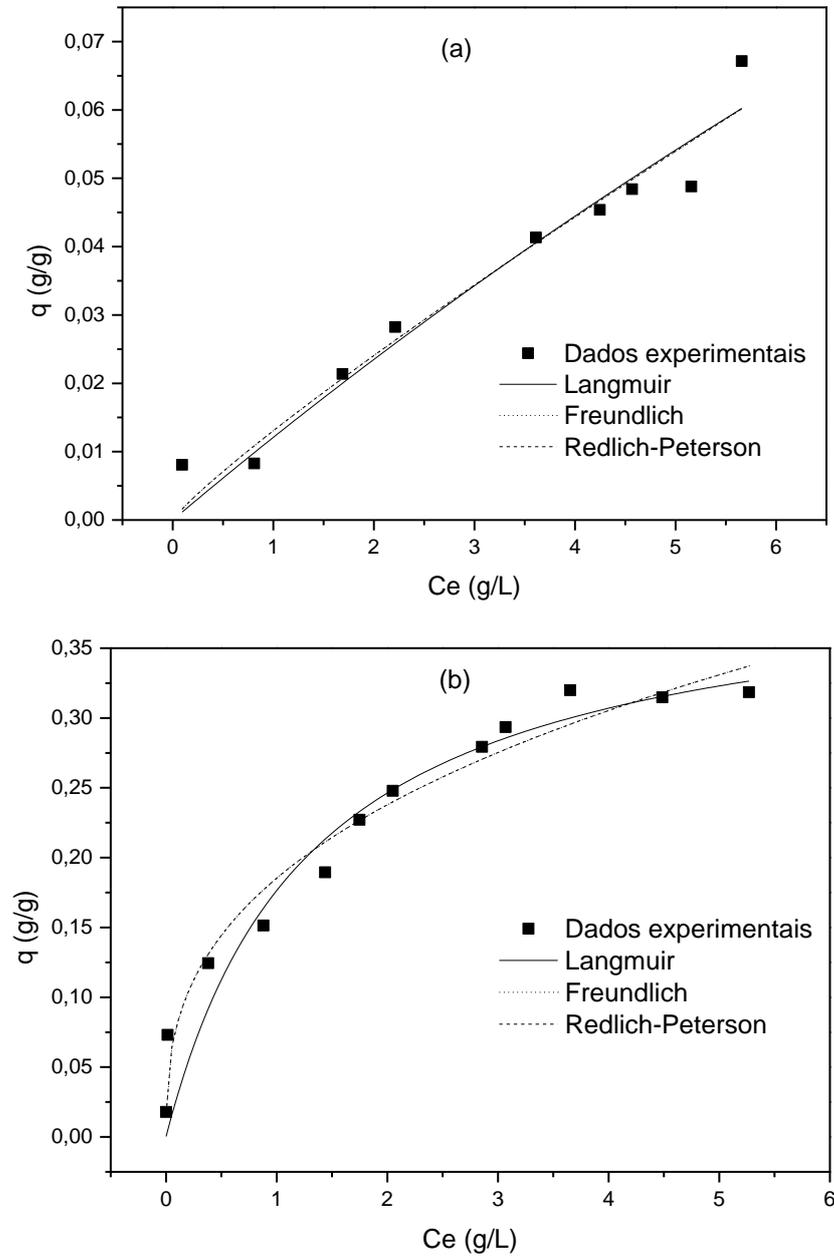


Tabela 8 – Parâmetros estimados das equações das isotermas utilizadas para descrever os dados experimentais da adsorção de ácido tânico e vanilina a 30 °C.

Composto	Langmuir	Freundlich	Redlich-Peterson
Vanilina	$K_L = 0,0301 \text{ L/g}$	$K_F = 0,131$ $(\text{g/g}) \cdot (\text{L/g})^{1/n}$	$K = 16,715 \text{ L/g}$
	$Q = 0,4138 \text{ g/g}$	$n = 1,135$	$a = 1278,3 \text{ L/g}$ $b = 0,119$
Ácido Tânico	$K_L = 0,7635 \text{ L/g}$	$K_F = 0,1853$ $(\text{g/g}) \cdot (\text{L/g})^{1/n}$	$K = 92430 \text{ L/g}$
	$Q = 0,4076 \text{ g/g}$	$n = 2,774$	$a = 498862 \text{ L/g}$ $b = 0,639$

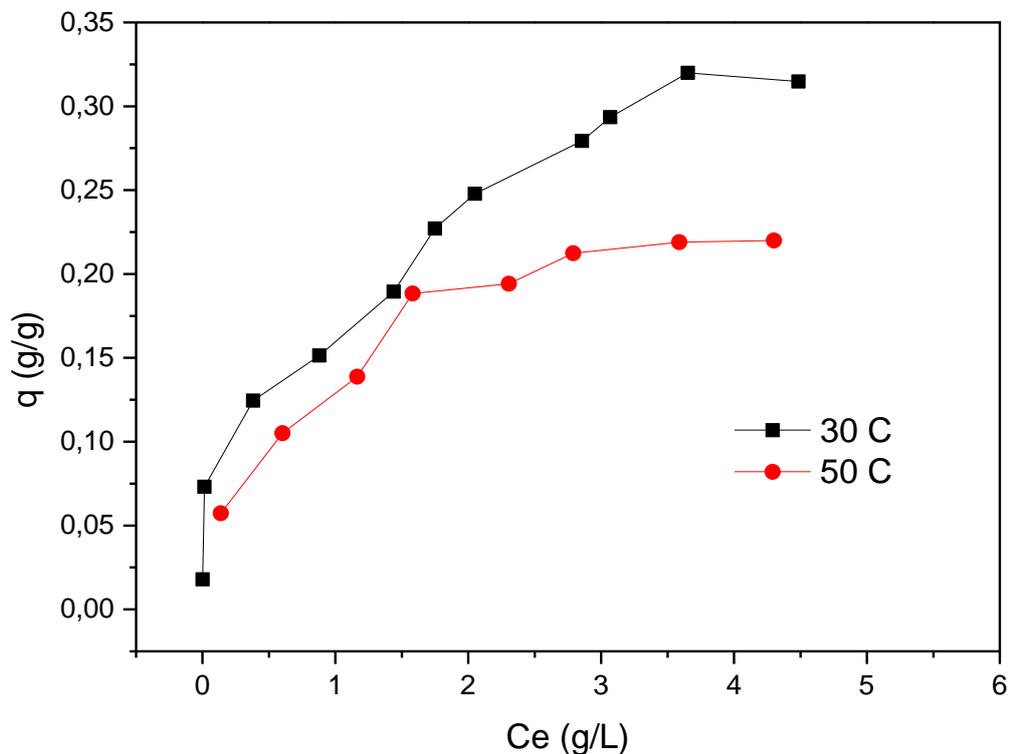
Tabela 9 – Coeficientes de correlação ( $R^2$ ) e critério de informação de Akaike corrigido (AICc) das equações das isotermas utilizadas para descrever os dados experimentais.

Parâmetro	Modelo	Vanilina	Ácido Tânico
$R^2$	Langmuir	0,9441	0,9296
	Freundlich	0,9468	0,9655
	Redlich-Peterson	0,9380	0,9616
AICc	Langmuir	-87,73	-82,44
	Freundlich	-88,23	-93,20
	Redlich-Peterson	-80,99	-88,48

Também foram realizados ensaios de adsorção de ácido tânico à temperatura de 50 °C a fim de obter sua isoterma nessa temperatura, para avaliar a influência da temperatura no processo de adsorção de ácido tânico no bioadsorvente básico. As isotermas de ácido tânico a 30 e 50 °C estão apresentadas na Figura 29.

Pode-se observar que o aumento da temperatura de 30 para 50 °C provocou uma diminuição na capacidade máxima de adsorção do bioadsorvente básico pelo ácido tânico. Isto sugere que o processo de bioadsorção de ácido tânico pela biomassa de fungo é exotérmico em sua natureza. Este comportamento já era esperado, pois o aumento da temperatura provoca um aumento na energia cinética das moléculas, o que pode dificultar o processo de adsorção.

Figura 29 – Isotermas de ácido tânico no bioadsorvente básico a 30 e 50 °C.



### 5.7. Hidrólise Enzimática

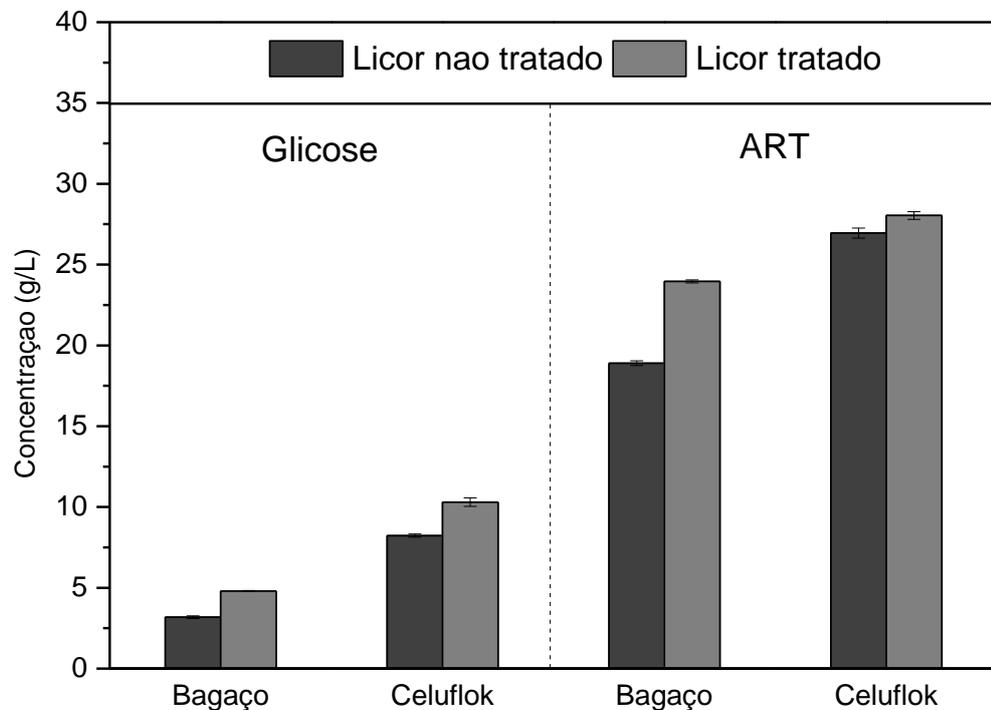
Ensaio de hidrólise de celulose comercial (Celuflok) e do bagaço de cana-de-açúcar proveniente do pré-tratamento hidrotérmico foram realizadas na presença dos inibidores presentes no licor do pré-tratamento do bagaço. Os ensaios foram realizados com o licor com e sem o tratamento com os adsorventes para a remoção desses compostos, a fim de avaliar o aumento da conversão de açúcares após a remoção destes inibidores pelos bioadsorventes.

Primeiramente foram feitos ensaios de adsorção dos fenólicos totais do licor do bagaço pré-tratado LHW no pH original do licor ( $3,3 \pm 0,3$ ) a temperatura de 30 °C, por 24 h a 30 rpm. Os ensaios foram feitos com uma carga de 5% do bioadsorvente básico produzido com glicerol. A concentração inicial de compostos fenólicos do licor foi de  $2,59 \pm 0,07$  g AGE/L. Nessas condições, o bioadsorvente foi capaz de remover em torno de 40% dos fenólicos totais presentes no licor, resultando em uma concentração final de  $1,55 \pm 0,02$  g AGE/L.

Os ensaios de hidrólise foram realizados utilizando a Celuflok e o bagaço como fonte de celulose, com as soluções de licor tratado e não tratado, carga de enzima de 2 FPU/ g celulose para a Celuflok e 2 FPU/g sólidos totais para o bagaço, a 50 °C, 30 rpm, por 24 h. O pH dos licores tratado e não tratado foram ajustados para 5. A Figura 30 apresenta o gráfico com os

valores de concentração de glicose e ART liberados após os experimentos de hidrólise enzimática.

Figura 30 – Concentração de glicose e ART liberadas após a hidrólise enzimática do bagaço e celuflok a 50 °C, 30 rpm, por 24 h.



Na hidrólise da Celuflok com o licor não tratado, foram obtidas concentrações de 8,2 g/L de glicose e 26,9 g/L de açúcares redutores totais. Já para os experimentos com o licor após remover 40% dos fenólicos totais, a concentração de glicose e ART liberados foi de 10,3 e 28 g/L, respectivamente. Houve um aumento de mais de 25% na conversão de glicose, e para os açúcares redutores totais o aumento foi menor, de 4%.

Nos experimentos de hidrólise do bagaço hidrotérmico foram obtidas concentrações de 3,2 g/L de glicose e 18,9 g/L de ART, com o licor não tratado. Já com o licor após a adsorção dos fenólicos totais pelo bioadsorvente, obtiveram-se concentrações de 4,8 e 24 g/L de glicose e ART, respectivamente, resultando em um aumento bastante significativo de 50% na liberação de glicose após a hidrólise, e de 27% para a conversão de açúcares redutores totais. Este resultado foi muito interessante, pois embora a porcentagem de remoção dos fenólicos totais pelo bioadsorvente não tenha sido um valor tão alto, provocou um aumento significativo na conversão dos açúcares na etapa de hidrólise.

No licor proveniente do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar estão presentes diversos tipos de compostos fenólicos, gerados a partir da degradação da lignina, dentre eles

compostos monoméricos e oligoméricos. Como observado neste trabalho, a partir das caracterizações e dos ensaios de adsorção com amostras sintéticas e fenólicos totais, o bioadsorvente produzido a partir da biomassa de fungo possui características que garantem uma afinidade maior com moléculas maiores, como os oligômeros, apresentando uma capacidade de adsorção maior desses compostos em comparação aos monômeros, que possuem diâmetro de partícula bem menores.

Foi reportado na literatura que os compostos oligoméricos, como o ácido tânico, podem exercer uma inibição maior que os monômeros na atividade enzimática durante a hidrólise (FREITAS; FARINAS, 2017, TEIJIRIAN; XU, 2011; XIMENES *et al.*, 2010). Assim, mesmo que o bioadsorvente estudado não apresentou uma capacidade muito alta (em torno de 40%) de adsorção dos compostos fenólicos totais presentes no licor, o fato de ele estar adsorvendo mais os compostos oligoméricos, que estão presentes em menores proporções que o monoméricos, surte um efeito bastante significativo e promissor no aumento da conversão de açúcares na etapa de hidrólise enzimática.

Freitas e Farinas (2017) utilizaram a fuligem do bagaço de cana-de-açúcar como adsorvente para remoção dos fenólicos inibidores presentes no licor do pré-tratamento e também realizaram experimentos de hidrólise enzimática com o licor após a remoção dos fenólicos pelo adsorvente. A fuligem é um material altamente microporoso (maior capacidade de adsorção de monômeros) e foi capaz de remover mais de 80% dos fenólicos totais presentes no licor, que possuem uma proporção maior de monoméricos, por isso uma alta porcentagem de remoção dos fenólicos totais. Realizaram a hidrólise do bagaço na presença do licor após a remoção dos fenólicos e obtiveram um aumento na liberação de glicose de 52%.

Um aspecto importante que deve ser levado em conta na seleção de um adsorvente para a remoção de inibidores do processo de conversão da biomassa é que a perda de açúcar deve ser evitada e/ou minimizada durante a adsorção. De modo a investigar a possível perda de açúcares, foram realizados experimentos de adsorção de glicose utilizando o bioadsorvente básico com uma carga de 5% (m/v). Os experimentos foram conduzidos em estufa com rotação 360° a 30 °C, 30 rpm, por 24 h, com uma concentração inicial de glicose de 10 g/L. Os resultados mostraram que houve uma adsorção de apenas 12% de açúcares puros de glicose ao usar a biomassa tratada com solução básica como bioadsorvente. Tais resultados sustentam as vantagens do uso da biomassa de fungo como adsorvente para remoção dos compostos fenólicos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

## 6. CONCLUSÕES

O estudo da aplicação de biomassa de fungo como bioadsorvente para a remoção de compostos fenólicos inibidores presentes no licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar demonstrou a viabilidade da utilização da biomassa de *Aspergillus niger* como adsorvente para adsorção desses compostos.

O cultivo do fungo com glicose e glicerol como fonte de carbono mostraram rendimentos de produção de biomassa bem próximos. Tendo em vista que o glicerol é um produto mais acessível e de menor custo, se torna atrativo seu uso como fonte de carbono para o cultivo do fungo *A. niger*.

No estudo de adsorção com as amostras sintéticas de fenólicos de vanilina e ácido tânico, os adsorventes demonstraram forte afinidade pelo ácido tânico, com uma remoção de quase 100% para 8% (m/v) de carga do adsorvente tratado com solução básica e produzido com glicerol como fonte de carbono. Já para a vanilina, a afinidade foi menor, com uma remoção de pouco mais de 30% para 8% (m/v) da biomassa tratada com solução básica e obtida por glicose. Provavelmente as características porosas dos adsorventes estão favorecendo a adsorção de moléculas maiores, como o ácido tânico. O bioadsorvente básico foi capaz de remover mais de 40% dos fenólicos totais presentes no licor do pré-tratamento a 50 °C e pH do licor ajustado para 5. O aumento da carga de adsorvente proporcionou um aumento na porcentagem de remoção dos compostos. Entretanto, diferentes condições de pH e temperatura estudados demonstraram pouca influência na capacidade de adsorção dos bioadsorventes.

Os bioadsorventes obtidos a partir do tratamento com solução básica se mostraram como os mais eficazes na remoção de todos os compostos estudados. Conforme visto nas caracterizações de difração de raios X, análise elementar e termogravimétrica, o tratamento básico está, possivelmente, modificando a organização estrutural dos bioadsorventes, e assim, aumentando suas capacidades de adsorção.

A cinética de adsorção de vanilina e ácido tânico no bioadsorvente básico se mostraram muito rápidas e as curvas se ajustaram melhor a modelos de pseudo-segunda ordem. As isotermas de adsorção mostraram que a adsorção de ácido tânico é mais favorável que a de vanilina, utilizando o bioadsorvente básico e o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de Freundlich. A capacidade de adsorção de ácido tânico diminuiu com o aumento da temperatura, indicando que o processo de adsorção é exotérmico em sua natureza.

Com a remoção de em torno de 40% dos compostos fenólicos inibidores presentes no licor do pré-tratamento do bagaço pelo bioadsorvente básico, foi possível aumentar em 50% a

conversão de glicose na hidrólise enzimática do bagaço hidrotérmico. Tais resultados demonstram que o uso da biomassa de fungo como adsorvente para remoção dos inibidores do processo de hidrólise enzimática em biorrefinarias é bastante promissor.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Como sugestão para trabalhos futuros, destacam-se os seguintes estudos:

- Testar outros tipos de tratamentos na biomassa microbiana de modo a tentar aumentar sua capacidade de adsorção dos compostos fenólicos presentes no licor do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.
- Realizar testes de fermentação alcóolica com o licor tratado e não tratado com os bioadsorventes após a hidrólise enzimática.
- Realizar uma análise econômica da viabilidade do uso da biomassa microbiana como bioadsorvente para remoção dos inibidores nas biorrefinarias.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; RAJORIA, P.; RANI, A. Adsorption of tannic acid from aqueous solution onto chitosan/NaOH/fly ash composites: Equilibrium, kinetics, thermodynamics and modeling. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 1486–1499, 2018.
- ALVIRA, P. *et al* . Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- AN, J. H.; DULTZ, S. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 4, p. 256–264, 2007.
- ANIA, C. O.; PARRA, J. B.; PIS, J. J. Effect of texture and surface chemistry on adsorptive capacities of activated carbons for phenolic compounds removal. **Fuel Processing Technology**, v. 77-78, p. 337-343, 2002.
- ANUAR, M. R.; ZUHAIRI, A. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208-223, 2016.
- AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption : a theoretical analysis. v. 276, p. 47–52, 2004.
- BANO, A. *et al* . Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. **Chemosphere**, v. 199, p. 218–222, 2018.
- BANSAL, R. C.; GOYAL, M. **Activated Carbon Adsorption**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 497.
- BARBOSA, H. F. G. *et al* . A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, n. August, p. 115232, 2019.
- BAYRAMOGLU, G., ARICA, M. Y. Removal of heavy mercury (II), cadmium (II) and zinc (II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. **Chemical Engineering Journal**, v. 143, p. 133-140, 2008.

BINIAK, S. *et al* . The characterization of activated carbons with oxygen and nitrogen surface groups. **Carbon**, v. 35, n. 12, p. 1799-1810, 1997.

BONATE, P. L. **Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation**. San Antonio: Springer, 2011.

BORGES, J. G.; DE SOUSA COSTA, L. A.; DRUZIAN, J. I. Produção e caracterização de biomassa extracelular obtida por fermentação submersa usando lasidiopodia theobromae isolado do cacau. **Polímeros**, v. 24, n. 1, p. 52–57, 2014.

BORIOVÁ, K. *et al* . Removal of aluminium from aqueous solution by four wild-type strains of *Aspergillus niger*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 2, p. 291–296, 2019.

CAMPANA Fº, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros**, v. 11, n. 4, p. 169–173, 2001.

CARDOSO, M. B. Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CHANDEL, A. K. *et al* . The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, n. June, p. 370–381, 2018.

CLARK, J. H. Green chemistry for the second generation biorefinery - sustainable chemical manufacturing based on biomass. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. May, p. 603–609, 2007.

COONEY, D. O. Adsorption Design for Wastewater Treatment, USA: **Lewis Publishers**, 1998.

CRINI, G.; BADOT, P. M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 4, p. 399-447, 2008.

CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Effect of a novel method for in-house cellulase production on 2G ethanol yields. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 224-229, 2017.

DA SILVA DELABONA, P. *et al* . Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 617-626, 2016.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311-4330, 2003.

DELGADO, N. *et al* . Pharmaceutical emerging pollutants removal from water using powdered activated carbon: Study of kinetics and adsorption equilibrium. **Journal of Environmental Management**, v. 236, n. September 2018, p. 301–308, 2019.

DEZAM, A.P.G.; VASCONCELLOS, V.M.; LACAVALA, P.T.; Farinas, C.S. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017.

DING, B. *et al* . Fabrication of multi-functional porous microspheres in a modular fashion for the detection, adsorption, and removal of pollutants in wastewater. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 522, p. 1–9, 2018.

DING, H. *et al* . Efficient thorium removal by alginate-immobilized *Aspergillus niger*: characterization, kinetics, thermodynamic and mechanism analysis. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 319, n. 3, p. 869–880, 2019a.

DING, H. *et al* . Alginate-immobilized *Aspergillus niger*: Characterization and biosorption removal of thorium ions from radioactive wastewater. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 562, n. August 2018, p. 186–195, 2019b.

FARKAS, V. Structure and biosynthesis of fungal cell walls: Methodological approaches. **Folia Microbiologia**, v. 48, n. 4, p. 469-478, 2003.

FREITAS, J. V.; FARINAS, C. S. Sugarcane Bagasse Fly Ash as a No-Cost Adsorbent for Removal of Phenolic Inhibitors and Improvement of Biomass Saccharification. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 11727–11736, 2017.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Dye biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 2, p. 139–145, 2002.

FUKUDA, E. K. *et al* . Fungal cell wall polysaccharides: Purification and characterization.

**Semina: Ciencias Agrarias**, v. 30, n. 1, p. 117–134, 2009.

FURUYA, E. G. *et al* . A fundamental analysis of the isotherm for the adsorption of phenolic compounds on activated carbon. **Separation and purification technology**, v. 11, n. 2, p. 69-78, 1997.

GADD, G. M. Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 13–28, 2009.

GALLAGHER, K., HEALY, M. G., ALLEN, S. J. Biosorption of synthetic dye and metal ions from aqueous solutions using fungal biomass. **Global Environmental Biotechnology**, v. 66, p. 27-50, 1997.

GÁPLOVSKÁ, K. *et al* . Study of the binding sites in the biomass of *Aspergillus niger* wild-type strains by FTIR spectroscopy. **Chemical Papers**, v. 72, n. 9, p. 2283–2288, 2018.

GHAEDI, M.; HAJATI, S.; KARIMI, F.; BARAZESH, B.; GHEZELBASH, G. Equilibrium, kinetic and isotherm of some metal ion biosorption. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 987-992.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. Adsorption, Surface area and Porosity. London: Academic Press, 1982.

GUILHERME, A. A. Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2014.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. v. 100, n. 1, p. 10–18, 2009.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 451-465, 1999.

HO, Y. S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 3, p. 681–689, 2006.

HORRUTINER, Y. E. *et al* . Caracterización de la biomasa inactiva de *aspergillus niger* o-5

como sorbente de PB (II). **Quimica Nova**, v. 34, n. 7, p. 1141–1146, 2011.

ISHIZAKI, C.; I, M. Surface oxide structures on a commercial activated carbon. **Carbon**, Caracas, p. 409-412, 1981.

JAVAID, A.; BAJWA, R.; MANZOOR, T. Biosorption of heavy metals by pretreated biomass of *Aspergillus niger*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 1, p. 419–425, 2011.

JAVANBAKHT, V.; ALAVI, S. A.; ZILOUEI, H. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. **Water Science and Technology**, v. 69, n. 9, p. 1775–1787, 2014.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 221–227, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 2, p. 109–113, 1998.

KHALAF, M. A. Biosorption of reactive dye from textile wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6631–6634, 2008.

KHANI, M. H.; PAHLAVANZADEH, H.; ALIZADEH, K. Biosorption of strontium from aqueous solution by fungus *Aspergillus terreus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p. 2408–2418, 2012.

KIM, Y. *et al* . Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4–5, p. 408–415, 2011.

KLAIC, R. *et al* . A novel combined mechanical-biological approach to improve rock phosphate solubilization. **International Journal of Mineral Processing**, v. 161, p. 50–58, 2017.

KO, J. K. *et al* . Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 252-62, 2015.

KUMAR, R. *et al* . Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 347-356, 2016.

LÁSZLÓ, K.; PODKOSCIELNY, P.; DABROWSKI, A. Heterogeneity of Polymer-Based Active Carbons in Adsorption of Aqueous Solutions of Phenol and 2,3,4-Trichlorophenol. **Langmuir**, v. 19, p. 5287-5294, 2003.

LI, L.; LIU, S.; LIU, J. Surface modification of coconut shell based activated carbon for the improvement of hydrophobic VOC removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 2, p. 683-690, 2011.

LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, v. 215, 2016.

LIN, S.-H.; JUANG, R.-S. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 3, p. 1336–1349, 2009.

LIU, *et al* . Scalable production, fast purification, and spray drying of native Pycnoporus laccase and circular dichroism characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 600-609, 2016.

LOUKIDOU, M. X. *et al* . Removal of As (V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. **Water Research**, v. 37, p. 4544-4552, 2003.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2<sup>nd</sup> generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 22, 2012.

MALGAS, S. *et al* . The inhibitory effects of various substrate pre-treatment by-products and wash liquors on mannanolytic enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 123, p. 132–140, 2016.

MARTIN, C. *et al* . Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 699-716, 2002.

MARTÍN, J. *et al* . Removal of priority and emerging pollutants from aqueous media by

adsorption onto synthetic organo-functionalized high-charge swelling micas. **Environmental Research**, v. 164, n. January, p. 488–494, 2018.

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 549–558, 2009.

MENON, V; RAO, M. Trends in Bioconversion of Lignocelluloses: Biofuel, Platform Chemicals & Biorefinery Concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MES-HARTREE, M.; SADDLER, J. N. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 8, p. 531-536, 1983.

MHLONGO, S. I. *et al* . Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 81, p. 16–22, 2015.

MICHELIN, M. *et al* . Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 275–278, 2016.

MONTEIRO, M. R. *et al* . Glycerol from biodiesel production: Technological paths for sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 88, n. November 2017, p. 109–122, 2018.

MONTES-MORÁN, M. A. *et al* . On the nature of basic sites on carbon surfaces: an overview. **Carbon**, v. 42, n. 7, p. 1219–1225, 2004.

MOSIER, N. *et al* . Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MUKHERJEE, S. *et al* . Removal of phenols from water environment by activated carbon, bagasse ash and wood charcoal. **Chemical Engineering Journal**, v. 129, n. 1–3, p. 133-142, 2007.

MURALEEDHARAN, T. R., VENKOBACHAR, C. Mechanism of biosorption of copper(II) by *Ganoderma lucidum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 320-325, 1990.

- MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.
- NITSOS, C. K.; MATIS, K. A.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. **ChemSusChem**, v. 6, n. 1, p. 110–122, 2013.
- OLIVA, J. M. *et al.* Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 141-154, 2003.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.
- ÖNAL, Y. Equilibrium , kinetic and thermodynamic adsorptions of the environmental pollutant tannic acid onto activated carbon. v. 251, p. 146–152, 2010.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v. 321, p. 523-536, 1987.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.
- PAN, X. *et al.* Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology – Part A**, v. 124, p. 1069-1079, 2005.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. K. Introduction to Spectroscopy. Saunders Golden Sunburst Series, 1979.
- PINTO, A. S. S.; RIBEIRO, M. P. A.; FARINAS, C. S. Fast spectroscopic monitoring of inhibitors in the 2G ethanol process. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 148-154, 2018.

- QIN, L. *et al* . Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 70, 2016.
- RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 165–171, 2002.
- REN, B. *et al* . Biosorption of Cr(vi) from aqueous solution using dormant spores of *Aspergillus niger*. **RSC Advances**, v. 8, n. 67, p. 38157–38165, 2018.
- ROBINSON, J. W. Practical Handbook of Spectroscopy. CRC Press, Boca Raton, 1991.
- ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. W. Adsorption by Powders and Porous Solids, Academic Press, 1-25, 1999.
- SAYGIDEGER, S. *et al* . Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: effect of physicochemical environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, p. 96-104, 2005.
- SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 2, p. 235–251, 2019.
- SHROFF, K. A.; VAIDYA, V. K. Effect of pre-treatments on the biosorption of Chromium (VI) ions by the dead biomass of *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 294–304, 2012.
- SLEJKO, F., L. Adsorption technology : a step-by-step approach to process evaluation and application. M. Dekker, New York, 1985.
- SOUZA, R. B. A. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar. 124 f. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016.
- SPANELOVA, M., MACHOVIC, V., BREZINA, M. Characterization and sorption properties of *Aspergillus niger* waste biomass. **Central European Journal of Chemistry**, p. 192-200, 2003.
- SPERANDIO, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic

biorefinery context: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 142, n. December 2018, p. 109–123, 2019.

SQUINCA, P.; BADINO, ALBERTO C.; FARINAS, C. S. A closed-loop strategy for endoglucanase production using sugarcane bagasse liquefied by a home-made enzymatic cocktail. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 976-982, 2018.

SUN, S. *et al* . The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

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

TALARO, K. P.; TALARO, A. Foundations in microbiology. McGraw-Hill College. Blacklick, Ohio, USA. 4 ed, 2002.

TANAHASHI, M. Characterization and Degradation Mechanisms of Wood Components by Steam Explosion and Utilization of Exploded Wood. **Wood Research**, no. 77, 1990.

TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 239-247, 2011.

TERZYK, A. P. Further insights into the role of carbon surface functionalities in the mechanism of phenol adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 268, n. 2, p. 301-329, 2003.

TIGINI, V. *et al* . Influence of culture medium on fungal biomass composition and biosorption effectiveness. **Current Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 50–59, 2012.

TUNALI S., KIRAN I., AKAR T. Chromium (VI) biosorption characteristics of *Neurospora crossa* fungal biomass. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 681-689, 2005.

VALE, M. DO S. *et al* . Cr and Zn biosorption by *Aspergillus niger*. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 6, 2016.

VIEIRA, P. A. *et al* . Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. Issues 2–3, p. 1272–1278, 2009.

VILLACANAÑAS, F. *et al* . Adsorption of simple aromatic compounds on activated carbons. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 293, n. 1, p. 128–136, 2006.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009.

WU, J.; YU, H. Q. Biosorption of 2,4-dichlorophenol from aqueous solution by *Phanerochaete chrysosporium* biomass: Isotherms, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 1, p. 498–508, 2006.

XIAO, G. Q.; LONG, L. P.; WANG, J. L. Synthesis of the water-compatible p-acetaminophen resin and its adsorption performances for vanillin in aqueous solution. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 1, p. 123–126, 2012.

XIMENES *et al* . Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54-60, 2011.

XIMENES, E. *et al* . Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3–4, p. 170-176, 2010.

XU, B. X.; CHANG, S. K. C. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. v. 57, n. 11, p. 4754–4764, 2009.

ZHAI, R.; HU, J.; SADDLER, J. N. What Are the Major Components in Steam Pretreated Lignocellulosic Biomass That Inhibit the Efficacy of Cellulase Enzyme Mixtures? **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 3429–3436, 2016.

ZHU, L. *et al* . Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3817–3828, 2008.

ZHUANG, X. *et al* . Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 68-75, 2016.

## APÊNDICE

Curvas de calibração utilizando o reagente Folin-Ciocalteu para vanilina, ácido tânico e fenólicos totais presentes no licor utilizando ácido gálico como padrão.

Figura A1 – Curva de calibração para a vanilina

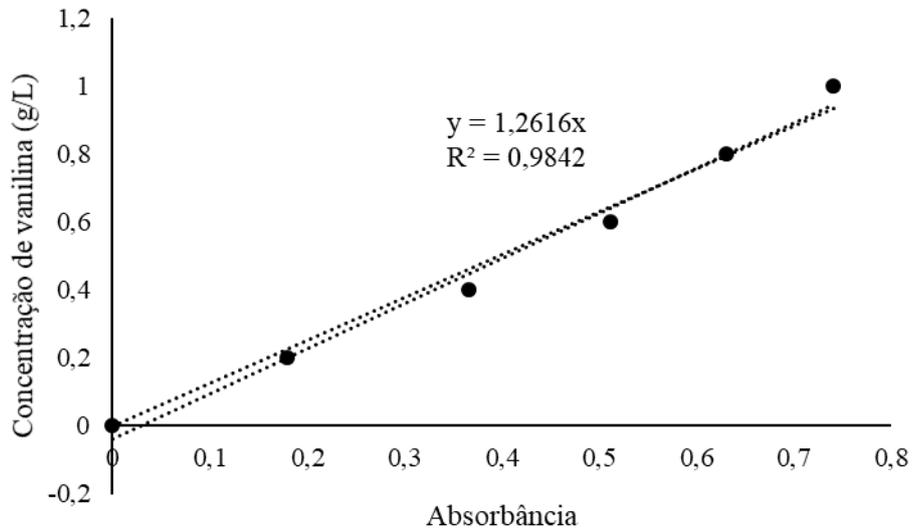


Figura A2 – Curva de calibração para o ácido tânico

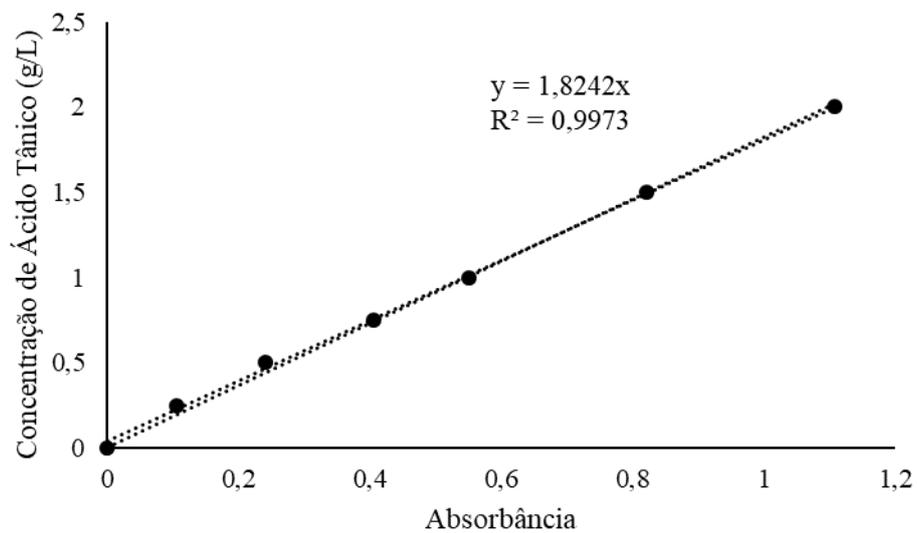


Figura A3 – Curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão para os fenólicos totais presentes no licor.

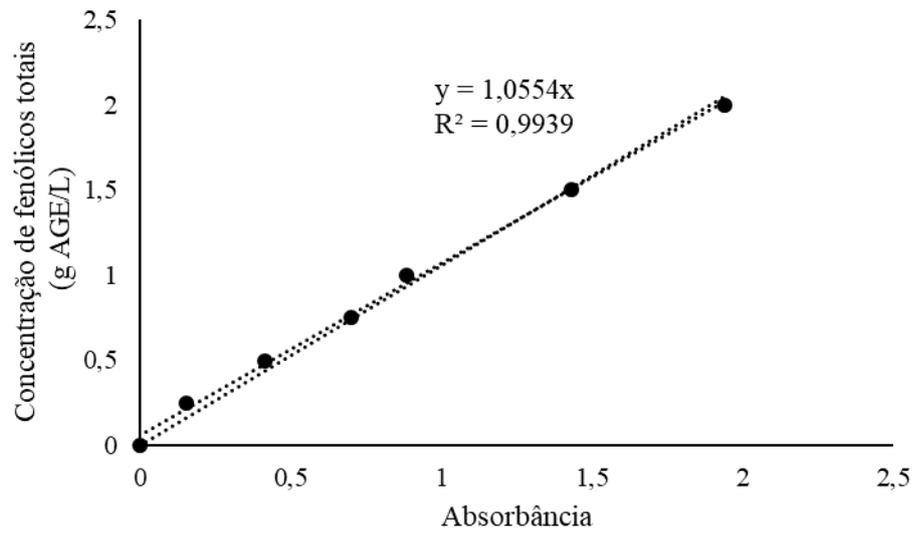


Figura A4 – Curva de calibração de DNS para os açúcares redutores totais presentes no licor.

