

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**CARACTERIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO
DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

ISAMARA GODOI

CASCAVEL – PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO 2016

ISAMARA GODOI

**CARACTERIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO
DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. LUCIANE SENE

CASCADEL – PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

531c

Godoi, Isamara
Caracterização e aproveitamento de resíduos gerados na produção de etanol de segunda geração./Isamara Godoi. Cascavel, 2015.

88 p.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciane Sene

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Precipitação de CaO. 2. Calagem. 3. Licor negro. 4. Lignina. 5. Adsorção de chumbo. I. Sene, Luciane. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 631.41

660.284

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^ª/965.*

ISAMARA GODOI

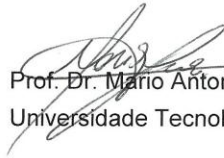
"CARACTERIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:



Orientadora: Prof.ª Dra. Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel



Prof. Dr. Mario Antonio Alves da Cunha

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/ Pato Branco



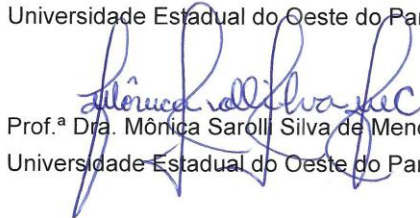
Prof.ª Dra. Morgana Suszek Gonçalves

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR/ Umuarama



Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel



Prof.ª Dra. Mônica Sarolli Silva de Mendonça Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel

Cascavel, 15 de fevereiro de 2016.

BIOGRAFIA

Isamara Godoi, nascida no ano de 1980, natural de Realeza - PR. Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela UNIPAR (2005); acadêmica de Iniciação Científica PIBIC (2004-2005) e Especialista em Morfofisiologia Humana pela UNIOESTE (2006). Docente da Universidade Paranaense de Francisco Beltrão – PR (2006), das turmas de Biomedicina (disciplina de Patologia) e Nutrição (disciplina de Fisiologia da Nutrição), docente em regime PSS pelo Núcleo Regional de Educação em Cascavel – PR, ministrando aulas de Biologia e Ciências (2006-2009). Obteve o grau de Mestre em Engenharia Agrícola na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus de Cascavel, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, com pesquisa desenvolvida sob orientação da Prof^a. Dr^a. Luciane Sene (2012). Doutoranda em Engenharia Agrícola na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus de Cascavel, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental sob orientação da Prof^a. Dr^a. Luciane Sene.

"As coisas mais simples da vida são as mais extraordinárias, e só os sábios conseguem vê-las."

(Paulo Coelho)

A Deus pelo seu poder e cuidado com minha vida, ao meu esposo pelo carinho, apoio e companheirismo e aos meus pais Gilberto Godoi e Neusa Santana Dias Godoi, pelo amor, vida e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo cuidado, proteção e pelas oportunidades concedidas em minha vida.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Cascavel*, e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso;

À Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pela concessão de bolsa de estudos;

À professora Dr^a Luciane Sene pela orientação, oportunidade, confiança e amizade durante todo o Doutorado;

Ao meu esposo pela compreensão, apoio e carinho durante este período da minha vida;

Aos que embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

CARACTERIZAÇÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

RESUMO GERAL

Pesquisas sobre o aproveitamento de biomassas de composição lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração têm recebido atenção especial como possível contribuição para a sustentabilidade energética. Embora tal atividade utilize principalmente resíduos da agroindústria, gera outros resíduos sólidos e líquidos impactantes para o meio ambiente por conterem alta concentração de elementos ácidos, alcalinos e tóxicos. Por conseguinte, este trabalho visou à caracterização química e ao aproveitamento dos resíduos gerados na obtenção de etanol de segunda geração, em particular o precipitado formado no processo de destoxificação por *overliming* do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e o resíduo líquido gerado na etapa de deslignificação da celulignina durante o pré-tratamento para facilitar o processo de sacarificação enzimática da celulose. Inicialmente o resíduo sólido foi submetido a análises físico-químicas, granulométrica, análise de metais, ao teor de compostos inibidores para a atividade microbiana, tais como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, açúcares e teor de umidade. A determinação do potencial do resíduo como corretivo da acidez do solo foi realizada através da análise dos atributos da qualidade dos corretivos do solo (PN, PRNT, teores de Ca e Mg e granulometria). O resíduo sólido foi também avaliado quanto à sua influência nas comunidades bacterianas através de técnicas microbiológicas tradicionais, bioensaios com minhocas e testes de germinação de sementes de alface. O resíduo líquido foi caracterizado quanto aos teores de metais presentes e compostos inibidores. A lignina presente no licor foi precipitada com ácido sulfúrico e, após caracterização por espectrometria de infravermelho, utilizada como biossorvente na adsorção de íons chumbo em solução aquosa. Os resultados indicam que os resíduos gerados na obtenção de etanol de segunda geração possuem potencial para se tornarem subprodutos com aplicação na área agrícola e ambiental. Desta forma, o presente trabalho vem a contribuir para a implementação industrial da produção de bioetanol dentro do conceito de biorrefinaria lignocelulósica, a partir de um modelo integrado para completo aproveitamento da biomassa, de forma sustentável e com adequada destinação dos resíduos gerados.

PALAVRAS-CHAVE: Precipitado de CaO, calagem, licor negro, lignina, adsorção de chumbo.

CHARACTERIZATION AND BENEFIT OF WASTES GENERATED DURING ETHANOL PRODUCTION OF SECOND GENERATION

ABSTRACT

Researches concerning the use of biomass lignocellulosic composition for second-generation ethanol production have received special attention as a possible contribution to energy sustainability. Although such activity has mainly used waste from the agricultural industry, it also generates other impactful solid and liquid wastes to the environment because they contain high concentrations of acids, alkaline and toxic elements. Thus, this trial aimed registering chemical characterization and recovering wastes generated in order to obtain a second-generation ethanol, particularly the precipitate produced during detoxification process by overliming hydrolyzed hemicellulose from sugarcane bagasse and liquid waste produced during cellulignin delignification phase in the pre-treatment to make the process of enzymatic saccharification of cellulose easier. Initially, the solid residue was submitted to physical and chemical analyses such as granulometric, analysis of metal compounds, content of inhibitory compounds to microbial activity such as acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural and phenols, sugars and moisture content. Waste potential determination as corrective of soil acidity was carried out by analyzing the attributes of corrective quality in soil (PN, PRNT), Ca and Mg and granulometry). Solid residue was also evaluated for its influence on bacterial communities by traditional microbiological techniques, bioassays with worms and lettuce seed germination. Liquid waste was characterized based on its metal contents present and inhibitory compounds. The lignin present in such liquor was precipitated with sulfuric acid and, after its characterization by infrared spectroscopy, was used as a biosorbent on lead ions adsorption in aqueous solution. The results have suggested that the waste generated during second-generation ethanol obtainment have some potential to become by-products to be applied in agricultural and environmental area. Lastly, the present trial has contributed to the production of bioethanol to be implemented in industry according to lignocellulosic biorefinery concept from an integrated model for a full biomass use in a sustainable management and correct disposal of the generated waste.

KEYWORDS: CaO precipitate, soil liming, black liquor, lignin, lead adsorption

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO SÓLIDO PROVENIENTE DA DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR COMO CORRETIVO DE ACIDEZ DO SOLO

RESUMO

Durante a produção de etanol de segunda geração, na etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por *overliming*, são gerados resíduos sólidos que podem ser impactantes para o meio ambiente, pois podem conter altas concentrações de elementos que podem ser tóxicos. Este trabalho visou à caracterização química e aplicação do resíduo sólido gerado por *overliming* como corretivo de pH do solo. O resíduo sólido foi submetido a análises físico-químicas, granulométrica, análise de metais, teor de compostos inibidores para a atividade microbiana tais como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, fenóis e açúcares. A determinação do potencial do resíduo como corretivo da acidez do solo foi realizada por análise dos atributos da qualidade dos corretivos do solo (PN- Poder neutralizante, PRNT- Poder relativo neutralizante total, teores de Ca e Mg e granulometria). O resíduo sólido foi também avaliado quanto à sua influência nas comunidades bacterianas do solo pelas técnicas microbiológicas tradicionais e quanto à toxicidade dos compostos aplicados no solo, a partir de bioensaios com minhocas e testes de germinação com sementes de alfaca. Os resultados obtidos sugerem que o resíduo sólido é eficiente na correção do pH do solo e resultam na elevação do mesmo de 5 para 7, de forma contínua durante o experimento, assim como o calcário utilizado para controle. O resíduo contribuiu para a melhoria de forma geral dos atributos químicos do solo. Os teores de Ca, Mg, C, MO e CTC foram elevados de forma mais significativa, portanto, esses atributos podem ter contribuído para o aumento das comunidades microbianas do solo. Foram detectados também elevados teores dos micronutrientes: Zn, Fe, Ni, Cr e Mn. Além disso, o resíduo não apresentou valores significativos quanto à concentração dos compostos tóxicos: fenóis, ácido acético, furfural e HMF (0,001 g.g⁻¹, ND - não detectado, 0,0005 g.g⁻¹ e 0,001 g.g⁻¹, respectivamente), nem apresentou toxicidade para as sementes de alfaca, porém, apresentou toxicidade no teste de fuga, realizado com minhocas.

PALAVRAS CHAVE: Calagem, etanol de segunda geração, *overliming*, precipitado de CaO.

CHAPTER 1

CHARACTERIZATION AND SOLID RESIDUE APPLICATION FROM DETOXIFICATION OF HYDROLYZED HEMICELLULOSE CANESUGAR BAGASSE AS A CORRECTIVE OF SOIL ACIDITY

ABSTRACT

Solid residues are produced during the second-generation ethanol, at detoxification of hydrolyzed hemicellulose phase from sugarcane bagasse. These residues may affect the environment, since they can have high concentrations of toxic elements. This trial aimed to obtain chemical characterization and application of solid residues produced by overliming as a soil pH corrective. The solid residue was submitted to physical-chemical analyses, granulometry, metal analysis, content of inhibitory compounds to microbial activity such as acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural, phenols and sugars. The determination of solid residue potential as corrective of soil acidity was carried out by analyzing the attributes of quality of soil correctives (NP-neutralizing power, PRNT- relative total neutralizing power, Ca and Mg and granulometry). The solid residue was also evaluated regarding its influence on bacterial communities of soil by traditional microbiological techniques and toxicity of compounds applied on soil, based on bioassays with earthworms and germination tests with lettuce seeds. The results suggest that the solid residue is effective in correcting soil pH, whose result is its increase from 5 to 7, continuously during the trial, as well as limestone used as a control. The residue contributed to a general improvement in chemical properties of soil, and Ca, Mg, C, MO and CEC contents were significantly increased. Thus, these attributes have contributed to the increase of microbial communities in soil. High contents of micronutrients such as Zn, Fe, Ni, Cr and Mn were also detected. Besides, the residue showed no significant values to toxic compounds concentration: phenols, acetic acid, furfural and HMF (0.001 g.g^{-1} , ND - non-detected, 0.0005 g.g^{-1} e 0.001 g.g^{-1} , respectively), neither toxicity to lettuce seeds, however, showed toxicity in the leak test with earthworms.

KEYWORDS: Liming, second-generation ethanol, *overliming* precipitate CaO.

CAPÍTULO 2

APLICAÇÃO DA LIGNINA PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL COMO BIOSSORVENTE DE CHUMBO UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

RESUMO

Durante o processo de produção do etanol de segunda geração, além da geração do produto de interesse, são gerados resíduos sólidos e líquidos impactantes para o meio ambiente. O presente estudo aborda como atua o bioissorvente de íons em solução aquosa, a lignina precipitada do licor negro, proveniente da etapa de deslignificação da celulose, durante a produção de etanol de segunda geração. O licor negro foi submetido à análise química para a determinação dos teores de metais presentes, compostos inibidores, tais como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, açúcares e ácidos graxos voláteis. Após precipitação da lignina com ácido sulfúrico, o bioissorvente foi caracterizado por espectrometria de infravermelho. Nos experimentos de adsorção do metal pesado chumbo, as influências das variáveis pH, massa do adsorvente e concentração do metal foram estudadas a partir do planejamento experimental utilizando delineamento composto central (DCC) e superfície de respostas. Os resultados indicaram que a lignina precipitada do licor negro, proveniente da etapa de deslignificação da produção de etanol de segunda geração, pode ser utilizada no processo de bioissorção do chumbo em soluções aquosas. Os resultados também indicaram que quanto maior a concentração do metal na solução aquosa, menos adsorvente é necessário para a remoção do chumbo. A quantidade de íons Pb (II) removida quando a solução atingiu o equilíbrio foi de $41,8 \text{ mg g}^{-1}$ cujas melhores condições ocorreram em pH 5, massa do adsorvente 50 mg e concentração de metal de 80 mg L^{-1} . O modelo cinético que melhor se ajustou foi o de pseudo segunda-ordem, houve maior adsorção nas primeiras cinco horas. Esses resultados são relevantes visto que não há registros de caracterização do licor negro e da lignina gerados durante a produção de etanol, como também não há registros sobre a utilização da lignina separada do licor negro como adsorvente de metais pesados.

PALAVRAS-CHAVE: Adsorção, licor negro, lignina, metal pesado, planejamento experimental.

CHAPTER 2

LIGNIN APPLICATION FROM BIOETHANOL PRODUCTION AS LEAD BIOSORBENT USING EXPERIMENTAL DESIGN

ABSTRACT

During the second-generation ethanol production process, besides the product generation of interest, impacting solid and liquid wastes are generated to the environment. Thus, this study discusses how biosorbent ions act out in aqueous solution, precipitated lignin of black liquor from the pulp delignification stage, during the second-generation ethanol production. The black liquor underwent chemical analysis to determine the metal content present, inhibitory compounds such as acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural and phenols, sugars and volatile fatty acids. After precipitation of lignin with sulfuric acid, biosorbent was characterized by infrared spectroscopy. According to the experiments with lead adsorption as heavy metal, the influence of variables such as pH, adsorbent mass and metal concentrations has been studied by experimental design using a central composite design (CCD) and surface responses. The results indicated that the precipitated lignin of black liquor from the second-generation ethanol delignification phase can be used in lead biosorption process in aqueous solutions. The results have also indicated that the highest metal concentration in aqueous solution is the least adsorbent is needed to remove lead. The removed amount of lead ions - Pb (II) - when the solution reached balance was 41.8 mg g^{-1} , whose best conditions occurred at pH 5, 50-mg adsorbent mass and 80-mg L^{-1} metal concentration. The pseudo-second order was the kinetic model that best fit, with the highest adsorption in the first five hours. These results are relevant since there are no records of characterization for both black liquor and lignin generated during ethanol production. There were no records on the use of separate lignin from black liquor as adsorbent of heavy metals.

KEYWORDS: Adsorption, black liquor, lignin, heavy metal, experimental design.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos	4
3.2 Importância da correção da acidez de solo.....	8
3.3 Monitoramento da qualidade do solo	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Etapa 1: obtenção e caracterização do resíduo sólido	13
4.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por hidrólise ácida	13
4.1.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico por overliming	13
4.1.3 Caracterização físico-química do resíduo sólido	13
4.1.3.1 Análises químicas	13
4.1.4 Análises granulométricas	14
4.1.5 Determinação da concentração de açúcares	14
4.1.6 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	14
4.1.7 Determinação da concentração de fenóis	15
4.2 Etapa 2: testes para utilização do resíduo sólido em solo	15
4.2.1 Coleta do solo.....	15
4.2.2 Caracterização do solo	16
4.2.3 Caracterização tecnológica para corretivo da acidez dos solos	16
4.2.4 Determinação do poder calorífico do resíduo sólido.....	17
4.2.5 Obtenção e caracterização tecnológica do calcário	17
4.2.6 Teste de correção de pH no solo	17
4.3 Bioensaios de toxicidade	17
4.4 Teste de germinação de sementes de alface.....	19
4.4.1 Índice de velocidade de germinação (IVG).....	20
4.4.2 Velocidade de germinação (VG)	20
4.5 Análises microbiológicas.....	21
4.6 Análise estatística	22

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Caracterização físico-química do solo.....	23
5.2 Caracterização físico-química e tecnológica para correção da acidez	25
5.3 Resultados das análises microbiológicas	30
5.4 Resultados do teste de fuga	32
5.5 Resultados teste germinação das sementes de alface	34
6 CONCLUSÃO	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42
1 INTRODUÇÃO	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo geral.....	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	50
3.1 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos	50
3.2 Toxicidade do Chumbo	52
3.3 Técnicas de descontaminação por chumbo	54
3.4 Utilização da lignina na descontaminação de ambientes por chumbo via técnica de adsorção	56
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Obtenção do licor negro	59
4.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana	59
4.1.2 Tratamento alcalino da celulignina (designificação)	59
4.2 Caracterização química do licor negro	59
4.2.1 Análises químicas e de metais.....	59
4.2.2 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e ácidos graxos voláteis (AGV)	60
4.2.3 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	60
4.2.4 Determinação da concentração de fenóis	60
4.2.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	61
4.3 Preparação do biossorvente	61
4.4 Caracterização da lignina por meio de espectroscopia na região do infravermelho	62

4.5 Soluções de íons chumbo.....	62
4.6 Planejamento Experimental	62
4.7 Experimentos de adsorção de íons Pb(II)	63
4.8 Cinética de adsorção dos íons Pb(II)	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
5.1 Caracterização química do licor negro	65
5.2 Análise de infravermelho da lignina	68
5.3 Estudos de adsorção de chumbo.....	70
5.4 Cinética de adsorção	76
6 CONCLUSÃO.....	79
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
REFERÊNCIAS	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Coordenadas dos pontos de coleta de amostras de solo	16
Tabela 2 Caracterização físico química do solo controle utilizado nos experimentos.	23
Tabela 3 Caracterização físico-química do resíduo sólido gerado na etapa de overliming durante o processo de produção de bioetanol	25
Tabela 4 Caracterização tecnológica do resíduo sólido para corretivo da acidez dos solos	27
Tabela 5 Caracterização química inicial e após 45 dias de experimento do solo controle, solo + resíduo e solo + calcário	28
Tabela 6 Contagem total de bactérias e fungos	31
Tabela 7 Porcentagem de germinação, Índice de velocidade de germinação (IVG), velocidade de germinação (VG), em sementes de alface submetidas aos tratamentos: testemunha, resíduo e calcário.	36

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Resolução nº 357/2005 e 430/2011 do CONAMA e portaria nº 2914/11 do MS referente aos valores máximos (VMP) de Pb	54
Tabela 2 Valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental	62
Tabela 3 Planejamento experimental (DCC) para 3 variáveis, com triplicata no ponto central, valores codificados e valores reais.....	63

Tabela 4 Caracterização química do licor negro gerado no processo de deslignificação durante o processo de produção de bioetanol antes e após precipitação da lignina	65
Tabela 5 Bandas de vibrações de infravermelho observadas na lignina do licor negro do processo kraft.....	69
Tabela 6 Matriz de delineamento (DCC) com valores codificados e reais das variáveis de estudo acompanhado dos valores reais dos ensaios.....	71
Tabela 7 Análise de variância (ANOVA) referente às variáveis dependentes ao nível de confiança de 95%.....	72
Tabela 8 Parâmetros para cinética dos modelos de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem para a adsorção do Pb(II).....	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Diagrama do processo de hidrólise e fermentação das frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa vegetal..... 5**
- Figura 2 Distribuição das sementes de alface em placas de Petri revestidas com dois discos de papel filtro para cada tratamento (solo + precipitado e solo + calcário) e testemunha. 19**
- Figura 3 Textura do solo quando misturado com o resíduo sólido. 33**
- Figura 4 (A) Plântulas de alface normais. (B) Plântulas de alface normais nos diferentes tratamentos. 35**
- Figura 5 Desenvolvimento foliar das plântulas de alface, após 7 dias de cultivo com os tratamentos: (T) testemunha, (P) precipitado e (C) calcário. 35**
- Figura 6 Comprimento de raiz e parte aérea da plântula de alface, submetida ao tratamento com calcário e resíduo sólido..... 37**
- Figura 7 Desenvolvimento da parte aérea e da raiz, das plântulas de alface nos diferentes tratamentos: (C) calcário, (T) testemunha e (P) precipitado. 38**

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Estrutura química hipotética da lignina 57**
- Figura 2 Lignina do processo de precipitação do licor negro resultante do processo de deslignificação da produção de bioetanol 61**
- Figura 3 Espectro de absorção na região de infravermelho da lignina do licor negro resultante da produção de bioetanol precipitada com ácido sulfúrico..... 68**

Figura 4 Valores observados contra preditos da adsorção do Pb pela lignina proveniente da precipitação do licor negro resultante da produção de bioetanol.....	73
Figura 5 Efeito das variáveis independentes e suas interações ao nível de 95% de confiança.....	73
Figura 6 Gráfico de superfície de resposta da adsorção de Pb: (A) em função da interação entre pH e massa do adsorvente; (B) pH em função da concentração de Pb.....	75
Figura 7 Cinética de adsorção do Pb para o resíduo da lignina em condições experimentais.....	76
Figura 8 Linearização do modelo cinético de pseudo primeira-ordem do íon Pb (II) pela lignina.....	77
Figura 9 Linearização do modelo cinético de pseudo segunda-ordem do íon Pb (II) pela lignina.....	77

CAPÍTULO 1 CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO SÓLIDO PROVENIENTE DA DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR COMO CORRETIVO DE ACIDEZ DO SOLO

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda de combustíveis tem levado ao aumento do uso de biocombustíveis líquidos, no entanto, a disponibilidade de energia de fontes não renováveis é limitada e a exploração, transformação e sua utilização podem gerar sérios impactos ao meio ambiente. Nesse sentido, os biocombustíveis podem ser uma alternativa viável para incrementar a produção de etanol necessária para atender a demanda mundial.

Pesquisas que visam o aproveitamento de materiais lignocelulósicos vêm sendo desenvolvidas com uma proposta de utilização de hidrolisados, obtidos a partir das biomassas agroindustriais, como é a produção biotecnológica de xilitol, a produção de etanol e de enzimas.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. No processo de obtenção do etanol lignocelulósico, o objetivo é desconstruir a parede celular para usar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis, porém, esta desconstrução não é fácil, devido à complexa estrutura da parede celular, necessitando que o processo de bioconversão seja dividido basicamente em três etapas, sendo a primeira, o pré-tratamento, que irá desagrupar o complexo carboidrato-lignina e/ou romper a estrutura celulósica, a segunda etapa será a hidrólise que irá quebrar as cadeias longas das moléculas de celulose em açúcares fermentáveis e a terceira etapa é a de fermentação, que irá converter os açúcares em etanol. O processo de hidrólise por via química, no qual se utiliza ácido diluído, é a técnica comumente empregada em pesquisas para a transformação da fração hemicelulósica em hidrolisado rico em hexoses e pentoses, principalmente xilose e arabinose. Tais açúcares representam uma fonte econômica de carbono para diferentes bioprocessos, dentre eles a produção de etanol, tanto a partir de pentoses como hexoses.

Um dos principais problemas na produção comercial de etanol lignocelulósico e o xilitol é a geração de compostos tóxicos durante o processo hidrolítico. Durante o processo de hidrólise da hemicelulose são gerados inibidores como o furfural, oriundo da degradação das pentoses ou hidroximetilfurfural oriundo da degradação das hexoses, tendo como resultado da degradação desses inibidores a formação dos ácidos fórmico e levulínico. Já, a decomposição parcial da lignina pode levar à formação de compostos fenólicos.

Todos estes inibidores afetam negativamente o metabolismo microbiano, prejudicando a conversão dos açúcares nos produtos de interesse e por essa razão

necessitam ser removidos. Para isso, diferentes métodos químicos, físicos e biológicos têm sido empregados de forma a favorecer a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos, como a alteração de pH por meio da adição de ácidos e bases, a combinação da alteração de pH e adsorção em carvão vegetal ativado, a combinação da adsorção em carvão vegetal e resinas de troca iônica e a floculação por polímeros vegetais.

O método de destoxificação por tratamento químico com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) ou óxido de cálcio (CaO) que consiste em elevar o pH geralmente acima de 10, conhecido como *overliming*, é uma forma eficaz de reduzir a toxicidade dos hidrolisados gerados por pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para a produção de bioetanol, contudo, esse método gera um precipitado rico em sais de cálcio. Até o momento, não se têm relatos sobre sua caracterização química e possíveis formas de utilização, de forma a minimizar danos ao meio ambiente e à sociedade.

O objetivo deste trabalho, portanto, foi realizar a caracterização química do resíduo sólido gerado no processo de produção de etanol de segunda geração e sua aplicação como corretivo da acidez do solo e sua influência na microbiota. Também foram realizados bioensaios para verificação de toxicidade quando aplicado no solo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a utilização do resíduo sólido resultante da etapa de pré-tratamento da biomassa durante o processo de produção de etanol de segunda geração na correção de acidez do solo.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do resíduo sólido (precipitado) resultante do processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *overliming*;

- Avaliar o uso do resíduo sólido como corretivo da acidez do solo;

- Avaliar a influência do resíduo sólido nas comunidades bacterianas e fúngicas do solo, por meio de técnicas microbiológicas tradicionais;

- Avaliar a toxicidade do resíduo sólido por meio de bioensaios de toxicidade com minhocas vermelhas da Califórnia (*Eisenia fétida*) e também por meio do teste de germinação com sementes de alface (*Lactuca sativa*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos

A alta dependência de recursos fósseis para a produção de combustíveis é responsável por dois grandes desafios: o declínio do fornecimento de combustíveis e o aumento do efeito estufa. Em vista da indisponibilidade destes combustíveis fósseis, tal como o petróleo, tem-se incentivado o desenvolvimento e a produção de bioetanol a partir de fontes alternativas (AZADI *et al.*, 2013; TORRE *et al.*, 2013).

A necessidade de um aumento significativo na produção de etanol, sem aumentar a exploração das terras cultiváveis, tem levado à constatação de um novo padrão de produção de energia a partir da biomassa, em especial de resíduos lignocelulósicos (BENEDETTI; CHAVES; MAGALHÃES, 2009).

O etanol obtido a partir da biomassa lignocelulósica é denominado de biocombustível de segunda geração. A utilização deste biocombustível apresenta vantagens econômicas e ambientais, em comparação ao bioetanol obtido a partir do amido e do açúcar (ALVIRA *et al.*, 2010). De acordo com Canilha *et al.* (2012), resíduos de cana-de-açúcar, como o bagaço e a palha são matérias-primas ricas em hidratos de carbono e podem ser a matéria-prima ideal para a produção do etanol de segunda geração. O bagaço é o principal resíduo agroindustrial brasileiro, sendo, grande parte, queimado nas usinas para produção de energia e uma fração menor empregada na composição de ração animal, havendo ainda excedentes. O uso do bagaço da cana-de-açúcar no Brasil é uma forma de aumentar a produção do bioetanol sem aumentar a área plantada de cana-de-açúcar no país. A constituição química do bagaço depende de diversos fatores entre eles: o tipo de solo, tipo de cana, as técnicas de colheita e o manuseio empregado (RODRIGUES; CAMARGO, 2008).

A utilização de biomassa para a produção de álcool combustível, pela rota biológica, envolve basicamente dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol ou outros combustíveis. O uso do bagaço de cana como matéria-prima apresenta uma série de vantagens, pois já é disponibilizado processado, está disponível em grandes quantidades, tem custo mínimo e está pronto para uso local, evitando desta forma custos com transporte.

No Brasil, a produção de etanol lignocelulósico já é uma realidade, tendo em vista que, de acordo com Oliveira (2015b), a empresa Granbio até agosto de 2015 já havia produzido 3 milhões de litros de etanol de segunda geração a partir da palha de cana.

A viabilidade econômica da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica reside em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da celulose, como também os açúcares solúveis liberados da hemicelulose que podem representar uma considerável proporção de todos os açúcares disponíveis (DIAZ *et al.*, 2009). Uma das possíveis formas de produção de etanol, a partir das frações celulósica e hemicelulósica e os resíduos gerados, é demonstrada na Figura 1.

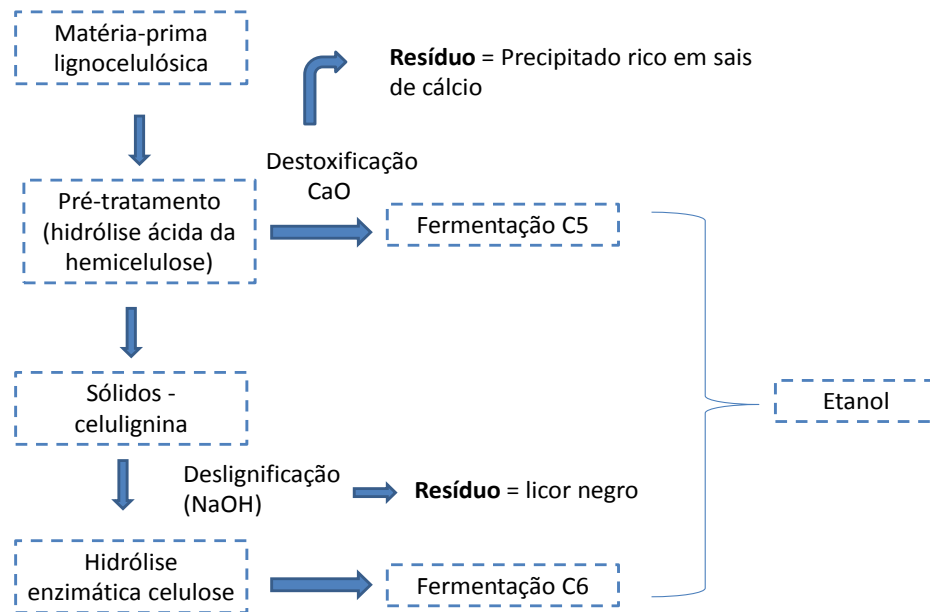


Figura 1 Diagrama do processo de hidrólise e fermentação das frações celulósicas e hemicelulósicas da biomassa vegetal.

A hidrólise enzimática da celulose é o procedimento mais comum para a redução dos polissacarídeos em monossacarídeos como a glicose. Nesse procedimento, os materiais são conduzidos à redução dos polímeros, usualmente através de uma mistura de diversas enzimas (celulases). Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise são as endoglucanases e exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002).

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta, e fatores como o teor de lignina, cristalinidade da celulose, e tamanho das partículas do substrato podem limitar a sua digestibilidade. Nesse sentido, alguns tipos de pré-tratamento têm sido utilizados com o objetivo de melhorar a digestibilidade, através da ação sobre a celulose, hemicelulose e lignina, os três principais componentes da biomassa lignocelulósica. Dentre os pré-tratamentos empregados, podem ser citados os

pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos ou, ainda, sua combinação antes de sua hidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; TAHERZADEH; KARIMI, 2008), permitindo uma utilização mais eficiente dos polissacarídeos da celulose. Esses pré-tratamentos permitem a remoção eficiente da porção hemicelulósica e da lignina que desorganiza a estrutura da biomassa celulósica, beneficiando o trabalho das enzimas que atuam na conversão de carboidratos em açúcares. Desse modo, o pré-tratamento é uma estratégia para facilitar o rompimento das fibras e aumentar a área superficial, expondo e disponibilizando a molécula de celulose (GOUVEIA *et al.*, 2009; MOSIER *et al.*, 2005; ALVIRA *et al.*, 2010).

A hidrólise ácida da biomassa, geralmente, é realizada com ácido sulfúrico e, assim, ocorre uma despolimerização, formando o que são chamados de oligômeros e seus açúcares constituintes, isto é, suas unidades repetitivas. O modo de ação de um ácido diluído é a solubilização da hemicelulose, enquanto que a lignina e a celulose permanecem intactas (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). A hidrólise ácida pode ser concentrada ou diluída. A hidrólise ácida diluída pode ser ainda usada como pré-tratamento anterior à hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Um dos principais problemas na produção comercial de etanol lignocelulósico são os compostos tóxicos gerados durante o processo hidrolítico (MATEO *et al.*, 2013). No entanto, durante a hidrólise ácida, na qual se obtém o hidrolisado hemicelulósico contendo os açúcares de interesse (principalmente pentoses - C5) são gerados vários subprodutos os quais podem ser divididos em três grandes grupos, de acordo com a sua origem: derivados do furano (furfural e hidroximetilfurfural), derivados da lignina (compostos fenólicos) e ácidos fracos (acético, fórmico e levulínico). Cátions como ferro, cromo e níquel estão, também, presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida (ARRUDA *et al.*, 2008).

Os compostos gerados durante o processo de hidrólise conferem limitações suficientes para retardar, ou mesmo impedir completamente a atuação microbiana sobre o hidrolisado (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), sendo um dos principais problemas na produção comercial de etanol lignocelulósico (MATEO *et al.*, 2013). Ou seja, durante o processo de hidrólise, além da liberação dos açúcares, principalmente pentoses, é comum que ocorra a formação de compostos tóxicos para os micro-organismos, que são provenientes da degradação de hexoses e pentoses, como 5-hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente, ou da lignina, como compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos. Devido à presença desses compostos tóxicos aos micro-organismos, quando o hidrolisado é utilizado diretamente em processos de bioconversão, ocorre diminuição da eficiência do processo fermentativo, redução do rendimento e produtividade (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Vários tipos de tratamentos podem ser aplicados para diminuir e facilitar uma posterior bioconversão reduzindo esses efeitos inibitórios, como alterações do pH do meio com adição de ácidos/bases, utilização de carvão ativo (TAMANINI; HAULY, 2004) e resinas de troca iônica (FONSECA, 2009).

O método de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico por tratamento químico com Ca(OH)_2 ou CaO , que consiste em adicionar álcali ao hidrolisado bruto, aumentando seu pH acima de 10, em condições controladas de temperatura e tempo de reação, é conhecido como *overliming* (alcalinização). No final do processo, o pH da mistura é ajustado ao valor de cultivo do micro-organismo com H_2SO_4 e o precipitado formado é removido por filtração ou centrifugação. De acordo com Mohagheghi, Ruth e Schell (2006), esse método tem baixo custo, promove a remoção parcial de ácido acético e compostos fenólicos, precipitação de íons metálicos tóxicos de Fe, Ni e Cr, e conversão de furfural a compostos menos tóxicos (ácido furfurílico), metabolizáveis pelos micro-organismos da fermentação.

De acordo com Martinez *et al.* (2000), os hidrolisados hemicelulósicos diluídos com ácido sulfúrico contêm inibidores que impedem a fermentação eficiente por leveduras ou bactérias e que esta toxicidade pode ser reduzida com o método de *overliming*, com hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2). Os autores constataram que ao destoxificar hidrolisados do bagaço de cana-de-açúcar seu rendimento na fermentação foi superior a 90% (principalmente açúcares pentoses), e que os compostos inibitórios como furfural e hidroximetilfurfural e compostos fenólicos foram reduzidos.

Yusel e Aksu (2015) investigaram três diferentes métodos de destoxificação para o hidrolisado da polpa da beterraba, sendo que a utilização do método de *overliming*, empregando CaO nos hidrolisados tratados com carvão ativado, resultou numa eficiente remoção tanto de furanos quanto de compostos fenólicos.

A eficiência do método de destoxificação por *overliming* também pode ser constatada no trabalho de Mateo *et al.* (2013), que testaram diferentes métodos de destoxificação para os hidrolisados de resíduos da poda de oliveiras. Os autores relatam que o tratamento com *overliming* permitiu uma redução significativa do ácido acético (em alguns casos até 53%), os compostos derivados da lignina (perto de 72%) e furanos (perto de 83%), principalmente, furfural, mas também hidroximetilfurfural.

Vale ressaltar que esse método apresenta algumas desvantagens como as perdas de açúcares do hidrolisado causadas por conversão a compostos tóxicos (ácido láctico), por arraste na precipitação do sal e problemas de incrustações dos sais de cálcio formados nos equipamentos de separação, fermentação e purificação.

Além disso, um dos inconvenientes do método de *overliming* é a formação de um resíduo sólido. De acordo com a revista Química Verde no Brasil (2010), se o processo de destoxificação envolver o uso de ácido sulfúrico com posterior neutralização do meio com

uso de cálcio (cal virgem ou hidratada) há uma grande produção de gesso, o que requererá uma adequada destinação.

3.2 Importância da correção da acidez de solo

Os solos paranaenses e brasileiros, na sua maioria, são ácidos e os efeitos causados pela acidez levam à baixa produtividade das culturas (EMBRAPA, 2006; SERRAT *et al.*, 2002). Tais solos são caracterizados por baixas concentrações de Ca e de Mg, elementos diretamente envolvidos no desenvolvimento das raízes, e por valores elevados de alumínio trocável e baixa disponibilidade de P do solo.

A acidez do solo é representada basicamente por dois componentes: a fase sólida, que é representada pelas argilas, a matéria orgânica e os óxidos de ferro e alumínio que estão em equilíbrio com a fase líquida, a solução do solo. Os íons H^+ dissociados na fase líquida são denominados acidez ativa, que é estimada pelo pH. Os demais íons H^+ e Al^{3+} , ligados à fase sólida, são denominados acidez potencial. Apenas parte dos íons alumínio são deslocados por outros cátions, sendo, por isso, denominados de alumínio trocável ou acidez trocável (SERRAT *et al.*, 2002).

Conforme Natale *et al.* (2012), a produtividade é afetada pela acidez do solo e fatores relacionados (pH, saturação por bases, acidez potencial, a disponibilidade de nutrientes). A calagem é bem conhecida e, se bem utilizada, é uma prática benéfica para corrigir a acidez do solo em sistemas de cultivos anuais. Para as culturas perenes tais como pomares, a incorporação de cal é mais difícil de aplicar como um resultado da duração da rotação e a falta de apoio científico. A cal neutraliza o alumínio trocável, aumenta o pH e suprimentos Ca e Mg para as raízes em crescimento. Devido ao movimento lento da cal no solo, esta deve ser incorporada profunda e uniformemente, antes do estabelecimento do pomar para melhorar a exploração do solo pelo sistema radicular.

De acordo com Prado (2003), no Brasil, a prática da calagem faz-se presente em todos os quadrantes do País, principalmente nas áreas de maior atividade agrícola, normalmente áreas com o predomínio de Latossolos. Estes solos, em sua grande maioria, são ácidos, têm baixa saturação por bases e elevados teores de alumínio trocável, são muito profundos e têm estrutura granular pequena e, geralmente, forte; porém, oferecem boas produções quando sua fertilidade é corrigida. Em seu trabalho, Prado (2003) concluiu que, em solos tropicais, a calagem deve ser moderada suficientemente para atingir o máximo valor de pH (em $CaCl_2$) igual a 6 e saturação por bases de 80% e, ainda, é oportuno manter sistemas de produção com alto aporte de resíduo orgânico, uma vez que a microbiota pode excretar no solo compostos orgânicos agregantes.

Serrat *et al.* (2002) destacam alguns benefícios da correção da acidez de solo tais como: fornecimento de Ca e Mg como nutrientes para as plantas, diminuição ou eliminação dos efeitos tóxicos do Al e também do excesso de Mn, Fe e Cu, liberação do nutriente P para as plantas, aumento da disponibilidade de S e Mo, melhoria da eficiência na absorção pela planta de adubos que tenham K e aumento da liberação de nutrientes (N, P, S) que estão na matéria orgânica (MO) do solo.

A escolha do calcário, seu valor neutralizante, grau de finura e sua reatividade são fatores relevantes na aquisição do material corretivo (EMBRAPA, 2006). As principais características relacionadas com a qualidade dos corretivos são: teor de neutralizantes (poder de neutralização-PN), tamanho das partículas, forma química dos neutralizantes e natureza geológica. A legislação brasileira não exige teores mínimos de CaCO_3 , porém, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento recomenda que a soma dos óxidos de Ca e de Mg não deve ser menor que 38% e o Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT) não inferior a 67%.

Materiais alternativos, tais como produtos residuais provenientes de outras indústrias para mitigar os efeitos negativos da extração do calcário resolveriam simultaneamente dois problemas ambientais como por exemplo a erosão e a destruição de fósseis (MÄKITALO *et al.*, 2014), neste sentido, buscar fontes alternativas de insumos para a agricultura torna-se cada vez mais importante para o desenvolvimento sustentável desse setor. Assim, a utilização dos resíduos industriais, como fertilizantes e corretivos de solo na agricultura, tem-se mostrado uma alternativa viável para o aproveitamento desses materiais.

De acordo com Albuquerque *et al.* (2011), a indústria de celulose produz uma grande quantidade de resíduos e alguns têm potencial para melhorar a fertilidade do solo. No entanto, ainda há falta de informação sobre a viabilidade de utilização e as doses a serem aplicadas ao solo.

Nos processos industriais para produção de papel e celulose, a madeira é submetida a processos mecânicos e químicos com o objetivo de separar as fibras de celulose da lignina. Entre os principais resíduos sólidos gerados na fabricação da celulose, com potencial de causar danos ao ambiente, está o *dregs*, que é formado basicamente de carbonato e sulfeto de sódio e óxido de cálcio, além de outros componentes, como carbono. Por ter caráter alcalino, o *dregs* pode ser utilizado como corretivo da acidez de solos agrícolas e florestais e em áreas reconstruídas a um baixo custo (PÉRTILE, 2011).

Dependendo do processo de pré-tratamento utilizado para a produção de etanol de segunda geração, novos resíduos poderão ser gerados e necessitarão de uma destinação correta. É o caso do precipitado gerado na etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico *overliming*. Portanto, são necessários estudos de uma possível aplicação

como substituto do calcário na correção do pH do solo, em vez de uma deposição direta e indiscriminada destes precipitados nos solos.

3.3 Monitoramento da qualidade do solo

A qualidade do solo é fundamental ao desenvolvimento sustentável e à preservação dos ecossistemas e da biodiversidade. A qualidade do solo é um conceito amplo que se refere ao equilíbrio entre os condicionantes químicos, físicos e biológicos do solo. Para a avaliação da qualidade de um solo, tem sido postulada a necessidade de identificação de parâmetros indicativos do seu estado de conservação e/ou degradação.

Várias são as ferramentas para o monitoramento da qualidade do solo. Para Araújo e Monteiro (2007), a qualidade do solo pode ser mensurada através de indicadores que podem ser químicos, físicos ou biológicos. No trabalho de Santos (2015), para o monitoramento da qualidade do solo com e sem pastagem, foram utilizados indicadores microbiológicos e bioquímicos como: P, N, C, biomassa microbiana, taxa de amonificação, atividade da desidrogenase e fosfatase ácida. O autor observou uma diminuição na evolução de CO₂, um aumento na biomassa microbiana, aumento do C no pasto em recuperação, resultando em um quociente metabólico menor (qCO₂) que apontou para uma diminuição da tensão metabólica da comunidade microbiana. Também foi observada no solo com pastagem a recuperação do P, concluindo-se que as melhorias assinaladas pelos indicadores bioquímicos e microbiológicos evidenciaram que os processos de recuperação estão relacionados aos ciclos de C, N e P no solo.

Em seu trabalho de monitoramento de qualidade do solo, Nesbitt e Adl (2014), utilizaram como bioindicadores biológicos: biomassa microbiana, amebas, nematoides e microartrópodes, enquanto que o pH do solo, razão C: N, fração leve, densidade e umidade do solo serviram como indicadores químicos e físicos para comparar a qualidade do solo com manejo orgânico e convencional em campos de batata do leste do Canadá. Os resultados indicaram avaliações semelhantes de qualidade dos dois tipos de manejo avaliados. Os autores recomendam que vários indicadores, incluindo bioindicadores devem ser usados em conjunto, e que vários locais devem ser amostrados.

Neste contexto, bioensaios de toxicidade com minhocas são muito importantes, pois comportamentos adversos dos oligoquetos representam sérios impactos ecológicos, considerando que esses são os principais organismos em muitos solos e que ajudam a aumentar o revolvimento dos nutrientes e a aeração do solo (OWOJORI; REINECKE, 2009).

No solo, as minhocas representam o maior componente da biomassa animal e são comumente chamadas de "engenheiros do ecossistema", contribuindo com os ecossistemas

através da pedogênese, o desenvolvimento da estrutura do solo, regulação da água, ciclagem de nutrientes, produção primária, regulação do clima, poluição e remediação do solo, podendo ser usadas para o restabelecimento ou a reparação de solos contaminados baseando-se em várias estratégias diferentes, dependendo da natureza da contaminação (BLOUIN *et al.*, 2013).

De acordo com Liu, Zhou, Wang (2011), um dos organismos de teste padrão para ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos é a *Eisenia fétida*. De acordo com Kwak e An (2015), vários estudos têm investigado os efeitos de diferentes materiais em diversas espécies de minhocas, uma vez que a minhoca é um representante dos invertebrados que está presente no solo e ocupa um importante nível trófico.

Leveque *et al.* (2014) investigaram a influência da atividade de minhocas na fitodisponibilidade de metais e destacaram os mecanismos envolvidos em sistemas de solo-planta-minhoca poluídos. Concluíram que a presença de minhocas resultava em aumentos significativos de metais na parte aérea das plantas e que o aumento observado de fitodisponibilidade do metal foi devido, principalmente, ao aumento na macroporosidade do solo e da biodisponibilidade do metal para raízes, devido à presença das minhocas.

Irizar *et al.* (2015) avaliaram os efeitos das mudanças no teor de MO sobre a toxicidade de Cd em *Eisenia fétida* e verificaram que baixas concentrações de MO no solo diminuía a ingestão de solo e bioacumulação Cd, porém, aumentava a toxicidade do Cd, causando 100% de mortalidade, e uma forte perturbação da reprodução. Os autores concluíram que a bioacumulação de Cd não refletiu na toxicidade, e a MO desempenhou um papel fundamental na toxicidade de Cd. Assim, o conteúdo de MO deve ser levado em conta quando se utiliza *E. fétida in vivo* em exposições para a avaliação da qualidade do solo.

Outro tipo de bioindicador muito utilizado são as sementes e, nesse sentido, as sementes de alface se destacam por serem de fácil acesso, terem um tempo de germinação curto e possuírem um baixo custo. Nascimento *et al.* (2009) concluíram que as sementes de alface possuem uma elevada sensibilidade com possibilidade de serem aplicadas em ensaios de toxicidade. Spiassi *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade de biofertilizantes, utilizando sementes de alface como bioindicador e o milho como planta cultivada e concluíram que o uso de biofertilizantes em altas concentrações influencia negativamente a germinação de sementes de alface, enquanto que o biofertilizante não afetou a germinação de sementes de milho e o crescimento de mudas foi estimulado.

Silva Junior *et al.* (2014) relatam que a demanda por bioensaios simples e rápidos em avaliações ecotoxicológicas é de suma importância, a fim de acelerar os programas de monitoramento ambiental. Em seu estudo, para a avaliação ecotoxicológica de um solo agricultável em uma área de complexo petroquímico, os autores realizaram bioensaios com sementes de alface e duas espécies de isópodes terrestres (*Vulgare armadillidium* e

Porcellio dilatatus). Os autores observaram no solo teste um efeito tóxico sobre a taxa de germinação das sementes e um atraso em germinação, enquanto que houve um efeito tóxico sobre plântulas apenas com a concentração mais elevada. Foi possível concluir que esses resultados demonstram a sensibilidade dos organismos estudados, destacando a possibilidade de utilizar estes bioensaios em programas de monitoramento ambiental em áreas contaminadas com combustíveis fósseis.

A diversidade microbiana, em virtude de os micro-organismos estarem na base da cadeia trófica e intrinsecamente associados aos diversos processos ecológicos do solo, tem figurado como um importante indicador da qualidade do solo (ZILLI *et al.*, 2003).

Alguns trabalhos utilizam os micro-organismos para avaliar os impactos da degradação do solo. Ramos *et al.* (2012) monitoraram o efeito dos diferentes sistemas de plantio nos grupos funcionais dos micro-organismos do Cerrado. Os autores relatam que os resultados da correlação linear entre os grupos funcionais de micro-organismos e elementos químicos do solo variou entre sistemas de plantio direto, concluindo que o solo do cerrado apresenta maior densidade microbiana e essa densidade microbiana foi similar entre o manejo do solo no período seco.

Os micro-organismos são muito utilizados também nos trabalhos que visam avaliar substâncias com potencial contaminante para o solo. Godoi, Sene e Caracciolo (2014) investigaram a ação do herbicida atrazina na comunidade bacteriana do solo pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Stella *et al.* (2015) realizaram um monitoramento dos micro-organismos presentes em amostras de solo contaminado com Bifenilos Policlorados (PCB), por meio de análise pirosequenciamento (método de sequenciamento de DNA) e análises taxonômicas.

Proietti *et al.* (2015) investigaram um tipo de resíduo sólido produzido por uma fábrica de óleo cujos derivados foram compostados e espalhados no solo por três anos consecutivos em um olival. Foram avaliadas as características químicas do solo, abundância e estrutura das comunidades bacterianas, a produção e o crescimento das plantas. Os resultados indicaram melhoria nos atributos químicos do solo e nenhuma alteração nas comunidades bacterianas comparadas com o solo controle, sendo assim, sua utilização foi indicada de forma positiva, podendo contribuir para a redução da utilização de fertilizantes químicos.

Canfora *et al.* (2015) investigaram as propriedades físico-químicas e microbiológicas de solos salinos, tendo como principal objetivo avaliar a estrutura e diversidade de comunidades bacterianas, por meio de técnicas tradicionais como: análises químicas e taxonômicas. Os resultados forneceram informações sobre a distribuição, composição e diversidade das diferentes comunidades microbianas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapa 1: obtenção e caracterização do resíduo sólido

O resíduo gerado na produção do bioetanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, o precipitado resultante do processo de destoxificação (*overliming*), foi cedido pela Escola de Engenharia de Lorena - EEL-USP, Lorena - SP.

O resíduo foi obtido por meio das etapas a seguir descritas.

4.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por hidrólise ácida

Foi realizado conforme metodologia estabelecida por Pessoa Jr., Mancilha e Sato, (1997), empregando-se H₂SO₄ 1% (v/v), relação sólido-líquido de 1:10 e temperatura de 121 °C, por 20 minutos. O hidrolisado hemicelulósico foi separado da massa sólida (celulignina) por filtração.

4.1.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico por *overliming*

O resíduo sólido do tratamento de destoxificação foi resultado do aumento do pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (quatro vezes concentrado a vácuo) com CaO até pH 8,0.

4.1.3 Caracterização físico-química do resíduo sólido

4.1.3.1 Análises químicas

A caracterização química do resíduo sólido foi realizada pela empresa Solanálise - Central de Análises Ltda., sendo utilizado o Extrator Melich para K, Fe, Mn, Cu, e Zn e o Extrator KCl para Ca, Mg e Al. Para os metais Ni, Cr, Pb e Cd, as amostras foram submetidas à digestão nitro-perclórica, conforme método descrito por Johnson e Ulrich (1959). Após a realização de todos os processos analíticos de abertura das amostras, estas foram acondicionadas em frascos com capacidade de 5 mL e, em seguida, submetidas à

leitura em Espectrofotômetro de Absorção Atômica, modelo 6300. Já, as determinações de C e MO foram realizadas conforme metodologia da EMBRAPA (2009).

4.1.4 Análises granulométricas

As análises granulométricas foram realizadas conforme metodologia da EMBRAPA (2009).

4.1.5 Determinação da concentração de açúcares

Para quantificação dos açúcares e AGV, 1 g de resíduo sólido foi misturado a 5 mL de água destilada, em seguida a mistura foi deixada em repouso por 30 minutos, centrifugada por 10 minutos a 1500rpm e o sobrenadante encaminhado para análises, tendo sido anteriormente purificado em cartucho Sep Pak C18 e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A), com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) 150 x 7.8 mm, fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno 65 °C. O eluente foi filtrado a vácuo, empregando-se membrana GVWP 0,45 µm (MILLIPORE).

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, bem como as de ácido acético, butírico, propiônico e láctico foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

4.1.6 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação da concentração dos compostos tóxicos como o furfural e hidroximetilfurfural, as amostras (preparadas de acordo com o item anterior) foram filtradas em membrana HAWP 0,45 µm (MILLIPORE) para total remoção de partículas sólidas. O eluente foi filtrado a vácuo empregando-se membrana GVWP 0,22 µm (MILLIPORE) e em seguida degaseificado em banho de ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) empregando as seguintes condições: coluna Waters Resolve C18 5µm 90Å 3,9 x 300mm, temperatura ambiente, detector de ultravioleta a 276 nm, eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,9 mL min⁻¹ e volume da amostra injetada 20 µL. As

concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA).

4.1.7 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis totais foi determinada conforme o método de Folin Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Nesse processo, foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu a 3 mL de amostra (preparadas de acordo com o item 4.1.6) do resíduo em tubos de vidro. Passados 5 minutos foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g.L^{-1}), seguido de agitação dos tubos em vórtex. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e posteriormente foram determinadas as absorvâncias em Espectrofotômetro UV-VIS FEMTO 700 *Plus*, a 760 nm. Para a obtenção das concentrações, utilizou-se uma curva padrão de vanilina (Synth – 98% de pureza).

4.2 Etapa 2: testes para utilização do resíduo sólido em solo

4.2.1 Coleta do solo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETF) e Laboratório de Saneamento Ambiental (LASAM) da UNIOESTE, campus de Cascavel.

O solo foi proveniente de uma área não cultivada no município de Cascavel - PR. Para a coleta do solo foram utilizados sacos de polipropileno (15 x 20 cm) estéreis e identificados. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em 10 pontos diferentes, seguindo o padrão geométrico em zig-zag, a uma profundidade de 15 cm, identificados por meio de um sistema de posicionamento global - GPS (GARMIN ETREX- VISTA). As coordenadas podem ser observadas na Tabela 1. As amostras de cada ponto foram coletadas em sacos individuais e posteriormente reunidas em um mesmo saco, agitando-o para uma mistura mais homogênea. As amostras foram transportadas ao laboratório dentro de caixas de isopor e armazenadas a 4°C para posterior utilização.

Tabela 1 Coordenadas dos pontos de coleta de amostras de solo

PONTO	S	WO
01	24 50'38.39"	53 18'7.98"
02	24 50'38.18"	53 18'7.88"
03	24 50'38.22"	53 18'7.64"
04	24 50'38.02"	53 18'7.26"
05	24 50'37.96"	53 18'7.47"
06	24 50'37.83"	53 18'7.10"
07	24 50'37.97"	53 18'6.95"
08	24 50'37.75"	53 18'6.80"
09	24 50'37.95"	53 18'6.68"
10	24 50'37.74"	53 18'6.46"

4.2.2 Caracterização do solo

A caracterização química do solo foi realizada pela empresa Solanálise - Central de Análises Ltda., sendo utilizado o Extrator Melich para K, P, Fe, Mn, Cu, e Zn e o Extrator KCl para Ca, Mg e Al. Para os metais Ni, Cr, Pb e Cd, as amostras foram submetidas à digestão nitroperclórica, conforme método descrito por Johnson e Ulrich (1959). Após a realização de todos os processos analíticos de abertura das amostras, estas foram acondicionadas em frascos com capacidade de 5 mL e, em seguida, submetidas à leitura em Espectrofotômetro de absorção atômica modelo 6300.

Para a determinação da umidade do solo foi realizada a secagem em estufa de 10 g de solo durante 24 horas a uma temperatura de 105°C.

4.2.3 Caracterização tecnológica para corretivo da acidez dos solos

Foram realizadas análises para a determinação do potencial de utilização do resíduo como corretivo da acidez do solo. Para isto foram analisados os atributos da qualidade como o Poder de Neutralização (PN), o Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT), e a análise granulométrica do resíduo sólido. Todas as análises foram realizadas seguindo-se a metodologia da EMBRAPA (2009). As quantidades de óxidos presentes no resíduo sólido foram determinados pelo Laboratório de Análises de Minerais e Rochas – LAMIR, da UTFPR, *campus* de Curitiba por meio de Espectrômetro de fluorescência de raios X, Panalytical, modelo Axios Max. Tubo de raios X: Rh (ródio).

4.2.4 Determinação do poder calorífico do resíduo sólido

A determinação do poder calorífico foi realizado de acordo com a NBR 8633/84: Carvão vegetal - Determinação do poder calorífico (ABNT, 1984), pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* de Medianeira.

4.2.5 Obtenção e caracterização tecnológica do calcário

Com o intuito de comparar com os resultados do resíduo sólido, foram realizados os mesmos testes com o calcário, este, gentilmente cedido pela Plantar comércio de insumos Ltda. de Cascavel – PR. O calcário cedido foi o dolomítico, já caracterizado quanto ao Poder de Neutralização (PN), o Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT), quantidades de óxidos presentes e análise granulométrica.

4.2.6 Teste de correção de pH no solo

Os testes de correção de pH no solo foram conduzidos em vasos com capacidade de 3L, em quadruplicata. Para atingir o valor de pH desejado (pH 7), foi necessário misturar em cada vaso uma quantidade de 150 g de resíduo sólido com 600 g de solo controle. Para comparar os resultados, foram utilizados como controle vasos contendo 600 g de solo + 6 g de calcário. Os vasos foram mantidos em sala com controle de temperatura (24°C) e umidade (40%). O teste teve duração de 45 dias, com monitoramento do pH a cada 10 dias, nos primeiros 30 dias e o último após 15 dias, encerrando-se, assim, os 45 dias de experimento. O pH foi monitorado utilizando-se água deionizada por meio de pH-metro.

4.3 Bioensaios de toxicidade

Foram realizados testes de toxicidade com organismos naturalmente presentes no solo. Para isso foram utilizados dois organismos diferentes: minhoca (*Eisenia fétida*) e semente de alface (*Lactuca sativa*).

Visando avaliar a qualidade do solo quando o precipitado resultante do processo de *overliming* é lançado no solo, foi realizado o teste de ecotoxicidade, denominado teste de “fuga” ou ensaio de comportamento, empregando minhocas da espécie *Eisenia fétida*.

O teste de “fuga” ou ensaio de comportamento foi realizado de acordo com a norma ISO 17512-1 (ISO, 2008). O teste teve como principal objetivo expor as minhocas, simultaneamente, a amostras de solo (Latosolo vermelho distroférico) contendo o precipitado (solo + precipitado), solo contendo o calcário (solo + calcário), solo contendo uma mistura de ambos os corretivos (solo + precipitado + calcário) e um solo controle (somente solo), avaliando-se, assim, o comportamento das minhocas.

Foram utilizados para o experimento, em triplicata, 9 recipientes plásticos retangulares com área de 200 cm² e volume de 1L. No centro de cada recipiente, foi inserida uma divisória plástica, dividindo-o transversalmente em duas partes iguais, em que foram inseridos 500 g de solo em cada lado, suficiente para alcançar uma altura entre 5 e 6 cm no caso do solo controle; no teste com o solo contendo o precipitado foram inseridos 500 g de solo + 125 g de precipitado; no teste com solo contendo o calcário foram inseriu-se 500g de solo + 5g de calcário e no teste com o solo com ambos os corretivos inseridos 500 g de solo + 62g de precipitado + 2g de calcário. Os valores adicionados dos corretivos foram baseados na obtenção do pH desejado (pH 7). Em seguida, foi realizado o ajuste de umidade em 40% e deixado em repouso por 24 h para equilíbrio da mistura.

Após o ajuste dos parâmetros físicos, foram retiradas as divisórias e foram colocadas 10 minhocas adultas, pesando entre 250 e 600 mg, na linha divisória central, uma por uma, esperando escavarem o solo, dessa forma, evitando o stress. Os recipientes do teste foram cobertos com uma tampa perfurada para permitir a aeração e colocados em um ambiente sem luminosidade, a fim de evitar interferências nos dados da fuga, considerando que as minhocas são indivíduos fotofóbicos.

Os recipientes permaneceram em uma sala com controle de temperatura de 20 ± 2 °C e de umidade a 70%. A duração do teste foi de 48 horas e os indivíduos permaneceram sem alimentação. Após o teste, as divisórias foram recolocadas no meio de cada recipiente e contaram-se os indivíduos em cada lado. Quando existiam indivíduos exatamente na linha da divisória considerou-se meio individuo para cada lado, independente da porção do corpo que tenha ficado para cada lado. Os resultados foram expressos em porcentagem de fuga, em que foi calculada a porcentagem de indivíduos que evitaram o solo contendo o precipitado e com o calcário e também com a mistura de ambos os aditivos.

O cálculo para obtenção da porcentagem de fuga foi realizado em cada recipiente do teste de acordo com a Equação 1:

$$F = \frac{C - I}{N} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

F = porcentagem de fuga;

C = número de indivíduos encontrados no lado controle;

T = número de indivíduos encontrados no lado tratado;

N = número total de indivíduos colocados no recipiente do teste.

4.4 Teste de germinação de sementes de alface

Para a realização do teste de germinação com alface (*Lactuca sativa*), foram utilizadas quatro amostras de 25 sementes para cada tratamento (solo + precipitado e solo + calcário) nas proporções utilizadas no item anterior. Os solos contendo os corretivos foram incubados por 45 dias, com temperatura e umidade controladas (24°C e 40%, respectivamente). As sementes foram colocadas em placas de Petri, revestidas com dois discos de papel filtro, umedecidas na proporção de duas vezes e meia a massa do papel em relação ao volume de água (testemunha) ou do extrato dos solos com precipitado ou calcário (Figura 2).

Os extratos foram obtidos a partir da adição de água suficiente para corrigir a umidade em 60%, após a correção a mistura ficou em repouso por 30 minutos e foi levada à centrifugação a 3.400 rpm por 15 minutos. As sementes foram distribuídas nas placas e a solução foi adicionada apenas uma vez, sendo, a partir de então, adicionada apenas água destilada, sempre que se fez necessário para manter a umidade. As sementes permaneceram em temperatura de 25 °C, sob fotoperíodo de 12h em estufa tipo BOD. As sementes foram consideradas germinadas a partir da emissão da radícula e as avaliações foram efetuadas diariamente.

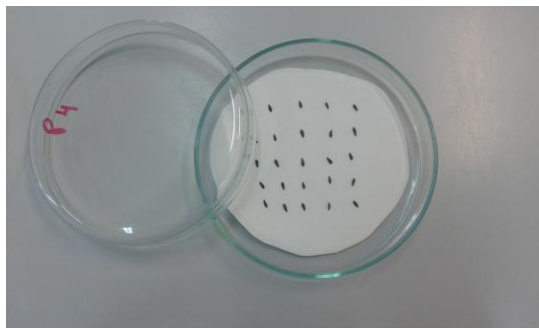


Figura 2 Distribuição das sementes de alface em placas de Petri revestidas com dois discos de papel filtro para cada tratamento (solo + precipitado e solo + calcário) e testemunha.

As análises de crescimento das plântulas de alface foram realizadas com dez plântulas normais de alface de cada repetição. O comprimento da raiz primária e parte aérea das plântulas foram avaliados no sétimo dia, com auxílio de régua milimetrada, efetuando-se as medições em centímetros e os resultados expressos em centímetro de plântula.

4.4.1 Índice de velocidade de germinação (IVG)

A contagem de sementes germinadas foi realizada a partir do primeiro dia após a primeira semente germinada até a estabilização do número de plântulas, seguindo metodologia descrita em Nakagawa (1999). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão da radícula. O IVG foi calculado conforme a Equação 2:

$$IVG = (E_1/N_1) + (E_2/N_2) + \dots + (E_n/N_n) \quad (2)$$

Em que:

E_1, E_2, \dots, E_n = número de sementes germinadas na primeira contagem, na segunda contagem (...) até a última contagem;

N_1, N_2, \dots, N_n = número de dias da semeadura até a primeira, até a segunda (...) até a última contagem.

Os resultados foram expressos em número de sementes germinadas por dia.

4.4.2 Velocidade de germinação (VG)

Os dados utilizados para avaliar a VG foram os mesmos utilizados para a avaliação do IVG. A VG foi calculada segundo Edmond e Drapala (1958), os quais consideram que o tratamento com menor média levou menos dias em relação à germinação das sementes, portanto, foi aquele que apresentou a maior velocidade de germinação, conforme Equação 3:

$$VG = [(N_1 \cdot E_1) + (N_2 \cdot E_2) + \dots + (N_n \cdot E_n)] / (E_1 + E_2 + \dots + E_n) / (N_1 + N_2 + \dots + N_n) \quad (3)$$

Em que:

VG = Velocidade de germinação;

$E_1 + E_2 + \dots + E_n$ = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem (...), até a última contagem;

$N_1 N_2 \dots N_n$ = número de dias da sementeira até a primeira, a segunda, (...), até a última contagem.

Os resultados foram expressos em número de dias em que as sementes levaram para germinar.

4.5 Análises microbiológicas

Para determinar alterações na comunidade microbiana, antes e após aplicação do resíduo sólido no solo, foram feitas análises microbiológicas que consistiram na quantificação total de bactérias e fungos. Amostras contendo calcário também foram analisadas com o intuito de comparar os resultados do precipitado com um corretivo de acidez de solo comumente utilizado, o calcário dolomítico, gentilmente cedido pela empresa Plantar.

O experimento foi conduzido durante 45 dias, sendo a contagem realizada a cada 10 dias nos primeiros 30 dias e a última contagem com intervalo de 15 dias, totalizando os 45 dias de experimento.

A contagem de fungos foi realizada por meio da técnica de plaqueamento em superfície de Ágar Batata Dextrose Acidificado (3,9% m/v acidificado com ácido tartárico, pH 3,5). Foram pesados 10g da amostra e adicionados em frasco Erlenmeyer estéril 90 mL de água peptonada 0,1%. Esta foi identificada como a primeira diluição. Em seguida foram preparadas diluições seriadas em tubos de ensaio até 10^{-4} , transferindo 1 mL da diluição anterior para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril.

Para o plaqueamento em superfície, as placas foram previamente preparadas com 15 mL do meio acima citado.

Das diluições 10^{-1} até 10^{-4} foi retirado 0,1 mL da amostra (com auxílio de pipeta esterilizada) para inoculação na superfície das placas de Petri. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após inoculadas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica BOD a 25 °C durante cinco dias. Após o quinto dia de incubação efetuou-se a contagem do número de colônias contidas em cada placa de Petri. O número de unidade formadoras de colônia por mL da amostra (UFC/ml) foi calculado pela média do número de colônias observadas nas placas de mesma diluição multiplicado pelo inverso da diluição inoculada.

Para determinação da concentração de bactérias foi utilizada a mesma técnica de determinação de fungos, exceto o meio selecionado que foi o Ágar Nutriente. O período de incubação foi de 3 dias a 32 °C.

4.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados (% de germinação, IVG e VG) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA, $\alpha = 0,05$). As médias foram submetidas ao teste de Tukey, para detectar a ocorrência de diferenças significativas ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do solo

Os resultados da caracterização físico-química do solo controle encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização físico química do solo controle utilizado nos experimentos

Solo	
Macronutrientes	
C g/ dm ³	6,30
P mg/dm ³	0,5
K ⁺ cmol/dm ³	0,06
Ca ⁺ cmol/dm ³	0,86
Mg ²⁺ cmol/dm ³	0,14
H ⁺ +Al ³⁺ cmol/dm ³	3,69
pH	5,3
Al ³⁺ cmol/dm ³	ND
N g/dm ³	0,5
Micronutrientes	
Cu mg/dm ³	10
Zn mg/dm ³	0,8
Fe mg/dm ³	77
Mn	16
Pb	ND
Cd	ND
Granulometria (%)	
Argila	63
Silte	19
Areia	18
Classe Argila =	Solo tipo 3

Nota: *ND = Não detectado.

Conforme pode ser verificado na Tabela 2, o solo utilizado foi classificado como solo tipo 3, ou seja, Latossolo vermelho-escuro com textura argilosa (> 35% de argila), segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS). Os teores de Ca e Mg foram baixos, o que já era esperado, visto que, solos argilosos caracterizam-se por apresentarem níveis baixos de Ca e Mg. Os Latossolos são pouco arejados, porém armazenam mais água quando bem estruturados. São geralmente menos permeáveis, embora alguns solos

brasileiros muito argilosos apresentem grande permeabilidade. Sua composição é de boa quantidade de óxidos de Al e de Fe.

Pode-se verificar também que o pH do solo é baixo: 5,3. De acordo com a EMBRAPA, a faixa de pH ideal dos solos para a agricultura é entre 5,5 e 6,5, pois é nesta faixa que os nutrientes ficam mais disponíveis às plantas. Quanto aos micro-organismos, estes crescem em sua grande maioria em meios cujo pH esteja entre 5 e 9, preferencialmente entre 6,5 e 7,5. O pH afeta as funções celulares como o transporte através da membrana, o transporte através das proteínas e, também, o equilíbrio das reações catalisadas por ter impacto na conformação tridimensional das enzimas (SUTHERSAN, 1999).

O pH pode afetar a quantidade e diversidade de micro-organismos num habitat, pois a disposição e toxicidade de nutrientes minerais estão relacionadas a esse fator químico. Em ambientes com pH maior que 7, os íons Fe, Mn e Zn são menos disponíveis para a absorção pelas plantas e pelos micro-organismos. No presente trabalho o teor de Fe é alto (77 mg/dm^3), porém, o Fe e o Al tornam-se tóxicos em pH menor que 5, sendo menos disponíveis em pH baixo ou alto. Processos como germinação e crescimento de esporos de fungos micorrízicos são afetados de forma negativa devido à maior concentração de Al (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), elemento não detectado no presente estudo.

Foram determinados teores de acidez potencial, representada por $\text{H}^+ + \text{Al}^3$, valor que se apresentou como médio ($3,69 \text{ cmol/dm}^3$) no solo em estudo.

Teores altos de Cu e Mn também foram observados, (10 e 16 mg/dm^3 , respectivamente). Assim como o Fe, o Cu está associado com enzimas envolvidas em reações de oxirredução, devido a sua reversibilidade entre as formas Cu^+ e Cu^{2+} . Algumas destas enzimas são: oxidase do ácido ascórbico, tirozinase, monoamina oxidase, uricase, citocromo oxidase. Assim como o Zn, o Cu atua como constituinte e cofator de enzimas, participa do metabolismo de proteínas e de carboidratos e na fixação simbiótica de N^2 . O cobre pode interferir no metabolismo do Fe, resultando no desenvolvimento de deficiências de Fe. Já o Mn é absorvido pela planta na forma Mn^{2+} , mas outras formas solúveis no solo também podem ser absorvidas. Nas plantas ele atua como ativador de muitas enzimas, tais como: desidrogenase, descarboxilase, quinases, peroxidases e oxidases. Juntamente com outros cátions ativadores atua na evolução de O_2 no processo fotossintético. Devido sua reversibilidade entre formas reduzidas e oxidadas está envolvido em processos de oxirredução no sistema de transporte de elétrons (RAIJ, 2011).

5.2 Caracterização físico-química e tecnológica para correção da acidez

O resíduo sólido (precipitado) gerado na etapa de *overliming* foi submetido à caracterização físico-química, cujos resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 Caracterização físico-química do resíduo sólido gerado na etapa de *overliming* durante o processo de produção de bioetanol

Resíduo sólido	
Macronutrientes	
K ⁺ cmol/dm ³	0,06
Ca ⁺ cmol/dm ³	291,17
Mg ²⁺ cmol/dm ³	44,83
H ⁺ +Al ³⁺ cmol/dm ³	9,935
pH	5,6
Al ³⁺ cmol/dm ³	1109,95
N g/dm ³	1925
Micronutrientes	
Cu mg/dm ³	ND
Zn mg/dm ³	101,89
Fe mg/dm ³	798,79
Ni mg/dm ³	320,48
Cr mg/dm ³	1006,43
Pb mg/dm ³	ND
Cd mg/dm ³	ND
Mn mg/dm ³	171,96
Granulometria	
% Peneira 10	91.82
%Peneira 20	61.57
%Peneira 50	23.91

Nota: *ND = Não detectado.

Pode-se verificar na caracterização físico-química do resíduo sólido, que o mesmo apresentou altas concentrações de Ni e Cr (320,48 e 1006,43 mg/dm³, respectivamente), estes, no entanto, podem não estar disponíveis, em alguns tipos de solos, pois, de acordo com Moraes Neto (2009), que faz referência especial ao efeito da calagem em solos quanto à redução da toxidez de certos metais pesados (Pb, Cr, Zn, Cd e Ni), em geral, esses elementos são menos solúveis sob condições alcalinas do que ácidas. Isso significa que apresentam menor aptidão para serem captados pelos vegetais, quando o pH do solo é igual a 7 ou superior.

No caso do Ni, este é absorvido na forma catiônica Ni²⁺. Os teores foliares variam entre 0,1 a 1,0 mg kg⁻¹. A urease é a única enzima nas plantas superiores que contém Ni. O

Ni é requerido por micro-organismos que fixam N, por participar de enzima que atua na geração do gás hidrogênio durante a fixação do N (RAIJ, 2011). Já os elementos Cu, Pb e Cd não foram detectados no resíduo sólido, no entanto, teores elevados de Zn, Mn e Fe também foram detectados com valores superiores (101,89, 171,96 e 798,79 mg/dm³, respectivamente) aos encontrados no solo em estudo.

O resíduo sólido possui uma alta quantidade de Ca e Mg (291,17 e 44,83 cmol/dm³, respectivamente), elementos importantes para correção de acidez em solos, pois, reagem com o hidrogênio do solo liberando água e gás carbônico. O alumínio é insolubilizado na forma de hidróxido. A acidez do solo pode ser dividida em acidez ativa e acidez potencial, e esta, por sua vez, dividida em acidez trocável e acidez não trocável. No presente trabalho, foi determinado para o resíduo o valor de acidez potencial que corresponde a H⁺+Al³ e foi superior (9,935 cmol/dm³) à do solo utilizado no presente estudo (3,69 cmol/dm³).

Durante o processo de hidrólise com ácido diluído, utilizado no presente trabalho, a fração celulósica e hemicelulósica é parcialmente hidrolisada, enquanto a hemicelulósica é totalmente transformada em um hidrolisado rico em pentoses que são os açúcares de interesse (C5) para a produção do bioetanol, liberando a celulose que também deve ser hidrolisada em açúcares de interesse (C6). Porém, no hidrolisado hemicelulósico também são gerados compostos tóxicos que afetam de forma negativa o metabolismo microbiano durante a fermentação, sendo necessário remover estes compostos. Este processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, que no presente trabalho utiliza o CaO, é que dá origem ao resíduo sólido analisado, sendo assim, foram determinadas as concentrações dos inibidores furfural, hidroximetilfurfural e fenóis que apresentaram valores de 0.0005 g furfural g⁻¹ de resíduo, 0.001 g hidroximetilfurfural g⁻¹ de resíduo e 0.001 g fenóis g⁻¹ de resíduo.

Além dos inibidores, o processo de destoxificação pode também carregar quantidades de açúcares, por esta razão o precipitado foi caracterizado quanto às concentrações de açúcares, cujos valores foram 0,005 g glicose g⁻¹ de resíduo, 0,091 g xilose g⁻¹ de resíduo e 0,08 g arabinose g⁻¹ de resíduo. Outra característica avaliada do resíduo sólido foi o poder calorífico de 3648J/g.

Branco *et al.* (2013) utilizaram resíduos alcalinos da indústria de papel e celulose (*dregs*) na agricultura, como corretivos de acidez do solo, empregados como alternativa de descarte no solo de forma a reduzir o impacto ambiental. Nesse trabalho foi também avaliada a influência da aplicação do *dregs*, nos atributos químicos do solo e na lixiviação de compostos fenólicos. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação do *dregs* levou ao incremento de compostos acima do máximo permitido pela legislação: 0,01 mg L⁻¹ (NBR 10004/04, ABNT, 2004) e de 0,5 mg L⁻¹ (BRASIL, 2008), o que não ocorreu no presente trabalho.

Como um dos objetivos do presente trabalho é verificar a utilização do resíduo sólido na correção de acidez de solos, foram realizadas análises dos atributos da qualidade como o Poder de Neutralização (PN) e o Poder Relativo de Neutralização Total (PRNT). Para determinação destes atributos foi necessária a avaliação dos óxidos de Ca e de Mg, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 Caracterização tecnológica do resíduo sólido para corretivo da acidez dos solos

Óxidos presentes no resíduo sólido	SO ₃ (%)	CaO (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	SiO ₂ (%)	Cr ₂ O ₃ (%)	P ₂ O ₅ (%)
		33,2	29,3	3,5	1,4	1,0	0,4
	K ₂ O (%)	MgO (%)	NiO (%)	SrO (%)	MnO (%)	Na ₂ O (%)	*P.F. (%)
	0,2	0,2	0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	30,42

Nota: *P.F. = Perda ao fogo.

A partir da caracterização realizada dos óxidos presentes no resíduo sólido, obteve-se o PN de 52,65%, PRNT de 27% e as somas dos CaO e MgO de 29,5%.

Para avaliar o efeito do resíduo sólido na correção de acidez do solo, os valores da Tabela 4 foram comparados com o produto comumente utilizado para calagem no Brasil: o calcário. Os valores encontrados para o calcário foram: PN de 92,52%, o PRNT de 77,17% e as somas dos CaO e MgO de 49,88%. Portanto, para atingir o valor de pH 7, foi necessário que o solo controle fosse misturado com calcário na proporção de 600 g de solo + 6g de calcário; com o resíduo, a proporção foi 600 g de solo + 150 g de precipitado. Portanto, para atingir os mesmos valores de pH a quantidade de calcário necessária para corrigir o pH inicial de 5.3 para 7 diferiu da quantidade utilizada de precipitado, fato que pode ser explicado pelo valor do PN, pois quanto maior o PN de um calcário, maior é a quantidade de ácidos que ele neutraliza. Assim, como o valor do PN observado no resíduo foi menor que o observado no calcário, justifica-se uma maior quantidade de resíduo sólido para atingir o pH desejado.

Feita a correção do pH do solo com o resíduo e com o calcário, aguardaram-se 45 dias para estabilização e fez-se uma outra caracterização do solo adicionado do resíduo sólido e do solo adicionado de calcário. Os resultados desta caracterização podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 Caracterização química inicial e após 45 dias de experimento do solo controle, solo + resíduo e solo + calcário

SOLO		SOLO + RESÍDUO INICIAL		SOLO + RESÍDUO 45 DIAS	
Elemento	Cmol/dm ³	Elemento	Cmol/dm ³	Elemento	Cmol/dm ³
Ca	0,86 Baixo	Ca	52,23 Alto	Ca	41,07 Alto
Mg	0,14 Baixo	Mg	0,79 Médio	Mg	0,8 Alto
K	0,04 Baixo	K	0,6 Alto	K	0,6 Alto
Al	0 Baixo	Al	0 Baixo	Al	0 Baixo
H+Al	3,69 Médio	H+Al	1,4 Baixo	H+Al	1,21 Baixo
CTC	4,73 Médio	CTC	55,02 Alto	CTC	44 Alto
pH	5,3	pH	7	pH	7,6
C	6,3 Baixo	C	25,5 Alto	C	28,08 Alto
MO	10,84 Baixo	MO	43,86 Alto	MO	48,25 Alto

SOLO		SOLO + CALCÁRIO INICIAL		SOLO + CALCÁRIO 45 DIAS	
Elemento	Cmol/dm ³	Elemento	Cmol/dm ³	Elemento	Cmol/dm ³
Ca	0,86Baixo	Ca	8,01Alto	Ca	8,01Alto
Mg	0,14Baixo	Mg	0,53Médio	Mg	0,42Médio
K	0,04Baixo	K	0,04Baixo	K	0,04Baixo
Al	0Baixo	Al	0Baixo	Al	0Baixo
H+Al	3,69Médio	H+Al	2,03Baixo	H+Al	1,63Baixo
CTC	4,73Médio	CTC	10,61Alto	CTC	12,55Alto
pH	5,3	pH	7	pH	7,6
C	6,3Baixo	C	7,05Baixo	C	7,65Baixo
MO	10,84Baixo	MO	12,13Baixo	MO	13,16Baixo

Nota: *Os valores de C e MO estão expressos em g/dm³.

Pode-se observar que os valores de Ca e Mg, tanto no início quanto depois de 45 dias, aumentaram no solo com o resíduo sólido. A aplicação do resíduo sólido promoveu aumento nos teores de Ca e Mg, de maneira muito mais acentuada quando comparado com o solo em que se utilizou calcário. Para Medeiros *et al.* (2008), a variação na relação Ca:Mg em corretivos da acidez do solo é uma das principais formas de alterar a disponibilidade desses nutrientes às plantas em solos ácidos. Os autores afirmam que elevadas concentrações de Ca trocável no solo, provocadas pela adição dos corretivos da acidez com alta relação Ca:Mg inibem a absorção de Mg e K pelas plantas de milho, diminuindo a produção de matéria seca e altura de plantas no estágio inicial de desenvolvimento. Em seu trabalho, Rigon *et al.* (2015) também observaram que o aumento no teor de Ca limita os teores de Mg para o nível crítico do girassol, em contrapartida, houve uma compensação da cultura com maior acúmulo de nutrientes nos aquênios sob menor rendimento.

Com relação ao K, o que se observa é que os valores que já se apresentavam baixos no solo controle (0,04 Cmol/dm³), mantiveram-se baixos (0,04 Cmol/dm³) no solo com adição de calcário e não se alteraram após os 45 dias de experimento; já no solo com

adição do resíduo os valores foram de baixo com $0,04 \text{ Cmol}_e/\text{dm}^3$ para alto com $0,6 \text{ Cmol}_e/\text{dm}^3$, não se alterando com 45 dias. Esse macronutriente é importante, pois, desempenha importante papel na regulação do potencial osmótico das células. Sob este aspecto, desempenha importante papel no fechamento e abertura dos estômatos. Além disso, atua como cofator em mais de 40 enzimas, participando do metabolismo proteico e fotossintético e, ainda, no transporte de assimilados. É de grande importância para o controle da eletroneutralidade celular (RAIJ, 2011).

Outro aspecto que deve ser observado são os valores de C e MO, que foram elevados no tratamento com o resíduo misturado ao solo (28,08 e 48,25 $\text{Cmol}_e/\text{dm}^3$ aos 45 dias, respectivamente), o que não ocorreu quando comparado ao calcário, que não conseguiu elevar de forma significativa esses valores (7,65 e 13,16 $\text{Cmol}_e/\text{dm}^3$ aos 45 dias, respectivamente). A MO do solo desempenha funções fundamentais para o adequado funcionamento deste, estando envolvida em processos físicos, químicos e biológicos. Em ambientes tropicais, o processo de degradação dos solos encontra-se intimamente relacionado à dinâmica da matéria orgânica (ROSCOE; MERCANTE; SALTON 2006). Esses resultados sugerem que a utilização do resíduo sólido no solo ao elevar os teores de matéria orgânica pode contribuir na prevenção de processos de degradação do solo, bem como para a fertilidade.

Papa *et al.* (2014), ao realizarem um trabalho buscando compreender os mecanismos que conduzem à decomposição do tecido vegetal, relatam que a matéria orgânica do solo é fundamental para a qualidade do solo e fertilidade na dinâmica do ciclo biogeoquímico de carbono, que pode influenciar os fluxos de gases de efeito estufa. Seus resultados demonstram o papel fundamental desempenhado pelo carbono aromático, pela proteção química dos outros polímeros da parede celular dos vegetais e a sua contribuição para a estrutura tridimensional da parede (3D) da célula.

A capacidade de troca de cátions (CTC) é uma característica físico-química fundamental dos solos, indicando a quantidade de íons positivos que um solo é capaz de reter em determinadas condições e permutar por quantidades estequiometricamente equivalentes de outros íons do mesmo sinal. Trata-se de um atributo de grande interesse prático, muito útil em estudos de fertilidade, além de ser indispensável para a caracterização de unidades de solos. Vários estudos utilizam a CTC como um parâmetro para indicar a qualidade do solo. Lago, Lacerda e Neumann (2012), em estudo sobre indicadores de qualidade dos solos em áreas sob plantio direto, com manejos diversificados (rotação milho-soja e sucessão feijão-sorgo) constataram correlação positiva entre MO (matéria orgânica) e CTC dos solos, em ambos os manejos investigados, e destacaram a importância do sistema de plantio direto na melhoria dos atributos químicos dos solos.

Quanto à CTC, ambos os solos apresentaram valores altos (55 Cmol/dm^3 no solo com resíduo e 12,55 Cmol/dm^3 no solo com calcário), porém a adição do resíduo ao solo promoveu aumento em torno de cinco vezes a CTC, fato que pode ser atribuído ao teor de matéria orgânica que também foi elevado pela adição do resíduo sólido, pois solos com alta CTC, em geral, apresentam alto teor de argila ou de matéria orgânica, o que é muito importante, tendo-se em vista que a CTC é um atributo de qualidade de solo. Dessa forma, os valores de CTC encontrados no solo controle analisado podem ser atribuídos ao teor de argila, uma vez o solo analisado foi classificado como tipo 3 ou seja, Latossolo vermelho-escuro com textura argilosa (> 35% de argila), segundo o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.

Os valores da CTC são influenciados pelas variações de Ca e Mg, os quais são de grande importância no tocante à fertilidade do solo, uma vez que indicam a capacidade desse solo em adsorver cátions em forma trocável que, em geral, servirão de nutrientes para as plantas. A calagem eleva a disponibilidade de nutrientes, aumentando o complexo de troca para as plantas e o valor da CTC efetiva. Essa prática de calagem além de saturar o complexo de troca com Ca e Mg, eleva o pH até um nível em que o Al se torne praticamente indisponível para as culturas (RONQUIM, 2010).

Os resultados da caracterização do solo adicionado de resíduo sólido e o acompanhamento de seu comportamento durante 45 dias permitem sugerir que o resíduo sólido pode ser utilizado em substituição ou em complementação ao calcário, reduzindo custos para os produtores e contribuindo para melhorar a qualidade de solos degradados.

5.3 Resultados das análises microbiológicas

Na Tabela 6 encontra-se a contagem total de bactérias e fungos, com resultados expressos em UFC g^{-1} , realizada a cada 10 dias nos primeiros 30 dias e a última após um intervalo de 15 dias, totalizando os 45 dias de análise.

Tabela 6 Contagem total de bactérias e fungos

Amostra	Coleta (dias)	Conc. média Bactérias (UFC g ⁻¹)	Conc. média Fungos (UFC g ⁻¹)
Solo	0	1,0x10 ¹	1,4x10 ³
Solo + Resíduo	10	2,9x10 ⁶	1,1x10 ⁶
Solo + Resíduo	20	1,12x10 ⁶	3,2x10 ⁶
Solo + Resíduo	30	8,0x10 ⁶	2,8x10 ⁶
Solo + Resíduo	45	5,0x10 ⁷	2,6x10 ⁶
Solo + Calcário	10	1,8x10 ⁶	1,4x10 ³
Solo + Calcário	20	2,1x10 ³	4,0x10 ²
Solo + Calcário	30	6,2x10 ⁴	4,0x10 ²
Solo + Calcário	45	1,5x10 ⁵	8,0x10 ²

A contagem total de fungos e bactérias revelou um aumento na comunidade tanto de fungos quanto de bactérias, tanto no solo com calcário, quanto no solo com o resíduo sólido, porém, pode-se observar que houve um aumento mais acentuado tanto nas comunidades de bactérias quanto de fungos no solo que continha o resíduo sólido, sugerindo que este resíduo não se mostrou tóxico aos micro-organismos e estimulou a sua proliferação.

O aumento nas comunidades tanto de fungos quanto de bactérias nos solos que continham o calcário e o resíduo pode ser explicado pelo trabalho de Ma, Liu e Li (2015) que sugerem que a neutralização da acidez do solo pode reduzir o estresse sobre os micro-organismos do solo ácido. Além disso, o aumento da MO, acentuado com a adição do resíduo sólido, pode ter estimulado o desenvolvimento dos micro-organismos do solo.

Os micro-organismos aumentam a fertilidade do solo, pela conversão (Fixação) do nitrogênio atmosférico em compostos nitrogenados utilizados pelas plantas na síntese de proteínas. Convertem as substâncias orgânicas em compostos inorgânicos, tornando-os úteis para os vegetais. Os micro-organismos decompõem os vegetais e animais mortos, mas não é possível imaginar, às vezes que as reações bioquímicas realizadas fertilizam o solo pelo fornecimento de nutrientes. Este é um processo complexo, do qual participam muitos tipos de micro-organismos. Calcula-se que 0,4 ha de solo fértil contém cerca de 500 kg de bactérias e, talvez, quantidades equivalentes de fungos, protozoários e algas. É uma verdade generalizada que, quanto mais micro-organismos existirem no solo mais produtivo ele será (VAL-MORAES *et al.*, 2009).

Arantes *et al.* (2007) verificaram que a utilização de calcário no solo aumentou significativamente a atividade microbiana e afirmou que a calagem traz benefícios aos micro-organismos, principalmente devido às alterações nas condições físicas, químicas e biológicas dos solos.

Para Moraes Neto (2009), a calagem favorece não só a formação do húmus, como auxilia na eliminação de certos produtos orgânicos intermediários que poderão atingir quantidades tóxicas. Os organismos favoráveis do solo e, também, os desfavoráveis, como,

por exemplo, o que produz a sarna da batata, são favorecidos, na sua maioria, pela calagem. A formação de nitratos e de sulfetos no solo é muito acelerada pela elevação do pH. As bactérias fixadoras de nitrogênio do ar, tanto as não simbióticas como as dos nódulos das leguminosas, são muito estimuladas pelas práticas de calagem.

A estrutura das comunidades microbianas do solo é afetada por fatores ambientais bióticos e abióticos, tais como características de composição da comunidade vegetal e químicas do solo, entre outros. No entanto, pouco se sabe sobre a importância relativa desses fatores sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo. Massenssini *et al.* (2015) determinaram que as características químicas do solo ou a identidade de espécies de plantas, são mais importantes para a determinação da estrutura da comunidade microbiana do solo. Ainda segundo os autores, a presença de comunidades bacterianas do tipo *archaea*, mostraram-se mais sensíveis a alterações no ambiente químico do solo, o que sugere uma maior importância destes grupos microbianos na adaptação das plantas.

Faoro *et al.* (2010) analisaram a biodiversidade bacteriana no ecossistema da Mata Atlântica. Os autores verificaram que o solo possui um alto nível de diversidade. A análise estatística mostrou que a diversidade de bactérias é influenciada por fatores como altitude, Ca, Mg, Al e o teor de P, que também afetaram a diversidade dentro da mesma espécie. Altas altitudes e níveis altos de Ca e Mg foram associados a níveis elevados de biodiversidade, já níveis mais elevados de Al e P estavam associados a menores níveis de biodiversidade. Sendo assim, o aumento das comunidades bacterianas no presente trabalho pode também estar relacionado com os altos teores de Ca e Mg, já descritos anteriormente.

A grande abundância de fungos e bactérias, encontrada nos tratamentos utilizando os corretivos do presente trabalho, pode também estar relacionada com o rigoroso controle de umidade realizado durante o experimento, pois, vários autores relatam que a umidade está relacionada com a abundância bacteriana e quanto maior o teor de umidade, maior será o número de bactérias presentes. No entanto, o excesso de água reduz a porcentagem de ar presente no solo, o que afeta muito o desenvolvimento e a sobrevivência de micro-organismos que necessitam de oxigênio (SUTHERSAN, 1999). Melz e Tiago (2009), verificaram que as bactérias foram afetadas no período chuvoso, predominando na área de reserva natural que sofreu um aumento de umidade. Os fungos predominaram no período chuvoso, enquanto que os actinomicetos predominaram no período seco.

5.4 Resultados do teste de fuga

O critério de validação dos resultados estabelece que, para que não haja fuga ou atração significativa na fração da parcela experimental contaminada pelo resíduo adicionado

ao solo, a distribuição dos organismos na parcela experimental deve-se encontrar na faixa entre 40 e 60% (ISO, 2008). Nas amostras de solo com adição de resíduo sólido, os resultados sugerem ter havido fuga, pois a distribuição das minhocas foi de 33,3% na parcela experimental enquanto que no solo + resíduo + calcário não foi encontrada nenhuma minhoca, não atingindo os limites de validação do teste. Números negativos mais próximos ao limite superior de 60% foram encontrados no solo com adição somente de calcário (-56%), não indicando fuga. Os resultados indicam, portanto, que houve fuga nos tratamentos, nos quais se testou o resíduo com uma porcentagem de fuga de 66,7% no solo + resíduo e 100% no solo + resíduo + calcário. Porém, é importante ressaltar que não houve mortalidade no solo com resíduo, nem foi observada visualmente mudança na coloração das minhocas, tampouco diminuição da motilidade das mesmas.

De acordo com Abdul Rida e Bouche (1997), os testes de toxicidade compreendem uma parte muito curta do período de vida de animais bioindicadores ambientais. Deste modo, a sensibilidade inerente ao teste é baixa, ou seja, mortes irão ocorrer somente com uso de substâncias de alta toxicidade. Por outro lado, as substâncias de baixa toxicidade em altas concentrações podem induzir também a morte de minhocas.

No caso do solo adicionado de resíduo, outros testes devem ser realizados para confirmar sua toxicidade. Apesar do comportamento de fuga ter mostrado que o precipitado tem efeito de toxicidade, uma possível explicação para tal comportamento pode estar no forte odor característico do precipitado, na textura do solo misturado com o resíduo, que resultou na formação de grumos (Figura 3), ou em alguma outra característica química não investigada no presente trabalho.



Figura 3 Textura do solo quando misturado com o resíduo sólido.

Outra possível explicação pode estar na presença de metais como Ni e Cr, que no presente trabalho apresentaram altas concentrações no resíduo sólido (320,48 mg/dm³ e 1006,43 mg/dm³, respectivamente), podendo estes níveis terem apresentado toxicidade

para as minhocas. De acordo com Natal da Luz, Ribeiro e Sousa (2004), que avaliaram a resposta das minhocas em quatro solos diferentes, com diferentes graus de contaminação por diferentes tipos de metais, houve registro de fuga de mais de 80%, sendo que as quantidades dos metais Ni e Cr encontradas nos quatro diferentes tipos de solos foi de 17, 25, 22, 23 mg/Kg e 10, 24, 33 e 33 mg/Kg, respectivamente.

Sivakumar (2015) destaca em seu trabalho a importância das minhocas como indicadores para poluição com metais, e destaca os efeitos do Cr sobre a sobrevivência, o autor relata que as minhocas expostas apresentaram mudanças comportamentais (movimentos lentos e formação de estrutura em nó) e sintomas morfológicos (abaulamento clitelar e exsudação de líquido celômico) e que estas mudanças eram dependentes da concentração do metal.

Outra possibilidade para a fuga das minhocas no presente trabalho seriam as altas concentrações de Cu (10 mg dm^3) encontradas no solo utilizado, aliadas às altas concentrações de Zn ($101,89 \text{ mg dm}^3$) encontradas no resíduo sólido. De acordo com Lukkari e Haimi (2005), que realizaram teste de fuga com três espécies de minhocas, visando avaliar seu comportamento em solos expostos a Cu e Zn, todas as espécies evitaram o solo contendo os metais Cu e Zn.

Vários trabalhos relatam a utilização de minhocas como importantes bioindicadores em trabalhos de toxicidade e as utilizam em diversos tipos de investigação sobre diversos tipos de contaminantes no solo. César *et al.* (2008) avaliaram o potencial tóxico de solos acrescidos de lodo de esgoto, com altos níveis de Cu, Pb, Hg, e Zn, utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei* e relatam que houve fuga de 98,3%.

Ramadass *et al.* (2015) utilizaram minhocas, testes com enzimas desidrogenase do solo e urease e avaliaram a nitrificação, para estudar os efeitos do óleo de motor no solo, concluindo que a sobrevivência de minhocas e a nitrificação poderiam servir como índices adequados para avaliar a poluição de óleo de motor no solo.

Visto que a mistura do solo controle com o resíduo apresenta uma alta quantidade de matéria orgânica e que as minhocas possuem preferência por solos com alta quantidade de matéria orgânica, supõe-se que o que pode ter realmente causado a fuga, pode ter sido as altas concentrações dos diferentes metais analisados ou outras características químicas não analisadas no presente trabalho.

5.5 Resultados teste germinação das sementes de alface

De acordo com o que se observa nas figuras abaixo, todos os tratamentos apresentaram plantas normais (Figuras 4A e 4B) e com desenvolvimento foliar semelhante (Figura 5).

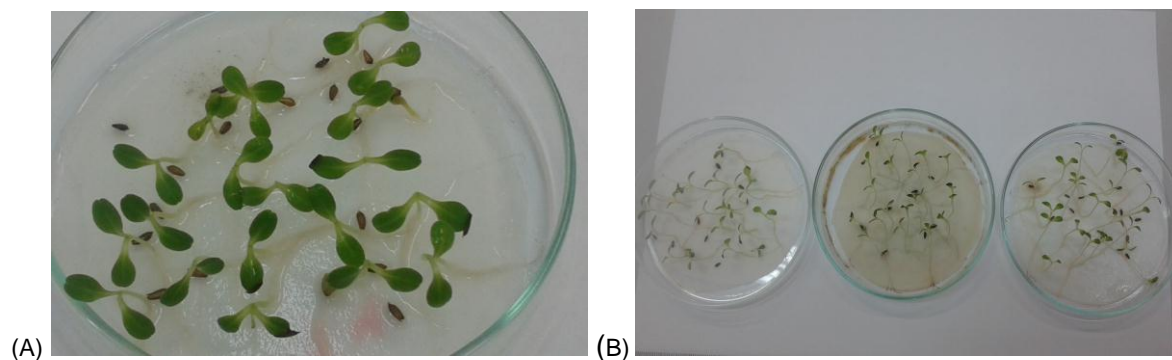


Figura 4 (A) Plântulas de alface normais. (B) Plântulas de alface normais nos diferentes tratamentos.

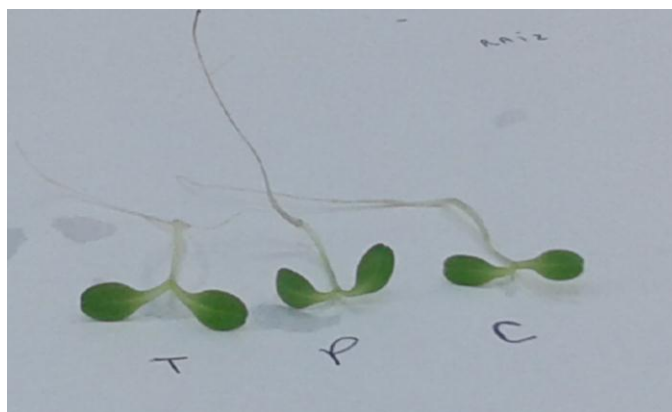


Figura 5 Desenvolvimento foliar das plântulas de alface, após 7 dias de cultivo com os tratamentos: (T) testemunha, (P) precipitado e (C) calcário.

Os resultados dos testes de germinação de sementes de alface, referentes à porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e velocidade de germinação, estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 Porcentagem de germinação, Índice de velocidade de germinação (IVG), velocidade de germinação (VG), em sementes de alface submetidas aos tratamentos: testemunha, resíduo e calcário.

Tratamento	Germinação(%)	IVG	VG
Testemunha	94 a	17,04 a	1,59 a
Calcário	92 a	15,09 a	1,66 a
Resíduo	82 a	3,09 b	3,09 b

Notas: *Letras iguais nas colunas correspondem a médias iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, pode-se verificar que, para a variável porcentagem de germinação, após 7 dias de cultivo, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, o que indica que o precipitado proveniente do processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico não afeta o processo de germinação das sementes de alface.

Já para os resultados de IVG, o que se observa é que a menor média obtida foi quando se utilizou o resíduo sólido, comparado à testemunha e ao calcário que tiveram valores de IVG semelhantes e sem diferença estatística significativa. Portanto, estes resultados indicam que a utilização do resíduo no solo reduz o índice de velocidade de germinação, ou seja, apresentam um menor número de sementes germinadas por dia, pois quanto menor o IVG, menor a germinação média diária.

O tempo médio de germinação corresponde aos dias que as sementes demoram para germinar. No caso do presente trabalho, o que se observa é que a VG para o resíduo foi a maior entre os demais tratamentos, em média 3 dias. Já os resultados da VG dos outros tratamentos (testemunha e calcário) não apresentaram diferença estatística significativa entre eles, ocorrendo a germinação em, aproximadamente, 1 dia.

Os resultados referentes ao comprimento da raiz e da parte aérea (PA) das plântulas de alface após 7 dias de cultivo podem ser observados na Figura 6.

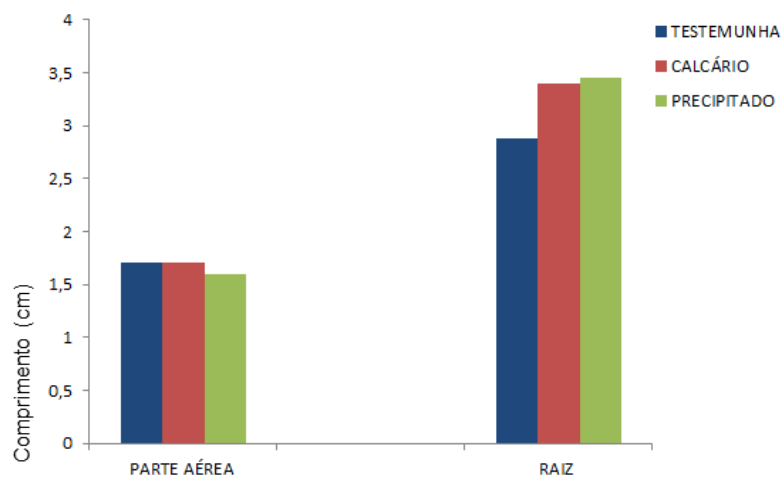


Figura 6 Comprimento de raiz e parte aérea da plântula de alface, submetida ao tratamento com calcário e resíduo sólido.

Notas: *Não foram observadas diferenças significativas para as variáveis parte aérea (PA) e raiz pelo teste F da ANOVA, devido a isso não foi aplicado o teste de comparação de médias.

Os resultados apresentados na Figura 6 permitem concluir que a incorporação do resíduo sólido ao solo não interfere no crescimento da raiz e da parte aérea das plântulas de alface, pois não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, sugerindo que mesmo o precipitado tendo apresentado um IVG menor e uma VG maior comparado aos outros tratamentos, ainda assim poderia ser utilizado, pois, não causou efeito inibitório de crescimento da parte aérea nem da raiz das plântulas de alface.

Segundo Souza, Rodrigues e Rodrigues (1997), a raiz é um indicador mais sensível aos extratos aquosos do que a germinação, uma vez que a inibição do sistema radicular seria determinante, pois impediria o desenvolvimento normal da planta. Quando o comprimento e desenvolvimento do sistema radicular de uma planta são afetados, isso pode comprometer todo o seu ciclo de vida, pois a planta depende de um bom desenvolvimento do sistema radicular para sua fixação ao solo e, principalmente, para absorção de água e nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2015a).

Na Figura 6, apesar de se observar que o valor do comprimento da raiz não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos, visualmente verifica-se que o resíduo sólido contribuiu de forma favorável ao seu desenvolvimento, o que pode ser observado na Figura 7.



Figura 7 Desenvolvimento da parte aérea e da raiz, das plântulas de alface nos diferentes tratamentos: (C) calcáreo, (T) testemunha e (P) precipitado.

Desta forma, todos os resultados obtidos no presente trabalho, com o resíduo estudado, sugerem sua possível utilização como corretivo da acidez do solo do tipo Latossolo vermelho distroférico; considerando que, para cada tipo de solo, uma composição típica de corretivo é necessária, mais estudos devem ser realizados para que este tipo de resíduo, futuramente, um subproduto da produção de bioetanol, possa ser utilizado em substituição ou complementação ao calcáreo, contribuindo, assim, com a redução da extração do calcáreo que traz vários danos ao meio ambiente.

A extração de calcáreo é geradora de impactos, como a retirada da vegetação nativa, erosão, assoreamento de cursos d'água, além da destruição inexorável de fósseis. (MARTINS NETO; RAMALHO 2010). Em seu trabalho sobre a extração do calcáreo e a sua relevância para a ocupação e uso do cerrado do Piauí, a propósito da extração das jazidas de calcáreo, Alves e Monteiro (2013) concluíram que Savanas estão presentes em todo o planeta, de forma heterogênic, com nomenclatura diferenciada, significativa biodiversidade,

mas diante da intervenção humana verificam-se danos em áreas originárias e diminuição de distintas espécies, que provocam impactos ambientais de grandes dimensões.

Tendo em vista a inexistência de trabalhos que caracterizaram e que realizaram testes com sementes de alface para avaliar o efeito do resíduo proveniente da produção do bioetanol na germinação destas, bem como outros bioensaios de toxicidade, destaca-se a importância deste trabalho na tentativa de dar um destino adequado ao resíduo gerado na produção de bioetanol.

6 CONCLUSÃO

- O resíduo gerado na produção de bioetanol, durante a etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, é eficaz na correção do pH do solo. O valor de pH manteve-se durante os 45 dias;

- Contribuiu com a melhoria dos atributos químicos do solo de maneira geral, principalmente com teores de Ca, Mg, C, e CTC, além de ter contribuído com o aumento de MO, importantes indicadores de qualidade do solo;

- A inserção do resíduo sólido no solo contribuiu significativamente para aumento das comunidades microbianas do solo, podendo-se concluir desta forma, que o precipitado não apresentou toxicidade aos micro-organismos;

- O teste de comportamento, com minhocas *Eisenia fétida* sugere que o resíduo sólido apresentou toxicidade;

- Os testes de germinação mostraram que, apesar de os tratamentos com o resíduo apresentarem menor número de sementes germinadas por dia e, conseqüentemente, um maior tempo médio de germinação comparado com os tratamentos testemunha e calcário, o resíduo não influenciou na porcentagem de germinação e nem no desenvolvimento das plântulas do alface.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resíduo sólido gerado na etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico conhecido com *overliming* que, de acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, mostrou-se eficiente na correção de pH do Latossolo vermelho distroférico, melhorando todos os atributos químicos de qualidade de solo que foram aqui investigados e induziu a fuga das minhocas nos bioensaios de toxicidade realizados com minhocas da espécie *Eisenia fétida*, demonstrando a toxicidade do resíduo. Como a duração do teste de comportamento é curto e sendo o único aplicado com minhocas neste trabalho, sugere-se que outros testes como: toxicidade aguda, ensaios de bioacumulação, teste de letalidade entre outros sejam aplicados, utilizando-se a mesma espécie.

Outra sugestão seria deixar as minhocas expostas ao resíduo por um tempo maior (para uma possível adaptação). Visto que houve um aumento nas comunidades, tanto de fungos quanto de bactérias no solo com o resíduo sólido, em trabalhos futuros seria interessante a determinação do quociente metabólico (qCO_2), uma vez que este, indica a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para biossíntese, sendo um sensível indicador para estimar a atividade biológica e a qualidade do substrato.

Testes avaliando o potencial do resíduo sólido como corretivo da acidez poderiam também ser realizados em outros tipos de solo, assim como também ser testado em ensaios com outras plantas e, de posse de todas essas informações, será possível dar uma nova destinação a este resíduo e agregar valor como um subproduto da produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ABDUL RIDA, A. M. M.; BOUCHE, M. B. Earthworm toxicology: From acute to chronic tests. 458 *Soil Biology & Biochemistry*, **New York**, 29: 699–703, 1997.
- ALBUQUERQUE, J. A.; MEDEIROS, J. C.; COSTA, A.; RENGEL, M. Aplicação de resíduo alcalino na superfície de Cambissolos. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p.888-898, 2011.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 485-4861, 2010.
- ALVES, M. J. R.; MONTEIRO, M. S. L. Extração do calcário e a sua relevância para a ocupação e uso do cerrado do Piauí. ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL - SOBER Nordeste, 8. Pluralidades Econômicas, Sociais e Ambientais: interações para reinventar o Nordeste rural, novembro de 2013, Parnaíba- PI. **Anais...** Parnaíba – PI: SOBER Nordeste, 2013. p. 1-18.
- ARANTES, S. A. C. M.; LAVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Efeito da calagem e do glifosato na atividade microbiana de diferentes classes de solo. **Pesticidas: Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 7, p. 19-28, 2007.
- ARAÚJO. A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.
- ARRUDA, P. V.; CHAUD, L. C. S.; FELIPE, M. G. A. P., RAMOS, L. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, Ituverava, v. 5, n. 1, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 8633: Carvão vegetal – Determinação do poder calorífico - Método de ensaio. Rio de Janeiro, 1984.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 10004: Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 71 p.
- AZADI, P.; INDERWILDI R. O.; FARNOOD, R.; KING, A. D. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, New York, v. 21, p. 506–523, 2013.
- BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M. Análise preliminar da produção de etanol a partir da celulose. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 272-284, 2009.
- BLOUIN, M.; HODSON, M.E.; DELGADO, E.A.; BAKER, G.; BRUSSAARD, L.; BUTT, K.R.; DAI, J.; DENDOOVEN, L.; PERES, G.; TONDOH, J.E.; CLUZEAU, D.; BRUN, J.J. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. **European Journal of Soil Science**, v. 64, p. 161-182. 2013.
- BRANCO, S. B.; SILVEIRA, C. B.; CAMPOS, M. L.; GATIBONI, L. C.; MIQUELLUTI, D. J. Chemical attributes of soil and leaching of phenolic compounds after addition of alkaline solid residue. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 17, p. 543-550, 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 397, de 3 de abril de 2008. Altera o inciso II do § 4º e a Tabela X do § 5º do art. 34 da Resolução CONAMA nº 357/05 e acrescenta os §6º e 7º. Alterada pela Resolução 410/09. Diário Oficial da União, Brasília – DF, n. 66, 7 de abril de 2008, Seção 1, p. 68-69,, 2008.

CANFORA L.; PAPA G. L.; ANTISARI, L. V.; BAZAN, G.; DAZZI, C.; BENEDETTI, A. Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean área. **Applied Soil Ecology**, New York, v. 93, p. 120–129, 2015.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012 p. 1-15, 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CESAR, R. G.; EGLER, S. G.; ALAMINO, R. C. J.; POLIVANOV, H.; SILVA, R. C.; CASTILHOS, Z. C.; ARAUJO, P. C. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, dez. 2008 .

DÍAZ, M. J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 891-899. 2009.

EDMOND, J. B.; DRAPALA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, n. 71, p. 428-434, 1958.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA -. Embrapa milho e sorgo. **Fertilidade de solos**. 2.ed. Brasília – DF: Embrapa milho e sorgo, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Manual de análises de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília - DF: Embrapa informação Tecnológica, 2009.

FAORO, H.; ALVES, A. C. ; SOUZA, E. M. ; RIGO, L. U. ; CRUZ, L. M. ; AL-JANABI, S. M.; MONTEIRO, R. A. ; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 14, p. 4744-4749. 2010.

FONSECA, B. G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*. 2009. 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade São Paulo, Lorena, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503. 2009.

GODOI, I.; SENE, L.; CARACCILO, A. B. Assessment of the bacterial community structure in a Brazilian clay soil treated with atrazine. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 307-311, 2014.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresouce Technology**, New York, v. 100 p. 10-18, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – ISO. **Norm ISO 17512-1: Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior - pt 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)**. Geneve, Switzerland, 2008. 25p.

IRIZAR, A.; RODRÍGUEZ, M. P.; IZQUIERDO, A.; CANCIO, I.; MARIGÓMEZ, I.; SOTO, M. Effects of soil organic matter content on cadmium toxicity in *Eisenia fetida*: implications for the use of biomarkers and standard toxicity tests. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p. 181–192, 2015.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. Analytical methods for use in plant analysis. Calif.Agr.Sta.Exp.Bull. 766. Berkeley 1959.

KWAK, J.; AN, Y. Ecotoxicological effects of nanomaterials on earthworms: a review. **Human and Ecological Risk Assessment**, Londres, v. 21, p. 1566-1575, 2015.

LAGO, W. N. M.; LACERDA, M. P. C.; NEUMANN, M. R. B. Indicadores de qualidade dos solos na microbacia do Ribeirão Extrema, Distrito Federal: Parte II **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.16, n.7, p.721–729, 2012.

LEVEQUE, T.; CAPOWIEZ, Y.; SCHRECK, E.; XIONG, T.; FOUCAULT, Y.; DUMAT, C. Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils. **Environmental Pollution**, New York, v.191, p. 199–206, 2014.

LIU, S.; ZHOU, Q.; WANG, Y. Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCB. **Chemosphere**, v. 83, p. 1080–1086, 2011.

LUKKARI, T.; HAIMI, J. Avoidance of Cu- and Zn contaminated soil by three ecologically different earthworm species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 62, p. 35–41, 2005.

MA, X.; LIU, M.; LI, Z. Changes in microbial properties and community composition in acid soils receiving wastewater from concentrated animal farming operations. **Applied Soil Ecology**, New York, v. 90, p. 11–17, 2015.

MÄKITALO M.; MAURICE, C. JIA, Y.; ÖHLANDER, B. Characterization of green liquor dregs, potentially useful for prevention of the formation of acid rock drainage. **Minerals**, v. 4, p. 330-344, 2014.

PROIETTI, P.; FEDERICI, E.; FIDATI, L.; SCARGETTA, S.; MASSACCESI, L.; NASINI, L.; REGNI, L.; RICCI, A.; CENCI, G.; GIGLIOTTI, G. Effects of amendment with oil mill waste and its derived-compost on soil chemical and microbiological characteristics and olive (*Olea europaea* L.) productivity. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, New York, v. 207, p. 51-60, 2015.

QUÍMICA VERDE NO BRASIL: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 2011. 420 p.

RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Implications of motor oil pollution: Earthworm survival and soil health. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, v. 85, p. 72-81, 2015.

RAMOS, M.L.G.; MENEGHIN, M.F.S.; MARIA FERNANDA; PEDROSO, C.; GUIMARAES, C.M.; KONRAD, M.L.D. Effect of management systems and planting on functional microorganisms density, at cerrado soil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, p. 58-68, 2012.

RIGON, J. P. G.; CAPUANI, S.; ROSSI, R. F.; BULL, L. T.; FERNANDES, D. M. Availability of nutrients, productive properties, and quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds in acid soils amended with different molar ratios between Ca and Mg. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, p. 1369-1380, 2015.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. **Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico**. São Joaquim da Barra: Colégio Iara Coimbra. 2008.

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010. 26 p.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J.C. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas**: modelagem matemática e métodos auxiliares. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 304 p.

SANTOS, C. A.; KRAWULSKI, C. C.; BINI, D.; GOULART FILHO, T.; KNOB, A.; MEDINA, C. C.; ANDRADE FILHO, G.; NOGUEIRA, M. A. Reclamation status of a degraded pasture based on soil health indicators. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 72, p. 295-202, 2015.

SERRAT, B. M.; LIMA, M. R.; GARCIAS, C. E.; FANTIN, E. R.; CARNIERI, I. M. R. S. A. CARNIERI; PINTO, L. S. **Conhecendo o solo**. Curitiba: UFPR/Setor de Ciências Agrárias; Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, 2002.

SILVA JÚNIOR, F. M. R.; SILVA, P. F.; GUIMARÃES, F. S.; ALMEIDA, K. A.; BAISH, P. R. M.; MUCCILLO-BAISH, A. L. Ecotoxicological tools for landfarming soil evaluation in a petrochemical complex area. **Pedosphere**, New York, v. 24, p. 280-284, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152- 178, 1999.

SIVAKUMAR, S. Effects metals on earthworm life cycles: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 1-16, 2015.

SOUZA, A. P. S. F.; RODRIGUES, R. R. A.; RODRIGUES, T. J. D. Efeito do potencial alelopático de três leguminosas forrageiras sobre três invasoras de pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, 1997.

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

SUTHERSAN, S.S. Remediation Engineering Design Concepts. Ed. Lewis Publishers. 1999.

SPIASSI, A.; TORRES, F.; PEREIRA NOBREGA, L.H.; CESTONARO, T.; SILVA DE MENDONÇA COSTA, M.S. Toxicity of biofertilizers on seeds of lettuce and maize. **Centifica**,

Jaboticabal, v. 43, p. 156-164, 2015.

STELLA, T.; COVINO, S.; BURIANOVÁ, E.; FILIPOVÁ, A.; KŘESINOVÁ, Z.; VOŘÍŠKOVÁ, J.; VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P.; CAJTHAML, T. Chemical and microbiological characterization of an aged PCB-contaminated soil. **Science of the Total Environment**, New York, v.533, p.177–186, 2015.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 9, n. 9, p. 1621-1651. 2008.

TAMANINI, C; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.

TORRE, M. J.; MORAL, A.; HERNÁNDEZ, M. D.; CABEZA, E.; TIJERO, A. Organosolv lignin for biofuel. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 45, p. 58–63. 2013.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; CARARETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, p. 7-16, 2009.

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

ZHENG, Y; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agriculture and Biology**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 23-68. 2009.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

CAPÍTULO 2 UTILIZAÇÃO DA LIGNINA PROVENIENTE DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL NA ADSORÇÃO DE CHUMBO

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de redução dos impactos ambientais inerentes às atividades industriais é crescente e configura tendências que sinalizam para o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos que minimizem ou reduzam a geração de resíduos tóxicos, tendo como princípio a necessidade de um desenvolvimento sustentável e com baixo custo.

Nas últimas décadas, vem ocorrendo um aumento de pesquisas sobre a poluição antropogênica dos metais pesados, devido à sua alta toxicidade, persistência e tendência à bioacumulação. Uma vez que os métodos convencionais para a sua remoção são muito caros ou criam grandes quantidades de lamas tóxicas, uma grande atenção tem sido dada às novas tecnologias.

A contaminação do ambiente por metais pode ocorrer como resultado de diversas atividades (industriais, mineração, chapeamento de metal, curtumes, refino de petróleo, entre outros). As contaminações em ecossistemas agrícolas, por possuírem uma estreita relação com a saúde humana, geram riscos potenciais à saúde das populações rurais pelo efeito cumulativo dos metais pesados em culturas. Resíduos de íons metálicos provenientes de diferentes atividades contaminam lençóis freáticos e reservatórios de água que abastecem cidades, podendo causar doenças em populações que fazem uso deste recurso.

Dentre os metais pesados, destaca-se o chumbo (Pb), por sua grande persistência e alta toxicidade e que, em águas residuais industriais, é uma das mais importantes causas de contaminação para os seres humanos e para o meio ambiente.

Estudos utilizando diferentes adsorventes naturais na remoção de íons metálicos têm sido realizados, porém, têm-se buscado materiais de baixo custo, como por exemplo, os resíduos agrícolas.

A biomassa lignocelulósica é considerada como a fonte de energia do futuro. Sendo assim, a utilização da biomassa do ponto de vista energético, através da hidrólise em açúcares fermentáveis, aumentará a produção de etanol combustível sem aumentar a área plantada. Nesse contexto, o desenvolvimento do etanol de segunda geração, produzido a partir da celulose presente nos resíduos agrícolas e em outras matérias-primas vegetais demonstra a vantagem de reduzir a competição entre biocombustíveis e alimentos.

Porém, após a remoção da fração hemicelulósica, da biomassa, faz-se necessário um tratamento para remoção da lignina, de forma a incrementar a ação das celulases que irão promover a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis. No processo de deslignificação empregando NaOH ocorre, então, a geração de um resíduo líquido e alcalino denominado de licor negro, rico em pentoses e lignina solúvel e insolúvel.

O objetivo do trabalho foi realizar a caracterização química do licor negro resultante do processo de deslignificação da biomassa, durante a produção de etanol, e, em seguida, realizar a precipitação da lignina presente no mesmo, para utilizá-la como biossorvente do metal pesado Pb(II). Para otimizar o processo de adsorção dos íons Pb(II), empregou-se planejamento experimental usando a técnica de delineamento composto central (DCC) e superfície de respostas, visando estabelecer a máxima eficiência na adsorção do Pb pela lignina durante o processo.

É importante ressaltar que não há registros de trabalhos na literatura que tenham utilizado a lignina proveniente do processo de produção de bioetanol como biossorvente de metais pesados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Utilizar a lignina precipitada do licor negro proveniente do processo de deslignificação da produção de etanol de segunda geração, visando estabelecer a adsorção do chumbo em soluções aquosas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química do licor negro proveniente da etapa de deslignificação da produção de etanol de segunda geração;

- Empregar um planejamento experimental para estudar o efeito da concentração do metal, da massa do biossorvente (lignina) e do pH sobre a adsorção do chumbo, por meio da técnica de delineamento composto central (DCC) e superfície de respostas;

- Avaliar a interação entre os fatores sobre as respostas;

- Obter modelos matemáticos significativos;

- Realizar estudo cinético da adsorção do metal pesado Pb em condições otimizadas do processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos

De acordo com Faba, Diaz e Ordonez (2014), o esgotamento das matérias-primas não renováveis como o petróleo, carvão ou gás natural e a crescente consciência ambiental têm motivado a valorização da biomassa para produção de energia. Hoje as pesquisas estão focadas nos biocombustíveis de segunda geração, que permitem a transformação da biomassa lignocelulósica em energia. A transformação da biomassa em biocombustível pode ser efetuada por vias químicas e biológicas. Entre as vias químicas, existem três possibilidades principais: gaseificação, pirólise e hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares, para posterior fermentação pelos micro-organismos em etanol ou outros combustíveis.

O uso do bagaço de cana como matéria-prima apresenta uma série de vantagens, pois já é disponibilizado processado, está disponível em grandes quantidades, tem custo mínimo e está pronto para uso local, evitando desta forma custos com transporte. No Brasil, a produção de etanol lignocelulósico já é uma realidade, tendo em vista que, de acordo com Oliveira (2015), até agosto de 2015, a empresa Granbio já produziu 3 milhões de litros de etanol de segunda geração com palha de cana.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil não é apenas o maior produtor de cana, mas também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol devendo alcançar uma taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas. A projeção de produção de etanol no Brasil, a partir da cana-de-açúcar, devido, principalmente, ao crescimento do consumo interno, está estimada em 58,8 bilhões de litros para 2019.

Com o surgimento e necessidade de desenvolver combustíveis alternativos de transporte sustentável, o bioetanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica é considerado uma opção viável aos combustíveis derivados do petróleo. A utilização eficaz de matérias-primas de biomassa requer o desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento que são necessários para separar os três principais biopolímeros (celulose, hemicelulose e lignina). Uma das questões-chave relativas ao processo de pré-tratamento é a recuperação total da matéria-prima, pela melhor utilização de todos componentes lignocelulósicos como produtos comercializáveis (BROSSE; IBRAIM; RAHIM, 2011).

A viabilidade econômica da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica reside em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da celulose, como

também os açúcares solúveis liberados da hemicelulose, que podem representar uma considerável proporção de todos os açúcares disponíveis (DIAZ *et al.*, 2009).

A hidrólise enzimática da celulose é o procedimento mais comum para a redução dos polissacarídeos em monossacarídeos como a glicose. Nesse procedimento, os materiais são conduzidos à redução dos polímeros, usualmente através de uma mistura de diversas enzimas (celulases). Os três maiores grupos de celulases envolvidas no processo de hidrólise são as endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002).

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta e fatores como o teor de lignina, cristalinidade da celulose e tamanho das partículas do substrato podem limitar a sua digestibilidade. Nesse sentido, alguns tipos de pré-tratamentos têm sido utilizados com o objetivo de melhorar esta digestibilidade, através da ação sobre a celulose, hemicelulose e lignina, os três principais componentes da biomassa lignocelulósica. Dentre os pré-tratamentos empregados, podem ser citados os pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos ou, ainda, a combinação destes antes de sua hidrólise, permitindo uma utilização mais eficiente dos polissacarídeos da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Esses pré-tratamentos permitem a remoção eficiente da porção hemicelulósica e da lignina que desorganiza a estrutura da biomassa celulósica, beneficiando o trabalho das enzimas que atuam na conversão de carboidratos em açúcares. Desse modo, o pré-tratamento é uma estratégia para facilitar o rompimento das fibras, aumentar a área superficial, expondo e disponibilizando a molécula de celulose (GOUVEIA, 2009; MOSIER *et al.*, 2005; ALVIRA *et al.*, 2010).

Dentre os pré-tratamentos, podem ser citados: o pré-tratamento de explosão à vapor que é o método mais comumente utilizado para o pré-tratamento físico de materiais lignocelulósicos e cuja biomassa é tratada com vapor de alta pressão, saturado e, em seguida, a pressão é subitamente reduzida, o que faz com que os materiais passem por uma descompressão explosiva; os pré-tratamentos biológicos que utilizam vários tipos de fungos e são considerados um método seguro e amigo do ambiente, sendo cada vez mais defendido como um processo que não exige alta energia para a remoção de lignina a partir da biomassa lignocelulósica; o pré-tratamento ácido, em que ácidos concentrados, como H_2SO_4 e HCl , têm sido utilizados para tratar os materiais lignocelulósicos, resultando na melhoria da hidrólise enzimática de biomassas, para libertar açúcares fermentáveis. Já a hidrólise alcalina pode ser por meio da deslignificação oxidativa, em que a biodegradação da lignina é catalisada pela enzima peroxidase com a presença de H_2O_2 ou pelo método de organossolvente, pelo qual, catalisadores ácidos (HCl ou H_2SO_4) são utilizados para quebrar a lignina interna e a hemicelulose (KUMAR *et al.*, 2009). De acordo com a revista Química Verde (2010), a hidrólise alcalina comparada à hidrólise ácida é a que causa menos

degradação dos açúcares, sendo este o método de deslignificação utilizado no presente trabalho.

O pré-tratamento alcalino é um processo que tem por objetivo principal a deslignificação, porém uma quantidade significativa de hemicelulose é solubilizada. O mecanismo de ação é a saponificação das ligações éster intermoleculares da hemicelulose e lignina (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Neste processo, são geradas águas residuais, como o licor negro, rico em pentoses, lignina solúvel e insolúvel. O licor negro é um dos mais importantes meios de energia renovável, que pode ser utilizado como um material para a produção de energia elétrica, hidrogênio, metanol e éter dimetílico pela tecnologia de gaseificação do licor negro (NONG *et al.*, 2013).

Dependendo do processo de deslignificação, aproximadamente, 15 a 30% da biomassa é recuperada como lignina não convertida. Portanto, a lignina representa tanto um passivo ambiental como um passível subproduto.

De acordo com Brosse, Ibraim e Rahim (2011), a disponibilidade de lignina em grandes quantidades poderá estimular o desenvolvimento de novas utilizações da lignina, como no campo de fibras, polímeros biodegradáveis, adesivos e tratamento de superfície (conversor de ferrugem).

3.2 Toxicidade do Chumbo

O chumbo não participa de nenhuma função metabólica essencial ao ser humano, sendo o metal mais manipulado pelo homem desde a antiguidade, o que leva a uma contaminação extensa do meio ambiente. A contaminação por Pb pode ocorrer por via respiratória, por inalação de partículas, absorção cutânea por contato com acetato de chumbo e, principalmente, por ingestão de alimentos e bebidas contaminados (HENRIQUE; GUIMARÃES; FONSECA, 2014), podendo provocar efeitos adversos agudos e crônicos em seres humanos, especialmente em crianças, influenciando o seu sistema nervoso e reduzindo sua inteligência (LANPHEAR *et al.*, 2005).

De acordo com Capitani (2009), os órgãos alvo (ou sistemas alvo) afetados pelo chumbo são os sistemas nervoso central (SNC), periférico (SNP), neuromuscular, hematopoiético, gastrointestinal, renal, endócrino, reprodutivo e cardiovascular.

O chumbo tem a capacidade de retirar cálcio dos ossos e ficar na forma de reservatório para liberação por longo tempo, bem depois da absorção inicial. Entre os primeiros sintomas de envenenamento por Pb estão a excitação, depressão e irritabilidade. Segundo Cole *et al.* (2015), o acúmulo excessivo de chumbo nos ossos deve ser

considerado como um diagnóstico diferencial para o aumento da susceptibilidade a fraturas patológicas e cura retardada de fraturas em cães.

É sabido que a exposição ao chumbo induz a neurodegeneração e está ligada às alterações neurocomportamentais generalizadas (KUMAR; TRIPATHI; JAHAN, 2015). De acordo com Bazrgar *et al.* (2015), durante o período de desenvolvimento do cerebelo em particular, a exposição ao Pb diminui o crescimento cerebelo e pode resultar em perda seletiva dos neurônios. A detecção e prevenção de toxicidade Pb é uma das principais prioridades internacionais de saúde pública. Ainda de acordo com o mesmo autor, em estudos com ratos foram observados retardos na locomoção e prejuízo no desempenho das atividades dos mesmos.

Como o tempo de degradação do Pb é muito longo comparado com outros poluentes, tende a se acumular nos solos e sedimentos e também por possuir baixa degradação microbiológica e ser solúvel, o metal se manterá acessível à cadeia alimentar e ao metabolismo humano por muito tempo, podendo ocasionar graves problemas de saúde. Smolders *et al.* (2015) testaram os efeitos da salinidade, acidificação, e tempo de contaminação, sobre a toxicidade do Pb em plantas, invertebrados e micro-organismos em três solos com adição de Pb. Os resultados indicaram que a lixiviação foi reduzida pela metade, e que essa lixiviação resultou na redução do crescimento de plantas, diminuiu a taxa de nitrificação e a toxicidade foi extremamente significativa para as minhocas. Houve aumento na salinidade nos solos recém contaminados e todos os testes mostraram efeitos tóxicos reduzidos em solos com mais de 5 anos de contaminação.

A poluição por metais em ecossistemas aquáticos constitui uma ameaça em todo o mundo e a gestão dos riscos ecológicos de sistemas contaminados por metais permanece um desafio importante (GINNEKEN *et al.*, 2015).

De acordo com Vallverdu-Coll *et al.* (2015), a intoxicação por Pb causa mortalidade significativa na população de aves aquáticas em todo o mundo. Os autores realizaram estudos sobre a transferência materna do Pb para sua prole. Para isso, eles coletaram ovos de pato selvagem e avaliaram propriedades da casca e também a resposta imune e o equilíbrio oxidativo dos patinhos. Os autores puderam concluir que a ingestão do Pb em aves pode resultar na transferência materna para a prole, podendo afetar seu sistema imunológico em desenvolvimento e reduzir a sua sobrevivência em fases iniciais de vida.

Segundo Segal *et al.* (2015), pesquisas recentes têm demonstrado que a exposição a produtos químicos podem causar toxicidade, com implicações na saúde pública para o nível socioeconômico (SES) mais baixo, que pode ser desproporcionalmente expostos a produtos químicos tóxicos. Os autores relatam que a exposição ao chumbo ocorre desproporcionalmente em grupos SES baixos que tendem a enfrentar altos níveis de

estresse psicossocial, sendo que há uma interação entre o Pb e o estresse psicossocial e que este estresse pode afetar o neurodesenvolvimento.

3.3 Técnicas de descontaminação por chumbo

A contaminação do ambiente por metais pode ocorrer como resultado de diversas atividades como, mineração, chapeamento de metal, curtumes e refino de petróleo, entre outras. Contaminações em ecossistemas agrícolas, por possuírem uma estreita relação com a saúde humana, geram riscos potenciais à saúde das populações rurais pelo efeito cumulativo dos metais pesados em culturas (MOUNI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014).

As legislações específicas contidas nas Resoluções nº 357/2005 e 430/2011 do CONAMA e a Portaria nº 2914/11 do Ministério da saúde (MS) atribuem limites para a presença de metais tóxicos nos recursos hídricos brasileiros e determinam valores máximos permitidos (VMP) das concentrações para os metais. Na Tabela 1, pode-se comparar os valores máximos permitidos entre as Resoluções nº 357/2005 e 430/2011 do CONAMA e Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde.

Tabela 1 Valores máximos permitidos (VMP) de Pb, conforme as Resoluções nº 357/2005 e 430/2011 do CONAMA e Portaria nº 2914/11 do MS

Metal	CONAMA nº 357 (2005)	MS nº 2914 (2011)	CONAMA nº 430 (2011)
	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
	Águas Doces	Padrão Potabilidade	Padrões de lançamentos de efluentes
Pb	0,033	0,01	0,5

Existem vários métodos para remoção dos íons metálicos em soluções aquosas: osmose reversa, troca iônica, precipitação, eletrodialise, entre outros. Entre esses métodos, a adsorção é de longe o mais versátil e amplamente utilizado para a remoção de diferentes poluentes.

Mancuso (2003) indica que tecnologias de reúso de água como lagoas de estabilização, filtros biológicos, lodos ativados, processos biológicos, processos de floculação, sedimentação e coagulação podem ser utilizadas na remoção dos metais pesados, porém, esses métodos apresentam muitas desvantagens, tais como a remoção incompleta do metal, custos elevados com equipamentos, reagentes e energia elétrica.

Outra forma de remoção do íon chumbo seria o tratamento térmico, mencionado no trabalho de Veit, Oliveira e Richter (2015), no qual os autores concluíram que é possível remover o chumbo a partir da matriz de vidro através de tratamento térmico.

Zhu e Li (2015) desenvolveram um hidrogel de manganês hidratado que foi utilizado para remover de maneira eficaz os íons Pb, Cu, Cd e Ni de água.

Jez e Lestan (2015) investigaram o potencial de remediação do solo lavado com EDTA para mitigar o risco de envenenamento por chumbo em crianças. Foram investigadas 79 amostras de solo antes e após a extração com 60 mmol kg⁻¹ EDTA. Os resultados confirmaram a viabilidade de lavagem do solo com EDTA como medida de remediação eficiente.

A descontaminação por chumbo também pode ser realizada através da fitorremediação. Kumar e Kumari, (2015), em um artigo de revisão sobre fitorremediação das plantas e suas estratégias de sequestro e tolerância, incluindo mecanismos de desintoxicação, relatam que, apesar da falta de função essencial nas plantas, o chumbo faz com que a fitotoxicidade altere a permeabilidade da membrana celular, por reagir com grupos ativos de enzimas diferentes envolvidas no metabolismo da planta por meio de reação com o grupos fosfato de adenosina difosfato (ADP) ou a adenosina-5'-trifosfato (ATP). Além disso, as plantas possuem um papel de hiperacumuladoras na absorção de chumbo, os autores ainda relatam que agentes quelantes como o etilenodiamino tetracético (EDTA) aumentam a disponibilidade de chumbo e outros metais pesados nos solos aumentando a eficiência da fitoextração na parte aérea da planta.

Bauidh *et al.* (2015) investigaram o potencial de fitorremediação da *Ricinus communis* que é um arbusto importado pela indústria para produção de óleo multiuso e concluíram que *R. communis* possui excelente capacidade de extrair a maioria dos metais tóxicos do solo (Cd, Pb, Ni, As, Cu), bem como alguns contaminantes orgânicos como pesticidas.

Chen *et al.* (2015) estudaram as características de bioacumulação e de tolerância de chumbo de *Ceratophyllum demersum* L. expostas a várias concentrações de chumbo (5-80 µM) durante 7, 14 ou 21 dias. A acumulação de chumbo aumentou com o aumento da concentração de metal na solução, a uma acumulação máxima de 4016,4 mg kg⁻¹. Também foi observada a libertação de chumbo acumulado a partir das plantas em solução em todos os grupos experimentais, exceto aqueles expostos a 5 µM. Os autores relatam que estes atributos são benéficos para utilização da *C. demersum* em aplicações de fitorremediação.

Há, também, estudos de descontaminação por meio de métodos de biorremediação utilizando micro-organismos, como: Al-Gheethi *et al.* (2015), que em um artigo de revisão menciona a remoção de metais pesados e antibióticos dos efluentes de esgotos tratados por bactérias resistentes à antibióticos e metais pesados e Bueno *et al.* (2009) que avaliaram a capacidade de biossorção de íons chumbo em solução aquosa pela bactéria *Rhodococcus opacus*. O valor da capacidade máxima de adsorção (q_{max}) obtida pelo modelo de Langmuir

foi de 94,34 mg g⁻¹, concluindo que a bactéria *R. opacus* apresenta elevada eficiência de remoção de Pb (II), mostrando-se um eficiente bioissorvente.

Uma vez que os métodos convencionais para a remoção do chumbo são muito caros ou criam grandes quantidades de lamas tóxicas, grande atenção tem sido dada às novas tecnologias (LOPICIC *et al.*, 2013). Materiais para uma remoção eficiente e economicamente viáveis de metais estão sendo pesquisados. De acordo com Rossberg *et al.* (2015), o desenvolvimento de adsorventes ecológicos para a remoção rápida e eficiente de metais pesados em meio aquoso continua a ser um desafio. Vários tipos de adsorventes podem ser utilizados, porém, têm-se buscado materiais de baixo custo, tais como: quitosana, argila, musgo de turfa, resíduos industriais e subprodutos agrícolas. Yao *et al.* (2014) destacam que estes materiais possuem uma elevada capacidade de adsorção e são eficientes na remoção de metais pesados em meio aquoso. O mecanismo responsável pela retenção dos metais é atribuído aos processos de troca iônica e/ou de complexação que ocorrem na superfície do material por meio da interação dos metais com os grupos carboxílicos, fenólicos, carbonílicos e amínicos presentes nas estruturas moleculares entre outros.

Tendo em vista que o Brasil produz os mais diversos subprodutos agroindustriais, em virtude da grande produção agrícola do país, a utilização desses subprodutos no tratamento dos resíduos produzidos por indústrias é uma prática muito viável, visto que se utilizará algo que seria normalmente descartado, virando resíduo. Nesse contexto, vários tipos de bioissorventes vêm sendo estudados na bioissorção do chumbo, entre eles estão três resíduos da produção de azeite de oliva, como adsorventes de baixo custo para remoção do Pb em soluções aquosas (MARTÍN-LARA *et al.*, 2011). Tazar, Kaya e Ozer (2014) utilizaram cascas de amendoim na bioissorção do Pb em solução aquosa. Largitte *et al.* (2016) produziram três amostras de carvão ativado a partir de materiais lignocelulósicos como: sementes de goiaba, cascas de amêndoas e *Dindé stones* para remoção do Pb em soluções aquosas, considerando os carvões adsorventes eficazes.

3.4 Utilização da lignina na descontaminação de ambientes por chumbo via técnica de adsorção

A estrutura da lignina, presente na parede celular dos vegetais vasculares, desempenha variadas funções: tem importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos; é responsável pela resistência mecânica dos vegetais, gerando rigidez; protege os tecidos contra ação de micro-organismo. A lignina é um dos materiais naturais mais abundantes, representando um polímero natural vastamente subutilizado (BROSSE;

IBRAIM; RAHIM, 2011). De acordo com Sahoo *et al.* (2011), a lignina é um coproduto das indústrias de papel e bioetanol lignocelulósico. Sua estrutura e funcionalidade diferem uns dos outros com base na fonte dos materiais e das técnicas de isolamento.

As ligninas podem ser extraídas de diversos tipos de matérias lignocelulósicas e podem ter diversas aplicabilidades. Sua estrutura química é bastante complexa, sendo a proporção de seus precursores bastante variáveis entre as diferentes espécies de plantas. A estrutura química hipotética da lignina pode ser observada na Figura 1.

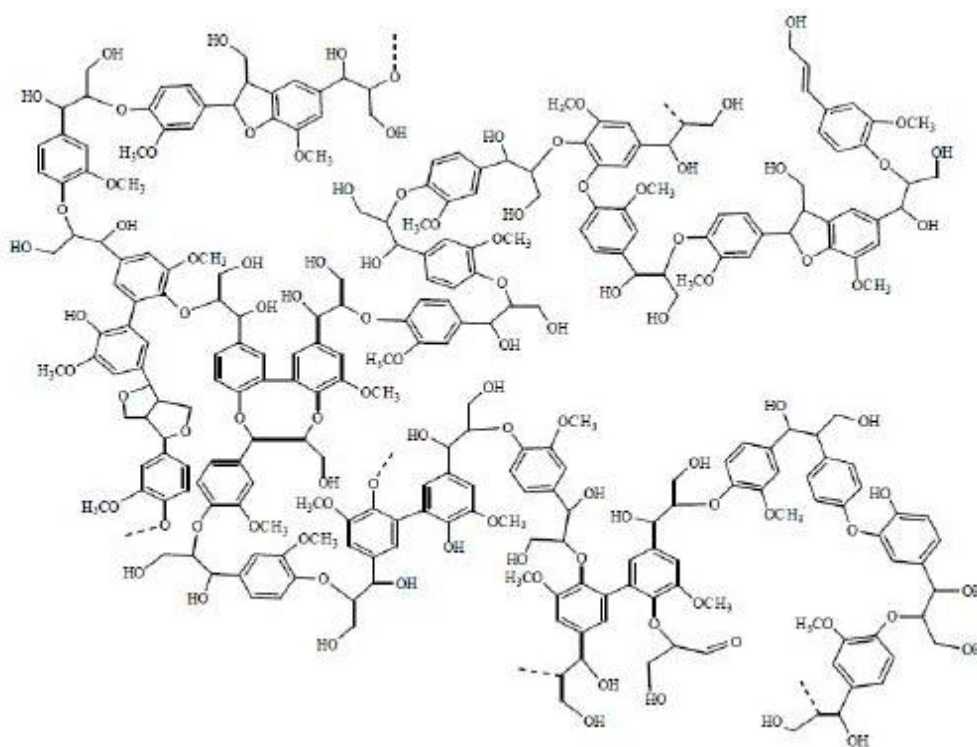


Figura 1 Estrutura química hipotética da lignina.

Fonte: Souto, Calado e Pereira Jr (2015).

Vários trabalhos vêm sendo realizados na busca de novas perspectivas no uso potencial da lignina para o tratamento de águas residuais contaminadas por metais pesados, sendo que os resultados destes trabalhos têm apresentado a lignina, modificada ou não, como uma alternativa bastante promissora. Lopicic *et al.* (2013) investigaram a influência do pH na adsorção dos íons Cu(II) por um adsorvente lignocelulósico (casca de pêssigo) e verificaram que este biosorvente contém principalmente celulose e lignina, e que estes são os componentes que transportam os grupos funcionais responsáveis pela ligação do metal.

Uma possível aplicação da lignina residual gerada na produção de bioetanol seria a queima para gerar energia para esse segmento industrial, ou seja, a lignina do licor negro pode ter uma utilização termoquímica (pirólise) (HU *et al.*, 2013). Entretanto, tendo em vista suas interessantes propriedades, a lignina oferece perspectivas de utilização para obtenção

de produtos de alto valor agregado, como ligantes, dispersantes, emulsificantes e solventes, reagentes químicos e combustíveis (AZADI *et al.*, 2013).

Wang *et al.* (2015) relatam formas de remover a lignina de licores de pré-hidrólise da madeira para obtenção dos oligossacarídeos e concluem que, pelo baixo custo de produtos químicos e a capacidade de regeneração da resina macroporosa utilizada, o processo pode ser bastante útil em bioprocessamento comercial do licor para a produção dos oligossacarídeos.

Horst *et al.* (2014) realizaram um trabalho para extração da lignina de bagaço de cana, capim-elefante, casca de arroz, palha de milho, lascas de madeira e palha de trigo, testando dois métodos de extração (Klason e Wilstatter), e concluíram o trabalho sugerindo que o método que apresentou menor pH promoveu uma extração de lignina mais eficiente.

Neste contexto, a lignina que é um subproduto industrial gerado hoje em dia, principalmente, pela indústria de papel e celulose (lignina Kraft), vem sendo amplamente utilizada em vários trabalhos, mostrando-se muito eficiente na remoção do Pb. Ibrahim *et al.* (2010), em trabalho que explora a capacidade da lignina extraída do licor negro do óleo de palma na remoção do Pb, afirmam que a lignina pode ser utilizada para remoção deste íon em soluções aquosas. Schafhauser *et al.* (2015) utilizaram uma lignina modificada a partir do resíduo do milho para avaliar a adsorção do íon Pb. Os resultados mostraram que o polímero adsorvente apresentou boa capacidade adsortiva para íons Pb (II), removendo após 100 minutos 98,87% da solução inicial.

Li, Ge e Wan (2015) realizaram seus estudos com uma lignina de superfície funcional porosa (SFPL), possuindo uma área de superfície 12 vezes maior do que a lignina comum, e concluíram que o processo de adsorção é endotérmico e que envolve a difusão de intrapartícula e adsorção química entre os íons de chumbo e os grupos funcionais de SFPL. Os autores também afirmaram que a relação custo-eficácia e respeito pelo ambiente a tornam um material promissor para a remoção de chumbo e outros metais pesados de águas residuais. O mesmo foi observado por Huang *et al.* (2015), que utilizaram uma lignina sulfonada, subproduto da indústria do papel na remoção dos íons chumbo e cobre e concluíram que a lignina é altamente eficiente na remoção destes íons (200 ppm inicial, com adsorção máxima de 123 mg g⁻¹ para Pb e 64 mg g⁻¹ para Cu), além de possuir um baixo custo e ter bom potencial para ser utilizada em águas contaminadas com estes metais.

De acordo com Zakzeski *et al.* (2010), a valorização da lignina constitui um fator importante na viabilização das biorrefinarias, visto que grande parte é obtida como subproduto da produção da polpa celulósica, sendo sua principal utilização a queima para geração de energia na própria indústria, havendo ainda assim um excedente de lignina. Nesse sentido, a utilização da lignina proveniente da precipitação do licor negro do processo de produção do bioetanol para adsorção do Pb(II) torna-se uma alternativa viável, tornando

o presente trabalho uma importante contribuição para a implementação industrial da produção de bioetanol dentro do conceito de biorrefinaria lignocelulósica. Até o momento, não há relatos sobre a utilização da lignina obtida do processo de produção de bioetanol como adsorvente de metais pesados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do licor negro

4.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana

No pré-tratamento do bagaço de cana a remoção da hemicelulose foi realizada conforme metodologia estabelecida por Pessoa Jr., Mancilha e Sato (1997), empregando-se H_2SO_4 1% (v/v), relação sólido-líquido de 1:10, temperatura de 121 °C por 20 minutos. O hidrolisado hemicelulósico obtido foi separado da massa sólida (celulignina) por filtração.

4.1.2 Tratamento alcalino da celulignina (deslignificação)

O tratamento alcalino da celulignina (deslignificação) foi realizado conforme metodologia estabelecida por Silva *et al.* (2012), empregando-se NaOH 1,5% (p/v), relação sólido-líquido de 1:20, temperatura de 100°C por 1 hora. O licor negro obtido foi separado da massa sólida (resíduo de celulose) por filtração.

4.2 Caracterização química do licor negro

4.2.1 Análises químicas e de metais

As amostras foram submetidas à digestão nitro-perclórica conforme método descrito Johnson e Ulrich (1959). Após a realização de todos os processos analíticos de abertura das amostras, estas foram acondicionadas em frascos com capacidade de 5 mL e, em seguida, submetidas à leitura em Espectrômetro de Absorção Atômica (AAS) (Shimadzu 6300), utilizando-se lâmpadas de cátodo oco com comprimentos de onda característicos para cada elemento metálico estudado.

4.2.2 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e ácidos graxos voláteis (AGV)

Para quantificação dos açúcares, ácido acético e ácidos graxos voláteis, amostras foram purificadas em cartucho Sep Pak C18 e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) 150 x 7,8 mm, fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno 65 °C. O eluente foi filtrado a vácuo, empregando-se membrana GVWP 0,45 µm (MILLIPORE) e o volume injetado foi de 20 µL de amostra.

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, bem como as de ácido acético, butírico, propiônico e láctico foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

4.2.3 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação da concentração dos compostos tóxicos como o furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram filtradas em membrana GVWP 0,45 µm (MILLIPORE) para total remoção de partículas sólidas. O eluente foi filtrado a vácuo empregando-se membrana GVWP 0,22 µm (MILLIPORE) e, em seguida, degaseificado em banho de ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A) empregando as seguintes condições: coluna Waters Resolve C18 5µm 90Å 3,9 x 300mm, temperatura ambiente, detector de ultravioleta a 276 nm, eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,9 mL min⁻¹ e volume da amostra injetada de 20 µL. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA).

4.2.4 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis totais foi determinada conforme o método de Folin Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Nesse processo foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu a 3 mL de amostra do licor negro em tubos de vidro. Após 5 minutos de reação, foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g.L⁻¹), seguido de agitação dos tubos em vórtex. As amostras foram

mantidas no escuro por 30 minutos e, posteriormente, foram determinadas as absorvâncias em espectrofotômetro UV-VIS FEMTO 700 *Plus*, a 760 nm. Para a obtenção das concentrações, utilizou-se uma curva padrão de vanilina (Synth – 98% de pureza).

4.2.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda química de oxigênio (DQO) foi determinada conforme metodologia padronizada (Método DQO – APHA 5220 D) (APHA, 2005).

4.3 Preparação do biossorvente

A biomassa utilizada como adsorvente foi a lignina proveniente da precipitação do licor negro resultante do processo de deslignificação da produção de bioetanol (Figura 2), gentilmente cedido pela Escola de Engenharia de Lorena - EEL-USP, Lorena, SP.



Figura 2 Lignina separada por precipitação do licor negro resultante do processo de deslignificação da produção de bioetanol.

Foram testados diferentes ácidos e valores de pH para se obter um maior rendimento no processo de precipitação da lignina do licor negro, tendo sido o melhor resultado obtido por meio da adição de ácido sulfúrico concentrado até pH 2. Após a adição do ácido, o licor foi colocado em tubos de centrifugação de 50 mL, centrifugados por 15 minutos a 3.400 rpm e o sobrenadante foi descartado. A lignina precipitada foi ressuspenida em água destilada e centrifugada novamente, processo que foi repetido por três vezes. Depois desta etapa, o sobrenadante foi descartado e a lignina resultante foi seca em estufa à temperatura de 60 °C, durante 6 horas. O licor negro foi caracterizado quimicamente antes e após a adição do ácido (item 4.2), além de análises de pH e DQO.

4.4 Caracterização da lignina por meio de espectroscopia na região do infravermelho

As análises de infravermelho da lignina foram realizadas na região entre 500 e 4000 cm^{-1} em um Espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier (Shimadzu Prestige-21), do Laboratório de Espectroscopia, da Universidade Estadual de Londrina. As amostras de lignina foram previamente secas, misturadas com preparadas KBr (1mg de amostra para 100mg KBr) e compactadas sob alta pressão para obtenção de pastilhas para análise no equipamento.

4.5 Soluções de íons chumbo

As soluções padrão do Pb utilizadas neste trabalho foram preparadas a partir de uma solução estoque de 10.000 mg L^{-1} (SpecSol[®]), utilizando-se água destilada. As soluções de HCl e NaOH utilizadas para ajuste de pH foram preparadas a partir de reagentes P.A.

4.6 Planejamento Experimental

Os ensaios de adsorção dos íons Pb(II) foram realizados, conforme o delineamento composto central (DCC) descrito na Tabela 2, com os valores codificados e reais para as variáveis pH, massa do adsorvente (lignina) e concentração do metal. Na Tabela 3 está demonstrada a matriz de planejamento.

Tabela 2 Valores codificados e reais para as variáveis do planejamento experimental

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	1
pH	X1	3	4	5
Massa do adsorvente (mg)	X2	50	100	150
Concentração do metal (mg L^{-1})	X3	40	60	80

Tabela 3 Planejamento experimental (DCC) para 3 variáveis, com triplicata no ponto central, valores codificados e valores reais

Ensaio	X1	X2	X3	pH (X1)	Conc. ads. (X2)	Conc. Metal(X3)
1	-1	-1	-1	3	50	40
2	+1	-1	-1	5	50	40
3	-1	+1	-1	3	150	40
4	+1	+1	-1	5	150	40
5	-1	-1	+1	3	50	80
6	+1	-1	+1	5	50	80
7	-1	+1	+1	3	150	80
8	+1	+1	+1	5	150	80
9	0	0	0	4	100	60
10	0	0	0	4	100	60
11	0	0	0	4	100	60

O planejamento foi composto por 11 experimentos que incluíram triplicatas no ponto central. Este tipo de planejamento permite a obtenção de modelos matemáticos com parâmetros lineares das variáveis estudadas. Foram calculados os efeitos principais e as interações das variáveis, os seus respectivos coeficientes para o modelo matemático, bem como a análise de variância (ANOVA) para determinar a validade do modelo. Os efeitos das variáveis foram descritos com a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior.

A análise dos dados foi avaliada utilizando-se o *software* STATISTIC 5.0. A qualidade do ajuste da equação polinomial foi avaliada pela determinação do coeficiente de R^2 . Os valores ótimos obtidos das variáveis selecionadas foram analisados pela metodologia da superfície de resposta. Neste contexto, o teste F foi empregado como critério de validação da significância estatística dos modelos obtidos ao nível de confiança de 95%. Como resposta foi avaliada a capacidade de adsorção do íon chumbo pela lignina precipitada do licor negro proveniente do processo de deslignificação da produção de bioetanol.

4.7 Experimentos de adsorção de íons Pb(II)

Os experimentos de adsorção de íons Pb(II) foram realizados em incubadora tipo shaker (Marconi, MA-420) com temperatura controlada de 25°C e agitação constante de 200 rpm, durante 6 horas. Para os ensaios foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo uma quantidade de adsorvente e de metal (Pb) que variou de 50 a 150 mg para a massa do adsorvente e de 40 a 80 mg L⁻¹ para a concentração do metal, com um volume

final de 50 mL. O pH variou de 3 a 5, sendo ajustado com soluções de NaOH e HCl, ambos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, medido com um pHmetro modelo *Precision Scientific Instrument*. A análise das concentrações de Pb (II) foram realizadas em Espectrômetro de absorção atômica, conforme descrito no item 4.2.

A quantidade de íons metálicos adsorvidos no equilíbrio por unidade de massa de adsorvente foi calculada a partir da diferença entre as concentrações inicial e final do metal no volume da solução, de acordo com a Equação 1:

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

Em que:

- q_e = quantidade de íons adsorvidos no equilíbrio (mg g^{-1});
- C_0 = concentração inicial de íons Pb(II) em solução (mg.L^{-1});
- C_e = Concentração de íons em solução após atingir o equilíbrio (mg.L^{-1});
- V = volume da solução aquosa (L); M : Massa do adsorvente (g).

4.8 Cinética de adsorção dos íons Pb(II)

A cinética de adsorção dos íons Pb (II) foi realizada em frascos Erlenmeyer fechados, contendo 50 mL da solução do metal na concentração fixa de 80 mg L^{-1} de Pb (II), 50 mg de lignina e pH ajustado para 5, com velocidade de agitação constante. Alíquotas de $500 \mu\text{L}$ do sobrenadante das amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 45, 60, 120, 240, 300, 360 e 600 minutos), diluídas em balão volumétrico e as concentrações dos íons foram determinadas por AAS. O mecanismo cinético que controla o processo de adsorção foi avaliado empregando-se os modelos de pseudo primeira-ordem (Equação 2) e pseudo segunda-ordem (Equação 3), nos quais K_1 e K_2 são constantes da velocidade da adsorção de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem, respectivamente, q_t é a quantidade adsorvida de íons Pb (II) no tempo t e q_e é quantidade adsorvida no equilíbrio. A validade dos modelos foi interpretada pela linearidade dos gráficos $\log(q_e - q_t)$ vs t e (t/q_t) vs t , respectivamente.

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{K_1}{2.303} t \quad (2)$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (3)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do licor negro

Os resultados referentes à caracterização química do licor negro, antes e após a precipitação com ácido sulfúrico para remoção da lignina estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 Caracterização química do licor negro gerado no processo de deslignificação durante o processo de produção de bioetanol antes e após a precipitação da lignina

Licor Negro			
Antes precipitação (mg L ⁻¹)		Após precipitação (mg L ⁻¹)	
Pb	ND*	Pb	ND*
Ca	15652,92	Ca	3327,24
Fe	11,65	Fe	6,94
Cd	ND	Cd	ND
K	20,54	K	0,13
Cr	ND	Cr	ND
Mg	2426,42	Mg	525,15
Cu	ND	Cu	ND
Mn	0,69	Mn	ND
Na	3201,98	Na	8,787
Ni	2,95	Ni	0,414
Zn	25,5	Zn	3,974
N	50,4	N	30,1
pH	13,15	pH	2
DQO	13784,96 (mgO ₂ L ⁻¹)	DQO	3254,96 (mgO ₂ L ⁻¹)

Nota: *ND: Não detectado.

Os dados apresentados revelam que o licor negro proveniente do processo de deslignificação não possui metais pesados tóxicos como Pb, Cd e Cr, uma característica importante no caso de descarte no meio ambiente. A presença de Cu também não foi detectada antes nem após a precipitação da lignina; já o Mn foi detectado em baixa quantidade (0,69 mg L⁻¹) anteriormente à precipitação e após a mesma foi totalmente removido. Foram observados teores mais elevados de Ca e Mg (15652,92 e 2426,42 mg L⁻¹, respectivamente), elementos importantes nas diversas funções biológicas, antes da precipitação. Após a precipitação outros elementos também foram detectados, porém, em menores quantidades como Zn, Ni, N e K no licor antes da precipitação, sendo que todos eles também apresentaram redução nos valores encontrados após a precipitação da lignina.

Foi também detectada a presença de Fe, um metal requerido pelo corpo humano para a construção de várias proteínas do sangue (STIPANUK; CAUDILL 2012). No solo, o Fe precisa ser reduzido para ser absorvido, assim a capacidade das raízes reduzirem Fe^{3+} a Fe^{2+} parece ser fundamental para a sua absorção pela planta. O teor foliar adequado nas plantas cultivadas variam de 50 a 1000 mg/kg. O Fe é constituinte de enzimas envolvidas com a transferência de elétrons, tais como citocromos e também é essencial para a síntese do complexo proteína-clorofila nos cloroplastos (RAIJ, 2011). Assim como ocorreu com os outros metais, o Fe também teve seu valor reduzido após precipitação com ácido sulfúrico.

Altos teores de Na foram detectados no licor negro antes da precipitação; após a precipitação esse valor foi reduzido de forma significativa, caindo de 3201,98 mg L^{-1} para 8,79 mg L^{-1} . Se ingerido em altas quantidades o Na pode trazer prejuízos à saúde humana, causando, por exemplo, a hipertensão (UZU *et al.*, 2012). Nas propriedades químicas do solo, o aumento das concentrações de sais e sódio trocável ocasiona a redução de sua fertilidade e, nas propriedades físicas, provoca desestruturação, aumento da densidade do solo e redução da infiltração de água pelo excesso de íons sódicos. Na germinação, reduz o gradiente de potencial entre o solo e a superfície da semente, restringindo a captação de água pela semente e, assim, reduzindo as taxas de germinação. Os efeitos do excesso de sais solúveis na solução do solo provocam redução do desenvolvimento vegetal, atribuído ao efeito osmótico, provocado pela redução do potencial osmótico, o desbalanço nutricional em função da elevada concentração iônica e a inibição da absorção de outros cátions pelo sódio (SCHOSSLER *et al.*, 2012).

De acordo com Gupta e Gupta (2014), o ciclo de vida dos nutrientes minerais começa no solo, sendo este a principal fonte fornecedora de minerais para plantas, através das quais chegam aos animais e seres humanos; os nutrientes minerais essenciais para a nutrição humana são fundamentais para incontáveis processos e servem como cofatores essenciais para inúmeras enzimas.

Além dos macro e micronutrientes, foi determinada a DQO do licor, informação importante no momento de descartar um resíduo. Os resultados revelam valores de DQO bastante elevados, sugerindo que esse resíduo não deve ser descartado diretamente no solo ou na água sem prévio tratamento. No caso do licor negro precipitado com ácido sulfúrico para remoção da lignina, os resultados sugerem que a precipitação acaba removendo grandes quantidades de DQO (em torno de 76% do valor inicial), porém a mesma ainda permanece elevada depois da precipitação.

A DQO é um método indireto de determinação da matéria orgânica nos despejos, sendo considerado o mais adequado para monitoramento contínuo da qualidade de um efluente ou até mesmo de uma unidade de tratamento de efluentes (DEZOTTI, 2008).

De acordo com o Instituto Ambiental do Paraná (IAP), no caso do lançamento de efluentes líquidos de empreendimentos de avicultura em corpos hídricos, os padrões de lançamento referentes à DQO deve ser de até 150 mg L^{-1} . A proposta de Resolução do SEMA/IAP (2008) determina padrões de DQO inerentes à atividade ou empreendimento para o lançamento de efluentes líquidos, direta ou indiretamente, em corpos hídricos e estabelece para as indústrias sucroalcooleiras o valor permitido da DQO é de até 300 mg L^{-1} , sendo o mesmo valor permitido para as indústrias de papel e celulose e para as atividades de suinocultura e frigoríficos o valor permitido da DQO é de até 200 mg L^{-1} .

Foram determinados os valores de açúcares (xilose, arabinose e glicose) presentes no licor negro, dentre os quais somente foram encontrados valores referentes à glicose ($0,21 \text{ g L}^{-1}$) no licor antes da precipitação e após o processo nenhum açúcar foi detectado. A baixa concentração de açúcar encontrada no licor negro antes da precipitação já era esperada tendo em vista que no processo de deslignificação o objetivo é remover a lignina, deixando disponível a celulose que será posteriormente hidrolisada em açúcares de interesse para fermentação. Também foram determinadas as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, cujos valores foram: $1,81 \text{ g L}^{-1}$ e $0,27 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, no licor antes da precipitação e após o processo estes compostos não foram mais detectados. Quanto à concentração de fenóis totais, os valores para o licor negro sem precipitação foram de $193,78 \text{ g/L}$ e para o licor negro precipitado foi de $49,3 \text{ g L}^{-1}$, demonstrando que a precipitação tem uma eficiência de remoção de fenóis de 74,5%.

Em estudos realizados por Corato *et al.* (2011), a compostagem comercial foi substituída por uma biomassa obtida de uma planta de *Miscanthus sinensis var. giganteus*, submetida a pré-tratamento explosão a vapor (SEB). Os resultados obtidos foram positivos sobre o efeito de supressão contra patógenos em plantas. Foi avaliada a supressividade contra cinco patógenos de solo, comumente encontrados em muitos sistemas de cultivo praticados em casas de vegetação e que atacam culturas hortícolas, com um grande impacto econômico no mercado italiano, país de residência dos autores. Os resultados mostraram que foram detectados o furfural, 5-hidroximetilfurfural, lignossulfonatos, ácido acético e fórmico. O *Phytophthora nicotianae*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* foram fungos altamente inibidos pela adição de $3,2 \text{ g L}^{-1}$ de furfural e $0,48 \text{ g L}^{-1}$ de 5-hidroximetilfurfural. Os autores concluíram que a SEB poderia ser usada contra algumas doenças fúngicas com origem no solo, no lugar de compostos comerciais, e sua ação supressiva poderia estar relacionada com a concentração dos inibidores microbianos produzidos durante o processamento da biomassa fresca em explosão a vapor.

No presente trabalho, também foram determinados os valores de AGV, os quais antes da precipitação para ácido acético e ácido láctico foram de $1,06 \text{ g L}^{-1}$ e $0,39 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Os ácidos butírico e propiônico não foram detectados. Após a precipitação

não foram detectados valores de AGV nas amostras. Esta análise de AGV foi realizada com o intuito de enriquecer a caracterização do licor negro resultante do processo de deslignificação da produção de bioetanol, visto que até o presente momento não há nenhum registro sobre este tipo de licor. Sendo assim, o conhecimento desse resíduo permitirá definir formas adequadas para sua disposição no meio ambiente, assim como também contribuirá para o seu aproveitamento em diferentes aplicações, tornando-o um subproduto da produção de bioetanol.

5.2 Análise de infravermelho da lignina

De acordo com Rodrigues *et al.* (2006), a bioissorção ocorre devido à presença de diversos grupos que constituem a biomassa, tais como celulose, poliose, proteína e lignina.

A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil. As ligações éteres dominam a união entre as unidades da lignina, que apresenta um grande número de interligações (SILVA, 2010).

É importante ressaltar que as propriedades e a composição da lignina dependem do método de extração e do material lignocelulósico do qual ela foi extraída (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

Os resultados da análise de infravermelho (IV) para a lignina obtida do licor negro resultante do processo de produção de bioetanol estão apresentados na Figura 3.



Figura 3 Espectro de absorção na região de infravermelho da lignina precipitada do licor negro resultante da produção de bioetanol.

A lignina extraída do licor negro do processo de produção de bioetanol apresentou bandas típicas de espectro de lignina, exibindo grupos funcionais esperados, sugerindo a presença dos principais grupos, dentre eles: grupo das hidroxilas com estiramento O-H, encontrado na faixa de absorção compreendida entre 3600-3300 cm^{-1} ; o grupo das carbonilas (estiramento C=O), que apresenta pico na região de 1715 cm^{-1} ; os grupos metil e metileno presentes na faixa de 1465-1370 cm^{-1} . Os picos apresentados em 1590-1500 cm^{-1} correspondem aos estiramentos C=C de hidrocarbonetos aromáticos, evidenciando a presença de anel aromático. Foram também detectados compostos sulfurados, ou seja, que contêm enxofre com estiramento do S-O apresentando banda de absorção próxima à região 655-630 cm^{-1} ; o grupo dos éteres e álcoois, que apresenta estiramento C-O em 1300-1000 cm^{-1} . De acordo com Pavia *et al.* (2010), a ausência de pico entre 1700-1750 cm^{-1} , devido ao estiramento C=O e da banda entre 2500-3300 cm^{-1} , devido ao estiramento O-H, é necessária para garantir que o estiramento C-O não seja devido a um éster ou a um álcool, sendo assim, o estiramento C-O encontrado no presente trabalho pode ser atribuído à presença de álcoois e fenóis.

Com a escassez de trabalhos contendo informações de espectros de absorção no infravermelho de ligninas oriundas do processo de produção de bioetanol, alguns dos valores de absorção encontrados aqui foram comparados com valores de absorção da lignina oriunda do processo Kraft (Tabela 5), a qual é a mais próxima da lignina utilizada no presente trabalho.

Tabela 5 Bandas de vibrações de infravermelho observadas na lignina do licor negro do processo Kraft

Nº de onda (cm^{-1})	Grupos de base e vibracionais
3440-3430	O-H estiramento (H-ligado)
2940-2930	C-H grupo metil
2689-2880	C-H vibração do metil ou do grupo metoxil
1727-1690	C=O estiramento
1610-1690	C=C do anel aromático
1505	C=C do anel aromático
1428	C-H estiramento do metil ou do grupo metoxil
1425-1420	C-H vibração do grupo metil
1260	Respiração de anéis guaiacila e estiramento C=O
1160-1140	C-O estiramento de álcool secundário
1044	C-O estiramento de álcool primário
844	C-H aromático fora do plano
655-630	C-S vibração do grupo sulfônico

Fonte: Nada, El-Sakhawy e Kamel (1998).

O que pode ser observado ao comparar as faixas de absorção dos grupos presentes na lignina do processo Kraft à lignina proveniente do licor negro do processo de obtenção do

bioetanol é que possuem muitas regiões de absorção de grupos funcionais em comum, como os anéis aromáticos, grupos metil, ésteres e álcoois e também os grupamentos sulfônicos que se fazem presentes pelo tratamento para precipitação desta lignina do licor por meio do ácido sulfúrico.

Na metodologia de interpretação de espectros IV de ligninas, são empregados compostos-modelo que podem ser usados como padrões ou então para relacionar alguns picos de absorção. Dessa forma, vários são os trabalhos que apresentam as bandas de absorção para amostras de ligninas obtidas a partir de diversos compostos lignocelulósicos, como, por exemplo, o trabalho de Pastore *et al.* (2008), que investigaram, pela análise de infravermelho, a lignina presente em quatro tipos diferentes de madeira, relatando que as bandas em torno de 1600, 1464, 1425, 1330 e 1244 cm^{-1} são bandas de absorção associadas à lignina.

Para Marabezi (2009), dentre as absorções mais frequentes em ligninas, os estiramentos O-H, C-H e C=O aparecem na região acima de 1600 cm^{-1} e as bandas vibracionais do anel aromático por volta de 1510 cm^{-1} , o que também foi observado no trabalho de Alves (2011), nos resultados com a cana-de-açúcar.

Toledo *et al.* (2013) relatam que, na interpretação de infravermelho do adsorvente hidrocalcita, as bandas presentes na faixa de 3500 cm^{-1} representam as hidroxilas, o que também foi observado em vários outros trabalhos que relatam as absorções em ligninas oriundas da cana-de-açúcar (SILVA *et al.*, 2013).

5.3 Estudos de adsorção de chumbo

Os resultados referentes às quantidades máximas adsorvidas do Pb pela lignina estão descritos na Tabela 6, onde são apresentados os valores codificados, reais e os valores máximos de adsorção alcançados em cada ensaio.

Tabela 6 Matriz de delineamento (DCC) com valores codificados e reais das variáveis de estudo (pH, concentração do adsorvente e concentração do metal), acompanhado dos valores reais dos ensaios

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais			Valor ensaio (mg g ⁻¹)
	X1	X2	X3	pH	Massa ads. (mg)	Conc. Metal (mg L ⁻¹)	Capacidade Adsorção lignina (q _e)
1	-1	-1	-1	3	50	40	19,4
2	1	-1	-1	5	50	40	25,8
3	-1	1	-1	3	150	40	8,4
4	1	1	-1	5	150	40	8,4
5	-1	-1	1	3	50	80	25,1
6	1	-1	1	5	50	80	41,8
7	-1	1	1	3	150	80	14,9
8	1	1	1	5	150	80	20,2
9	0	0	0	4	100	60	21,6
10	0	0	0	4	100	60	22,5
11	0	0	0	4	100	60	23,3

Pode-se verificar que a variação da quantidade de íons Pb(II) adsorvida pela lignina foi de 8,4 a 41,8 mg.g⁻¹. A melhor condição de adsorção para o íon Pb(II) ocorreu em pH 5, massa do adsorvente 50 mg e concentração de metal de 80 mg.L⁻¹. Os resultados evidenciam que a maior adsorção de metal ocorreu com uma menor quantidade de biomassa. Para Martín-Lara *et al.* (2011), as menores dosagens de biossorvente são ideais para a biossorção do chumbo. Fato, este, também muito importante, pois, no caso do presente trabalho cada litro de licor negro precipitado com ácido sulfúrico gera em torno de 1 grama de lignina.

Os resultados obtidos demonstram uma variação nos valores de adsorção que podem ser explicados em função da capacidade adsorptiva da biomassa utilizada (estrutura química, grupos funcionais) e pela disponibilidade de sítios ativos, uma vez que o tempo de contato e temperatura que podem também influenciar nos resultados, foram mantidos os mesmos para todos os ensaios.

Guo, Zhang e Shan (2008) investigaram a adsorção de íons Pb, Cu, Cd, Zn, e Ni por uma lignina isolada a partir do licor negro residual da indústria de papel e constataram que as superfícies da lignina contêm dois tipos principais de sítios ácidos atribuídas aos grupos carboxílicos e os grupos fenólicos superficiais, sendo que os fenólicos têm uma maior afinidade por íons metálicos que os sítios carboxílicos.

Li *et al.* (2015) construíram uma esfera a base de lignina com uma grande quantidade de mesoporos que resultou em uma excelente eficiência de adsorção (95,6 ± 3,5%) para os íons Pb e sugerem a possibilidade desta esfera porosa ser aplicada para o tratamento contínuo de metais pesados de águas residuais em indústrias.

Schafhauser *et al.* (2015) relatam ter utilizado uma lignina modificada a partir do resíduo do milho atingindo uma capacidade adsorptiva de chumbo de 98,87%. De acordo com Zakzeski *et al.* (2010), a estrutura das ligninas são altamente funcionais contendo grupamentos álcool, aldeído, éter ou substituintes ácidos e, estes compostos monoméricos são susceptíveis a uma ampla gama de transformações, principalmente, quer redutiva na natureza, formando hidrocarbonetos simples, ou oxidativa na natureza, com o aumento da formação de compostos aromáticos ou especificamente para a funcionalidade desejada.

Subsequentemente, visando realizar um estudo integral da influência das variáveis independentes sobre a adsorção do Pb (II), valores experimentais e preditos foram comparados com equações empíricas ajustadas com auxílio da análise de variância (ANOVA) (Tabela 7). Para isso a equação obtida para prever as variáveis respostas (Equação 4) é apresentada em função dos termos codificados das variáveis independentes, indicando os valores estatisticamente significativos, em nível de 95% de confiança.

$$Y=21,22991 + 3,808507_{x_1} - 7,25575_{x_2} + 4,75358_{x_3} - 1,94775_{x_1x_3} + 1,68692_{x_2} \quad (4)$$

O modelo empírico para descrever a adsorção do chumbo pela lignina apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,98, indicando que 98% da variabilidade da resposta poderia ser explicada pelo modelo, o que confirmou a qualidade do ajuste.

Tabela 7 Análise de variância (ANOVA) referente às variáveis dependentes, ao nível de confiança de 95%

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
	Adsorção do Chumbo (mg.L ⁻¹)				
Modelo	774,7015	6	129,12	36,27	0,021
Resíduo	14,2452	4	3,56		
Falta de ajuste	16,3426	2	8,18	10,9	0,124
Erro puro	1,5107	2	0,75		
Total	788,9468	10			

Para examinar a distribuição dos valores residuais, definida como as diferenças entre o previsto (modelo) e o observado (experimental), foi construído um gráfico de normalidade dos resíduos para a eficiência da remoção do Pb (II).

A validade da correlação encontrada pela análise estatística pode ser verificada na Figura 4, que aponta linearidade e ausência de tendência nos dados, revelando, portanto, um modelo que não possui falta de ajuste significativo.

Essa ausência de tendência pode ser evidenciada na Figura 4 por meio da observação do alinhamento dos pontos experimentais, sugerindo uma distribuição normal.

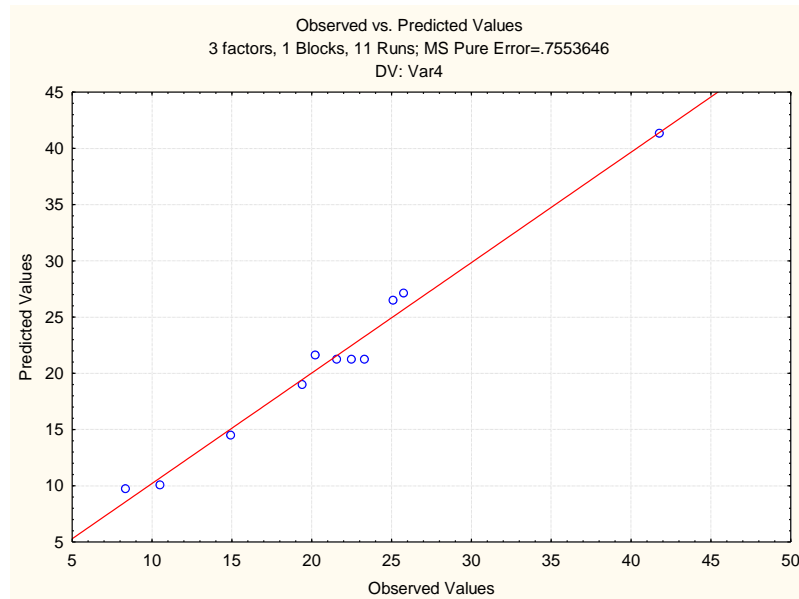


Figura 4 Valores observados contra preditos da adsorção do Pb (II) pela lignina proveniente da precipitação do licor negro resultante da produção de bioetanol.

Com o intuito de analisar a significância dos efeitos das variáveis independentes e suas interações foi construído o gráfico de Pareto, cujos resultados dos efeitos das variáveis independentes e suas interações podem ser observados na Figura 5.

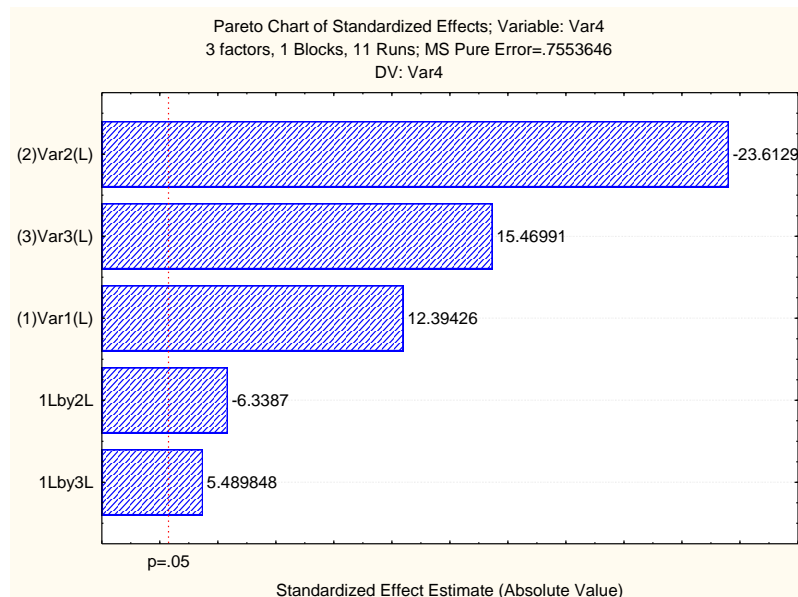


Figura 5 Efeito das variáveis independentes e suas interações: variável 1 (pH), variável 2 (massa do adsorvente), variável 3 (concentração de chumbo), ao nível de 95% de confiança.

Ao analisar a interação entre as variáveis, em função da análise simultânea dos efeitos destas interações, observaram-se efeitos significantes e positivos sobre adsorção dos íons Pb(II), quando combinadas as variáveis pH e concentração do metal (5,489), ou seja, houve um aumento da adsorção deste íon. Por outro lado, ao analisar a influência de cada variável independente isoladamente sobre a adsorção dos íons Pb(II), observou-se que o valor da quantidade de massa do adsorvente foi estatisticamente significativa e mostrou um efeito marcante de forma negativa (-23,6129), quando comparado com as outras variáveis, pH e concentração do metal. Ou seja, quanto maior a quantidade de massa do adsorvente menor é a adsorção deste íon. As outras duas variáveis independentes (pH e concentração do metal) demonstraram efeitos positivos (12,394 e 15,469, respectivamente). Quanto à interação entre as variáveis pH e massa do adsorvente, esta resultou em menor adsorção de íons Pb(II), demonstrando um efeito negativo (-6,3387). Já o efeito da interação entre as variáveis massa do adsorvente e concentração do metal não apresentou diferença estatística significativa e por esta razão não está descrita no gráfico de Pareto.

O pH da solução é um dos parâmetros importantes na remoção de metais pesados a partir de soluções aquosas. O pH da solução tem uma capacidade de afetar as cargas da superfície do biossorvente, o grau de ionização do biossorvente durante biossorção e as formas dos íons metálicos em soluções aquosas.

Tasar, Kaya e Ozer (2014) relataram que o pH ótimo para a remoção do íon Pb (II), utilizando a casca de amendoim como biossorvente, foi de 5,5, não havendo nenhuma precipitação de íons Pb (II). Ozer (2007) relatou que o pH ótimo para adsorção do Pb (II) utilizando farelo de trigo tratado com ácido sulfúrico como biossorvente foi 6.

Albadarin *et al.* (2011), ao utilizarem uma lignina comercial para remoção de íons Cr, verificaram que a capacidade de biossorção da lignina em solução foi dependente do pH, cuja capacidade máxima de biossorção para o Cr foi obtida no pH 2.

Na sequência, as informações contidas nos gráficos de superfície de respostas que foram construídos para as combinações entre as variáveis mais significativas com a adsorção do Pb (II) estão apresentadas na Figura 6.

Ao analisar os gráficos de superfície (Figura 6), pode-se perceber que a utilização de menor massa do adsorvente (50 mg) com um pH mais alto (pH 5) (Figura 6A) e uma maior concentração de Pb (II) (80 mg.L⁻¹) (Figura 6B) resultou em uma maior adsorção.

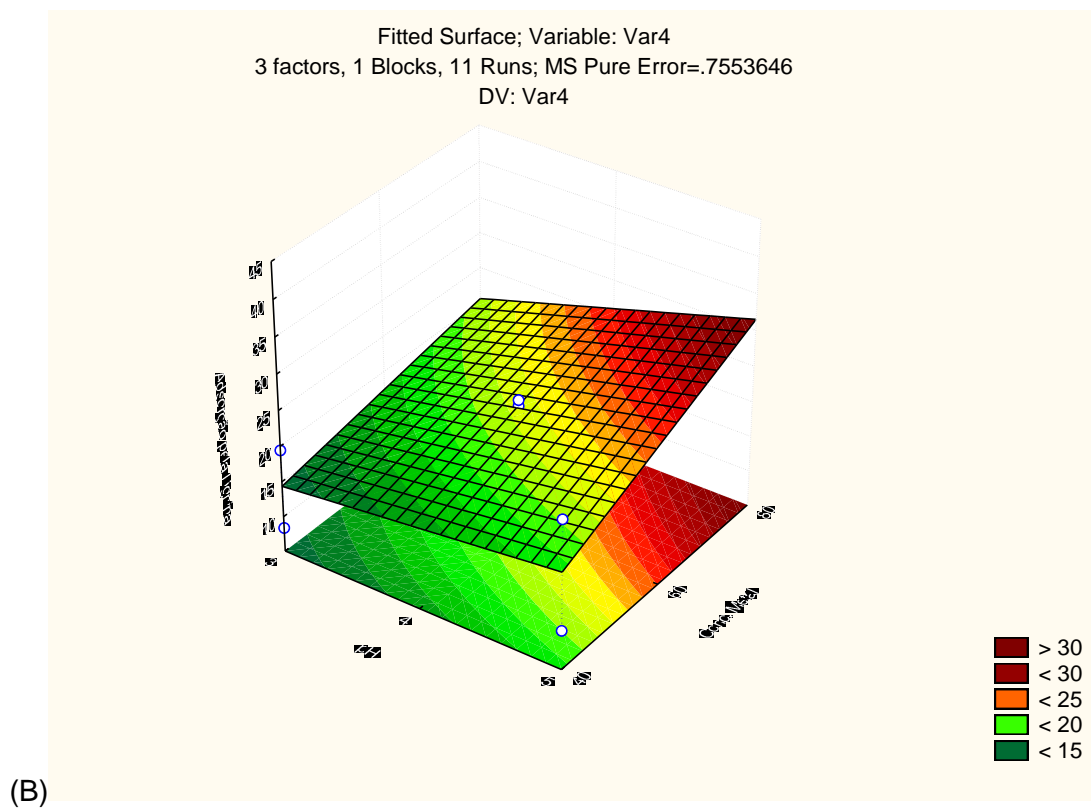
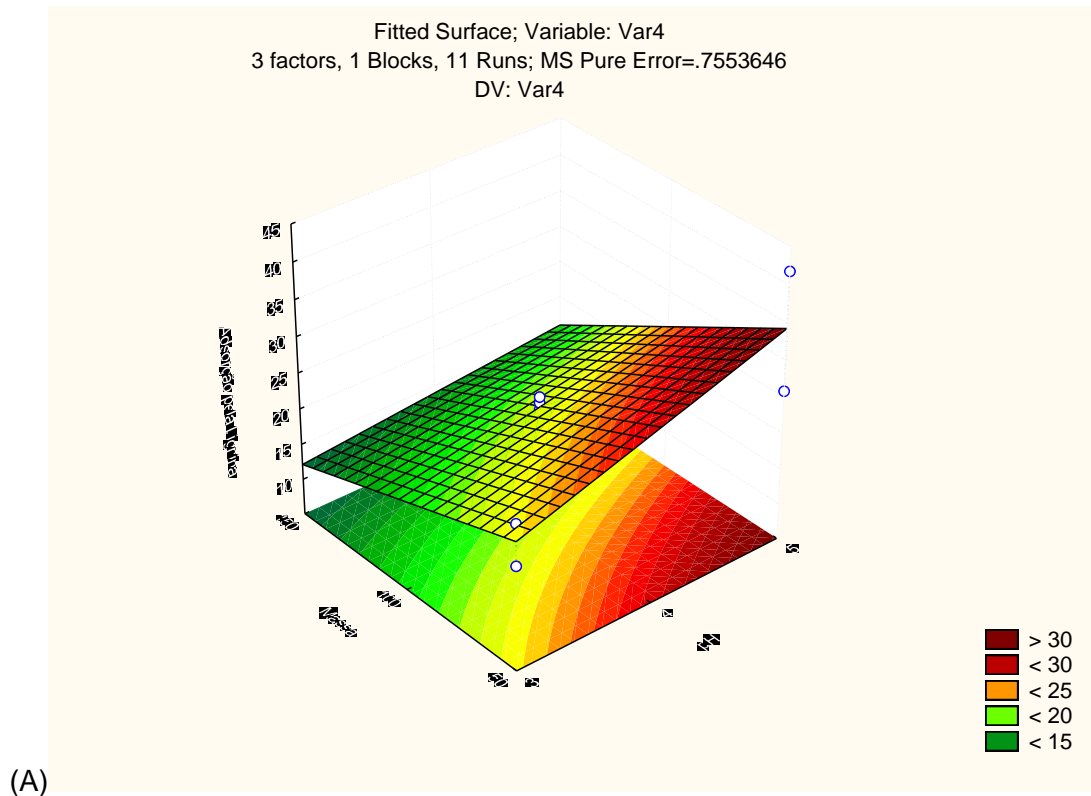


Figura 6 Gráfico de superfície de resposta da adsorção de Pb (II): (A) em função da interação entre pH e massa do adsorvente; (B) pH em função da concentração de Pb (II).

5.4 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção dos metais foi realizada com solução de metais na concentração fixa de 80 mg L^{-1} de Pb (II), 50 mg de lignina e pH ajustado para 5 com velocidade de agitação constante. A partir dos resultados obtidos pelas análises de AAS, foi possível avaliar o mecanismo cinético que controla o processo de adsorção empregando-se os modelos de pseudo primeira-ordem (equação 2) e pseudo segunda-ordem (equação 3), no qual K_1 e K_2 são constantes da velocidade da adsorção de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem, respectivamente, q_t é a quantidade adsorvida de íons Pb (II) no tempo t e q_e é quantidade adsorvida no equilíbrio. A validade dos modelos foi interpretada pela linearidade dos gráficos $\log(q_e - q_t)$ (Figura 8) vs t e (t/q_t) vs t (Figura 9), respectivamente.

A cinética de adsorção testa os dados experimentais com o objetivo de avaliar o mecanismo que controla o processo de adsorção, assim como a transferência de massa e as reações químicas, para isso foi construída uma curva cinética (Figura 7) para a quantidade de íons chumbo adsorvida pela lignina em função do tempo.

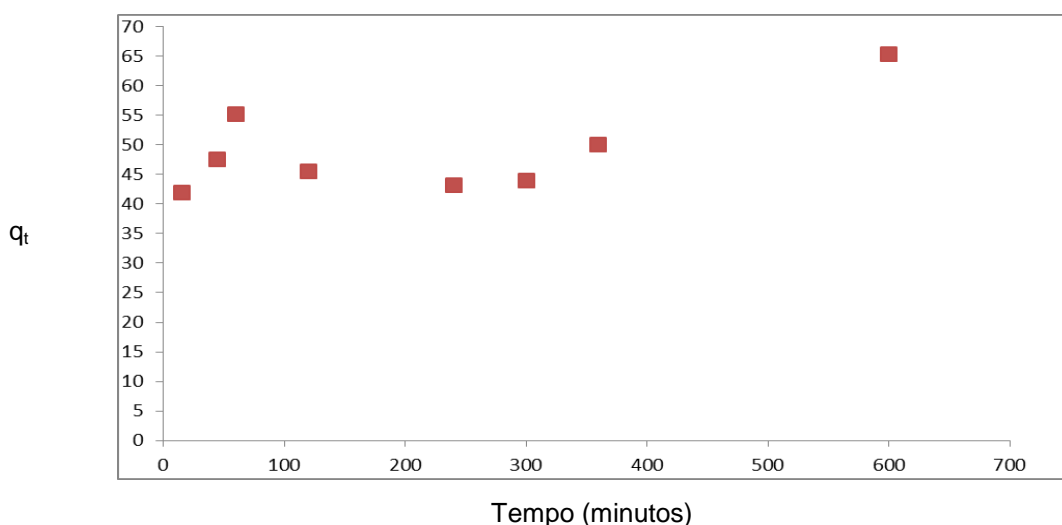


Figura 7 Cinética de adsorção do Pb (II) para o resíduo da lignina em condições experimentais (modelo cinético pseudo segunda-ordem).

Ao observar a Figura 7 pode-se perceber que houve uma adsorção alta nas primeiras 5 horas; a partir daí o aumento não é mais tão significativo. Ao analisar em termos de redução da concentração de íons chumbo presentes na solução, pode-se afirmar que houve uma remoção em torno de 70% nesse período.

Para analisar, então, o mecanismo cinético que controla o processo de adsorção, a partir da análise dos dados experimentais, foram testados os modelos cinéticos de pseudo

primeira-ordem e pseudo segunda-ordem em suas formas lineares. A validade destes modelos foi verificada pelos gráficos lineares obtidos a partir dos plots de $(q_e - q_t)$ vs t e (t/q_t) vs t representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

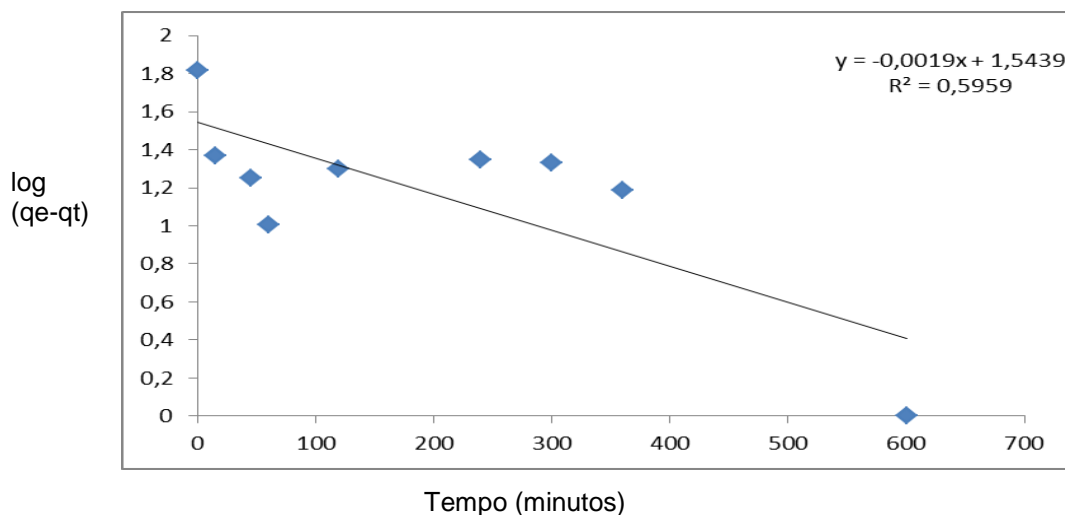


Figura 8 Linearização do modelo cinético de pseudo primeira-ordem do íon Pb (II) pela lignina.

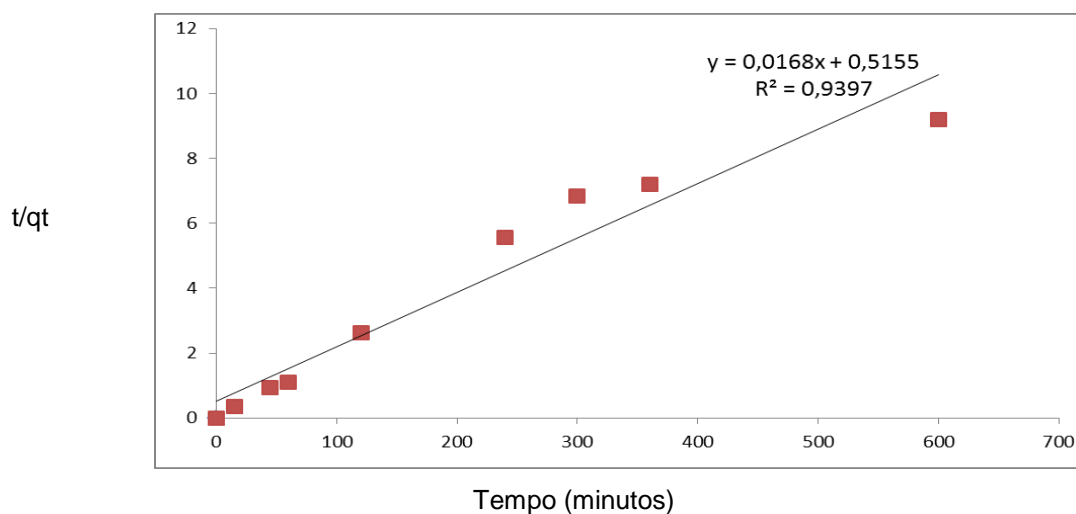


Figura 9 Linearização do modelo cinético de pseudo segunda-ordem do íon Pb (II) pela lignina.

Muitos modelos cinéticos rígidos, tais como, de difusão em superfície homogêneas, de difusão em poros e de difusão heterogênea são aplicados para descrever o transporte de moléculas para o interior das partículas do adsorvente, entretanto, a complexidade matemática destes modelos limita a sua utilização prática. Alternativamente, é possível analisar a cinética de adsorção com modelos mais simples, como os das equações de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem, obtidos a partir dos valores dos coeficientes lineares e angulares obtidos das equações 2 e 3, sendo calculados os

parâmetros cinéticos de constante de velocidade (k_1 e k_2) e a quantidade adsorvida no equilíbrio, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 Parâmetros para a cinética dos modelos de pseudo primeira-ordem e pseudo segunda-ordem para a adsorção do Pb (II)

Metal	Pseudo primeira-ordem			Pseudo segunda-ordem		
	q_e	k_1	R^2	q_e	k_2	R^2
Pb (II)	34,99	-0,004	0,5959	59,52	0,005	0,9397

A partir da análise dos dados da Tabela 8, o modelo que melhor se ajustou apresentando um coeficiente de correlação linear próximo de 1 para o processo de adsorção do Pb (II) foi o modelo de pseudo segunda-ordem. O valor de q_e obtido pelo modelo de pseudo segunda-ordem foi de 59,52 mg g⁻¹, sendo próximo ao valor obtido experimentalmente (63,8 mg g⁻¹), apresentando um erro relativo baixo de 6,7%. Este modelo é baseado no pressuposto de que a etapa determinante da velocidade envolve o mecanismo de interação do metal com o biossorvente, ou seja, depende das interações físico-químicas entre o sorvato e os grupos da superfície.

6 CONCLUSÃO

- A lignina pode ser utilizada como adsorvente dos íons Pb (II);
- O planejamento experimental utilizando o DCC foi uma ferramenta importante para determinar as melhores condições de adsorção do Pb (II) em soluções aquosas pela lignina;
- A adsorção do Pb (II) foi mais eficiente com maiores quantidades de metal e menores quantidades de adsorvente;
- O modelo de adsorção do Pb (II) pela lignina que melhor se ajustou nos estudos cinéticos foi o modelo de pseudo-segunda-ordem;
- A lignina proveniente do licor negro gerado durante a produção de bioetanol se mostra uma alternativa eficiente na remoção do Pb (II), possuindo características de baixo custo, grande disponibilidade, uma vez que há grandes perspectivas no aumento da produção de bioetanol e conseqüente aumento nos resíduos gerados por estas indústrias. Essas características sugerem, portanto, que a lignina possui grande potencial para ser uma alternativa econômica e eficaz para a remoção de íons Pb (II) em soluções aquosas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do planejamento experimental por meio do DCC mostrou-se uma eficiente ferramenta para avaliação dos parâmetros que exercem maior influência sobre o processo de adsorção do Pb (II) pela lignina proveniente do processo de deslignificação da produção de bioetanol.

Tendo constatado a eficiência da lignina obtida do processo de precipitação do licor negro na adsorção do Pb (II) e considerando que ainda não há registros do uso da mesma na adsorção de metais, sugere-se novos testes para melhoria da remoção do Pb (II) e que a mesma seja testada na adsorção de outros metais pesados, isoladamente ou em mistura.

REFERÊNCIAS

- AL-GHEETHI, A. A. S.; LALUNG, J.; NOMAN, E. A.; BALA, J. D.; NORLI, I. Removal of heavy metals and antibiotics from treated sewage effluent by bacteria. **Clean Technologies and Environmental Policy**, New York, v. 17, p. 2101-2123, 2015
- ALBADARIN, A. B.; AL-MUHTASEBB, A. H.; AL-LAQTAHA, N. A.; WALKER G. M. A, ALLENA, S. J.; AHMAD, M. N. M. Biosorption of toxic chromium from aqueous phase by lignin: mechanism, effect of other metal ions and salts. **Chemical Engineering Journal**, v. 169, p. 20–30, 2011.
- ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais) - Universidade de São Paulo, Ciência e Engenharia de materiais, São Carlos, 2011.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 485-4861, 2010.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA; AWWA; WEF. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- AZADI, P.; INDERWILDI R. O.; FARNOOD, R.; KING, A. D. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, New York, v. 21, p. 506–523, 2013.
- BAUDDH, K.; SINGH, K.; SINGH, B.; SINGH, R. P. Ricinus communis: A robust plant for bio-energy and phytoremediation of toxic metals from contaminated soil. **Ecological Engineering**, New York, v. 84, p.640–652, 2015.
- BAZRGAR, M.; GOUDARZI, I.; LASHKARBOLOUKI, T.; SALMANI, M.E. Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. **Physiology & Behavior**, New York, v.151, p. 178–188, 2015.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília: CONAMA, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº. 430**, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Brasília, DF: CONAMA, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914**, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.
- BUENO, B. M; MOLINA, F. F.; TOREM, M. L.; MESQUITA, L. M. S.; PINO, G. A. H. Remoção de Pb(II) de soluções aquosas por Biossorção em *R. opacus*. **Revista da Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 62, n. 4, p. 487-194, 2009.

BROSSE, N.; IBRAIM, M. N. M.; RAHIM, A. A. Biomass to bioethanol: initiatives os the future for lignin. **ISRN Materials Science**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

CAPITANI, E. M. Metabolismo e toxicidade do chumbo na criança e no adulto. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 42, n. 3 p. 278-86, 2009.

COLE, G.; WEIGEL, J.; HEADRICK, A.; ADAMS, W.; BISKUP, J. Multiple pathological fractures and delayed union associated with lead exposure in a German Shepherd Dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, p. 373-376, 2015.

CORATO, U.; SHARMA, N.; MACCIONI, O.; ZIMBARDI, F. Suppressiveness of steam-exploded biomass of *Miscanthus sinensis* var. *giganteus* against soil-borne plant pathogens. **Crop Protection**, New York, v. 30, p. 246–252, 2011.

CHEN, M.; ZHANG, L.; N , XIAO-JIA, J. L.; JUN-CHI CAI, H. Bioaccumulation and tolerance characteristics of a submerged plant (*Ceratophyllum demersum* L.) exposed to toxic metal lead. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 122, p. 313–321, 2015.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos**. Rio de Janeiro: E-papers, 2008. (Série escola piloto de engenharia química COPPE/UFRJ, v. 5).

DÍAZ, M. J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 891-899. 2009.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 33, p. 259–276, 2011.

FABA, L.; DIAZ, E.; ORDONEZ, S. From biomass to second generation biofuels. **Madera y Bosques**, v. 20, p. 11-24, 2014.

GINNEKEN, M. V.; JONGE, M.; BERVOETS, L.; BLUST, R. Uptake and toxicity of Cd, Cu and Pb mixtures in the isopod *Asellus aquaticus* from waterborne exposure. **Science of the Total Environment**, New York, v. 537, p. 170–179, 2015.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503. 2009.

GUO, X.; ZHANG, S.; SHAN, X. Adsorption of metal ions on lignina. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 151, p.134–142, 2008.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, New York, v. 24, p. 13-38, 2014.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresouce Technology**, New York, v. 100 p. 10-18, 2009.

HENRIQUE, R.; GUIMARÃES, R.B.; FONSECA, E.S. Contaminação ambiental por chumbo em Caçapava-SP. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 15, p. 37-49, 2014.

HORST, D. J.; BEHAINNE, J. J. R.; ANDRADE JÚNIOR, P. P.; KOVALESKI, J. L. An experimental comparison of lignin yield from the Klason and Willstatter extraction methods. **Energy for Sustainable Development**, New York, v. 23, p. 78-84, 2014.

HU, J.; SHEN, D.; XIAO, R.; WU, S.; ZHANG, H. Free-radical analysis on thermochemical transformation of lignin to phenolic compounds. **Energy Fuels**, New York, v. 27, p. 285–293, 2013.

HUANG, G.; WANG, D.; MA, S.; CHEN, J.; JIANG, L.; WANG, P. A new, low-cost adsorbent: Preparation, characterization, and adsorption behavior of Pb(II) and Cu(II). **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 445, p. 294-302, 2015.

IBRAHIM, M. N. M.; NGAHA, W. S. W.; NORLIYANAA, M. S.; DAUDB, W. R. W.; RAFATULLAHB, M.; SULAIMANB, O.; HASHIM, R. A novel agricultural waste adsorbent for the removal of lead (II) ions from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 182, p. 377–385, 2010.

JEZ, E.; LESTAN, D. Prediction of blood lead levels in children before and after remediation of soil samples in the upper Meza Valley, Slovenia. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 296, p. 138-146, 2015.

JOHNSON, C. M.; ULRICH, A. II Analytical methods for use in plant analysis. **Calif. Agr. Sta. Exp. Bull.** 766. Berkeley. 1959.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, V.; TRIPATHI, V.K.; JAHAN, S. Lead intoxication synergies of the ethanol-induced toxic responses in neuronal cells-PC12. **Molecular Neurobiology**, v. 52, p. 1504-1520, 2015.

KUMAR, G. H.; KUMARI, J. P. Heavy metal lead influative toxicity and its assessment in phytoremediating plants - a review. **Water Air and Soil Pollution**, v. 226, p. 1-11, 2015.

LANPHEAR, B. P.; HOMUNG, R.; KHOURY, J.; YOLTON, K.; BAGHURSTL, P.; BELLINGER, D. C.; CANFIELD, R. L.; DIETRICH, K. N.; BOMCHEIN, R.; GREENE, T.; ROTHENBERG, S. J.; NEEDLEMAN, H. L.;SCHNAAS, L.; WASSERMAN, G.; GRAZIANO, J.; ROBERTS, R. Low-Level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, p. 894–899, 2005.

LARGITTE, L.; BRUDEY, T.; TANT, T.; DUMESNIL, P. C.; LODEWYCKX, P. Comparison of the adsorption of lead by activated carbons from three lignocellulosic precursors. **Microporous and Mesoporous Materials**, New York, v. 219, p. 265-275, 2016.

LI, Z.; GE, Y.; WAN, L. Fabrication of a green porous lignin-based sphere for the removal of lead ions from aqueous media. **Journal of Hazardous Materials**, New York, v. 285, p. 77-83, 2015.

LI, Z.; XIAO, D.; GE, Y.; KOEHLER, S. Surface-Functionalized Porous Lignin for Fast and Efficient Lead Removal from Aqueous Solution. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, p. 15000-15009, 2015.

LIU,G.; YU, Y.; HOU, J.; XUE, W.; LIU, Y.; WANG, W.; ALSAEDI, A.; HAYAT, T.; LIU, Z. An Ecological risk assessment of heavy metal pollution of the agricultural ecosystem near a lead-acid battery factory. **Ecological Indicators**, New York, v. 47, p. 210–18, 2014.

LOPICIC, Z.R.; MILOJKOVIC, J.V.; SOSTARIC, T.D.; PETROVIC, M.S.; MIHAJLOVIC, M.L.; LACNJEVAC, C.M.; STOJANOVIC, M.D. Influence of pH value on Cu (II) biosorption by lignocellulose peach shell waste material. **Hemijaska Industrija**, v. 67, p. 1007-1015, 2013.

MANCUSO, P. C. S. Tecnologia de reúso de água. *In*: MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. (Eds.). **Reúso de água**. Barueri, São Paulo: Manole, 2003. p. 291-320.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química da Universidade de São Paulo São Paulo, 2009).

MARTÍN-LARA, M. A.; RODRÍGUEZ, I. L.; BLÁZQUEZ, G.; CALERO, M. Factorial experimental design for optimizing the removal conditions of lead ions from aqueous solutions by three wastes of the olive-oil production. **Desalination**, New York, v. 278, p. 132-140, 2011.

MOUNI, L.; MERABET, D.; BOUZAZA, A.; BELKHIRI, L. Adsorption of Pb(II) from aqueous solutions using activated carbon developed from Apricot stone. **Desalination**, New York, v. 276, p. 148-153, 2011.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, p. 673-686, 2005.

NADA, A. M. A.; EL-SAKHAWY, M.; KAMEL, S. M. Infra-red spectroscopic study of lignins. **Polymer Degradation and Stability**, New York, v.60, p. 247-251, 1998.

NONG, G.; HUANG, L.; MO, H.; WANG, S. Investigate the variability of gas compositions and thermal efficiency of bagasse black liquor gasification. **Energy**, New York, v.49, p. 178-181. 2013.

OLIVEIRA, M. GranBio investe em P&D para superar os desafios da segunda geração de etanol. **Pesquisa FAPESP**. p. 70-73, 2015. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2015/10/070-073_GranBio_235NOVO.pdf?15654c. Acesso em: 15 out. 2015.

OZER, A. Removal of Pb(II) ions from aqueous solutions by sulphuric acid-treated wheat bran. *Journal of Hazardous Materials*, New York, v. 141, p. 753-761, 2007.

PASTORE, T. C. M.; OLIVEIRA, C. C. K.; RUBIM, J. C.; SANTOS, K. O. Efeito do intemperismo artificial em quatro madeiras tropicais monitorado por espectroscopia de infravermelho (DRIFT). **Química Nova**, São Paulo, v.31, p. 2071-2075, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage learning, 2010.

PARANÁ. Instituto Ambiental do Paraná - IAP. Proposta de Resolução SEMA/IAP, 2008.

PESSOA JÚNIOR, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 14, p. 291-297, 1997.

QUÍMICA VERDE NO BRASIL: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI, 2011. 420 p.

RODRIGUES, R. F.; TREVENZOLI, R. L.; SANTOS, R. L. Z.; LEÃO, V. A.; BOTARO, V. R. Adsorção de metais pesados em serragem de madeira tratada com ácido cítrico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, p. 21-26, 2006.

ROSSBERG, C.; BREMERA, M.; MACHILLB, S.; KOENIGC, S.; KERNSC, G.; BOERIUD, C.; WINDEISENE, E.; FISCHER, S. Separation and characterization of sulphur-free lignin from different agricultural residues. **Industrial Crops and Products**, New York, v. 73, p. 81-89, 2015.

SAHOO, S.; SEYDIBEYO, M. Ö; MOHANTY, A. K.; MISRA, M. Characterization of industrial lignin's for their utilization in future value added application. **Biomass and Bioenergy**, New York, v. 35, p. 4230-4237, 2011.

SEGAL, D.; LIN, Y.S.; GINSBERG, G.; SONAWANE, B. A conceptual framework for evaluating the interaction of a chemical and nonchemical stressor in human health risk assessment: A case study for lead and psychosocial stress. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 21, p. 1840-1868, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152- 178, 1999.

SILVA, D. D. V.; CANDIDO, E. J.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse under chemical hydrolysis for the use of fractions c5 and c6 in ethanol production. *In*: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE BIORREFINARIAS, 1. 2012. Los Cabos, México. **Book off abstract**. Los Cabos, México: CIAB, 2012.

SILVA, K. M. D.; REZENDE, L. C. S. H.; SILVA, C. A.; BERGAMASCO, R.; GONÇALVES, D. S. Caracterização físico-química da fibra de coco verde para a adsorção de metais pesados em efluente de indústria de tintas. **Engevista**, v. 15, p. 43-50, 2013.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SOUTO, F.; CALADO, V.; PEREIRA JUNIOR, N. Fibras de carbono a partir de lignina: uma revisão da literatura. **Matéria**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 100-114, 2015.

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

SCHAFHAUSER, B. H.; GONÇALVES, T. R.; CONSOLIN, M. F. B.; ALMEIDA, V. C.; PINEDA, E. A. G.; CONSOLIN FILHO, N. Estudo da adsorção de chumbo II em lignina modificada a partir do resíduo do milho. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v. 6, p. 16-25, 2015.

SCHOSSLER, T. R.; MACHADO, D. M.; ZUFFO, A. M.; ANDRADE, F. R.; PIAUILINO, A. C. Salinidade: efeitos na fisiologia e na nutrição mineral de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, p. 1563-1578, 2012.

SMOLDERS, E.; OORTS, K.; PEETERS, S.; LANNO, R.; CHEYNS, K. Toxicity in lead salt spiked soils to plants, invertebrates and microbial processes: Unraveling effects of

acidification, salt stress and ageing reactions. **Science of the Total Environment**, New York, v. 536, p. 223–231, 2015.

STIPANUK, M. H.; CAUDILL, M. A. **Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier Saundre Publishing, 2012.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Suíça, v. 9, n. 9, p. 1621-1651. 2008.

TASAR, S.; KAYA, F.; OZER, A. Biosorption of lead(II) ions from aqueous solution by peanut shells: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, New York, v. 2, p. 1018–1026, 2014.

TOLEDO, T. V.; BELLATO, C. R.; PESSOA, K. D.; FONTES, M. P. F. Remoção de cromo (VI) de soluções aquosas utilizando o compósito magnético calcinado hidrotalcita-óxido de ferro: estudo cinético e de equilíbrio termodinâmico. **Química Nova**, São Paulo, v.36, p. 419-425, 2013.

UZU, T.; NAKAO, K.; KUME, S.; ARAKI, H.; ISSHIKI, K.; ARAKI, S.; KAWAI, H.; UGI, S.; KASHIWAGI, A.; MAEGAWA, H. High sodium intake is associated with masked hypertension in japanese patients with type 2 diabetes and treated hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 25, p. 1170-1174, 2012.

VALLVERDÚ-COLL, N.; LOPEZ-ANTIA, A.; MARTINEZ-HARO, M.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MATEO, R. Altered immune response in mallard ducklings exposed to lead through maternal transfer in the wild. **Environmental Pollution**, New York, v. 205, p. 350-356, 2015.

VEIT, H. M.; OLIVEIRA, M.; RICHTER, G. Thermal processes for lead removal from the funnel glass of CRT monitors. **Revista da Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 68, 2015.

YAO, Q.; XIE, J.; LIU, J.; KANG, H.; LIU, Y. Adsorption of lead ions using a modified lignin hydrogel. **Journal of Polymer Research**, v. 21, p. 1-16, 2014.

ZAKZESKI, J.; BRUIJNIX, P. C. A.; JONGERIUS, A. L.; WECKHUYSEN, B. M. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemical. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3552-3599, 2010.

ZHENG, Y; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agriculture and Biology**, Madrid, v. 2, n. 3, p. 23-68. 2009.

ZHU, Q.; LI, Z. Hydrogel-supported nanosized hydrous manganese dioxide: Synthesis, characterization, and adsorption behavior study for Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ and Ni²⁺ removal from water. **Chemical Engineering Journal**, v. 281, p. 69-80, 2015.

WANG, Z.; WANG, X.; FU, Y.; LI, Z.; ZHANG, F.; QIN, M. Colloidal behaviors of lignin contaminants: Destabilization and elimination for oligosaccharides separation from wood hydrolysate. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 145, p. 1-7, 2015.