



JOSÉ AUGUSTO TRAVASSOS RIOS TOMÉ

**DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO POR
EXPLOSÃO COM VAPOR DA PALHA DE CANA-
DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA.**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

JOSÉ AUGUSTO TRAVASSOS RIOS TOMÉ

**DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO
POR EXPLOSÃO COM VAPOR DA PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.**

Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho.

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Aline Carvalho da Costa.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ AUGUSTO TRAVASSOS RIOS TOMÉ
E ORIENTADA PELO PROF.DR.RUBENS MACIEL FILHO.

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Rubens Maciel Filho", is written over a horizontal line.

CAMPINAS

2014

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

T594d Tomé, José Augusto Travassos Rios, 1983-
Desenvolvimento do pré-tratamento por explosão com vapor da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática / José Augusto Travassos Rios Tomé. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rubens Maciel Filho.
Coorientador: Aline Carvalho da Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cana-de-açúcar. 2. Etanol. 3. Pré-tratamento. 4. Hidrólise enzimática. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Steam explosion pretreatment development of sugarcane straw for second generation ethanol production via enzymatic hydrolysis

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Ethanol

Pretreatment

Enzymatic hydrolysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Rubens Maciel Filho [Orientador]

Ambrósio Florêncio de Almeida Neto

Vera Lúcia Reis de Gouveia

Data de defesa: 28-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS E PRODUTOS (DDPP)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento do pré- tratamento por explosão com vapor
da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda
geração via hidrólise enzimática.**

Autor: José Augusto Travassos Rios Tomé.

Orientador : Prof. Dr. Rubens Maciel Filho.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Aline Carvalho da Costa

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



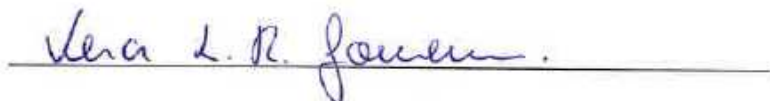
Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Dra. Vera Lúcia Reis de Gouveia

CTBE – Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol

DEDICATORIA

Aos meus pais Antônio e Geralda.

Aos meus irmãos Maria Emília e João Guilherme.

A minha esposa Adriana Lúcia.

Ao meu filho Artur.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Rubens Maciel Filho e Prof^a. Dra. Aline Carvalho da Costa por todo o suporte e confiança concedidos durante a realização deste trabalho.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) que me permitiu conciliar trabalho e estudo, forneceu toda a estrutura de laboratórios e planta piloto necessárias para realização dos experimentos, e principalmente pela oportunidade de durante a realização deste trabalho esta dentro de um ambiente inovador onde a transformação de conhecimento em tecnologia e desenvolvimento socioeconômico faz parte da atmosfera e contamina todos que por ali estão. Em especial agradeço a todos os integrantes da equipe do projeto etanol de segunda geração, amigos com quem troquei experiências de grande valor.

À FAPESP que através do Programa de Pesquisa em Bioenergia (BIOEN) permitiu que esse trabalho fosse parte de um projeto maior para desenvolvimento de um “Processo Integrado para Produção Total de Bioetanol e Emissão Zero de CO₂”, possibilitando a interação com outros pesquisadores e áreas, enriquecendo desta forma o aprendizado construído.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“Sugar is the new oil.”
John Doerr

RESUMO

Biomassas de diversos tipos têm sido investigadas, ao redor do mundo, como matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que esse é um biocombustível com grande potencial para substituir parte significativa dos combustíveis fósseis, refletindo em inúmeros benefícios sociais, ambientais e econômicos para a sociedade. No Brasil, o interesse pela palha de cana-de-açúcar tem aumentado nos últimos anos, uma vez que a estimativa de demanda por biomassa indica que a quantidade de bagaço, principal biomassa estudada nos últimos anos, não será suficiente. Neste trabalho investigou-se o pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar por explosão com vapor visando maior rendimento e seletividade no fracionamento dos seus principais constituintes, além de maior conversão da celulose numa subsequente etapa de hidrólise enzimática. Foi empregado na primeira etapa de experimentos um planejamento fatorial fracionado para avaliar os efeitos das variáveis tempo, pressão, umidade e concentração de catalisador. Na segunda etapa do trabalho as variáveis tempo, pressão e catalisador foram investigadas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para identificar as regiões ótimas de processo por meio das superfícies de resposta. Dentro das condições investigadas os resultados obtidos demonstram que a palha de cana-de-açúcar é uma biomassa com grande potencial de aproveitamento para produção de etanol de segunda geração e o pré-tratamento por explosão com vapor é adequado para o seu processamento. Rendimento máximo de glicose na ordem de 78% foi alcançado após etapas de pré-tratamento (16 kgf/cm², 8 min, 2,1% m/m SO₂) e hidrólise enzimática (8% TS, 2 FPU/gTS, 48 h).

Palavras chave: Palha de Cana-de-açúcar, Pré-Tratamento, Hidrólise Enzimática, Etanol de Segunda Geração.

ABSTRACT

Many different kinds of biomass have been investigated worldwide, as raw materials for the second generation ethanol production, since this is a biofuel with wide potential to replace a significant fraction of fossil fuels, reflecting numerous social, environmental and economical benefits for society. In Brazil, the interest in sugarcane straw has increased in recent years, as the estimated demand for biomass indicates that the amount of sugarcane bagasse, the main biomass studied in recent years, will not be enough. In this work, the steam explosion pretreatment of sugarcane straw was investigated to enhance the yield and selectivity in the fractionation of the main biomass constituents, as well as to enhance the cellulose conversion in a subsequent enzymatic hydrolysis process. In the first step a fractional factorial design was performed to study the effect of the factors time, pressure, humidity and catalyst concentration on the response variables. In the second step of the work the factors time, pressure and catalyst were investigated using a central composite design (CCD) to identify the optimal operational process regions through response surfaces. Within the investigated conditions the results obtained demonstrate that the sugarcane straw is a great potential biomass for second generation ethanol production and steam explosion pretreatment is suitable for this processing. Maximum glucose yield around 78% was achieved after pretreatment at 16 kgf /cm², 8 min and using 2.1% SO₂ as catalyst, followed by enzymatic hydrolysis at 8% (w/w) solids, 2 FPU cellulase / g pretreated straw after 48 h.

Key word: Sugarcane Straw, Steam Explosion Pretreatment, Second Generation Ethanol, Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica.	5
Figura 2: Diversidade de biomassas utilizada em projetos de etanol de segunda geração no mundo: Espiga de milho (A), Palha de Milho (B), Lascas de Madeira (C), Palha de Trigo (D), Palha de Arroz (E) e Palha de Cevada (F).	7
Figura 3: Bagaço de cana-de-açúcar estocado dentro de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.	8
Figura 4: Partes que constituem a palha de cana-de-açúcar.	9
Figura 5: Máquina enfardadora de palha de cana-de-açúcar.	11
Figura 6: Composição da cana-de-açúcar, cana energia tipo I e cana energia tipo II.	14
Figura 7: Ilustração do efeito do pré-tratamento na fibra de biomassa.	15
Figura 8: Fluxograma das principais etapas do desenvolvimento do processo.	25
Figura 9: Diagrama ilustrativo das etapas do planejamento experimental.	26
Figura 10: Coleta da Palha de cana-de-açúcar no campo.	29
Figura 11: Minho de facas usado para picagem da palha.	30
Figura 12: Pedacos remanescentes de cana removidos antes da picagem.	30
Figura 13: Palha não picada.	30
Figura 14: Palha Picada.	30
Figura 15: Adição de água para ajuste da unidade da palha.	30
Figura 16: Palha preparada para os ensaios de pré-tratamento.	30
Figura 17: Determinação de cinzas na palha: Queima em bico de Bunsen (A), Calcinação na mufla e Amostra das cinzas (C).	31
Figura 18: Amostras da palha antes e depois da hidrólise com ácido concentrado 72% a 40°C.	32
Figura 19: Amostras autoclavadas após diluição para 4% de concentração do ácido.	32
Figura 20: Filtração das amostras após hidrólise com ácido diluído.	32
Figura 21: Neutralização das amostras com carbonato de cálcio.	32
Figura 22: Reator de pré-tratamento “ <i>Steam Explosion</i> ” (A), injeção de catalisador no reator (B) e monitoramento da variação de massa do cilindro de gás (C).	33

Figura 23: Palha de cana-de-açúcar pré-tratada (A) e amostras para posterior análise em laboratório (B).	34
Figura 24: Hidrólise enzimática em reatores agitados.	35
Figura 25: Filtração do hidrolisado enzimático.....	35
Figura 40: Diagrama esquemático das correntes no processo de pré-tratamento.....	37
Figura 26: Composição da palha de cana-de-açúcar.	40
Figura 27: Perfil de pressurização do reator de pré-tratamento para todas as condições investigadas.	41
Figura 28: Perfil de aquecimento do reator de pré-tratamento para todas as condições investigadas.	42
Figura 29: Rendimento do pré-tratamento, em relação à recuperação total de sólidos, para cada uma das condições investigadas.....	43
Figura 30: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação de massa no pré-tratamento.....	44
Figura 31: Gráfico normal dos efeitos das variáveis sobre o rendimento do pré-tratamento.	45
Figura 32: Glicose recuperada no pré-hidrolisado em relação a celulose da biomassa inicial.	46
Figura 33: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a glicose recuperada no pré-hidrolisado.....	46
Figura 34: Relação oligo/mono de glicose recuperada no pré-hidrolisado.	47
Figura 35: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a razão oligo/mono de glicose recuperada no pré-hidrolisado.	47
Figura 36: Xilose recuperada no pré-hidrolisado em relação a hemiceluloses da biomassa inicial.	48
Figura 37: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a xilose recuperada no pré-hidrolisado.....	48
Figura 38: Relação oligo/mono de xilose recuperada no pré-hidrolisado.	49
Figura 39: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a razão mono/oligo de xilose recuperada no pré-hidrolisado.....	49
Figura 41: Índice de Fracionamento.....	51

Figura 42: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre o Índice de Fracionamento.	51
Figura 43: Concentrações de glicose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas.	53
Figura 44: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose na hidrólise enzimática (24 h de reação).	54
Figura 45: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose na hidrólise enzimática (48 h de reação).	54
Figura 46: Conversão enzimática da celulose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas.	55
Figura 47: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática (24 h de reação).	56
Figura 48: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática (48 h de reação).	56
Figura 49: Recuperação Global de glicose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.	57
Figura 50: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 24 h de reação de hidrólise enzimática.	58
Figura 51: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 48 h de reação de hidrólise enzimática.	58
Figura 52: Fardos de palha de cana-de-açúcar.	62
Figura 53: Comparação da composição da palha de cana-de-açúcar utilizada nas ETAPAS I e II.	63
Figura 54: Rendimento do pré-tratamento, em relação a recuperação total de sólidos, para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.	65
Figura 55: Glicose recuperada no pré-hidrolisado em relação à celulose da biomassa inicial (ETAPA II do planejamento).	66
Figura 56: Xilose recuperada no pré-hidrolisado em relação a hemiceluloses da biomassa inicial (ETAPA II do planejamento).	67
Figura 57: Balanço de massa do pré-tratamento para hemiceluloses.	68

Figura 58: Índice de Fracionamento da Biomassa durante o processo de pré-tratamento (ETAPA II do planejamento).	70
Figura 59: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre o Índice de Fracionamento da Biomassa.	71
Figura 60: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).	74
Figura 61: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do catalisador e da pressão, mantendo o tempo no nível central (0).	75
Figura 62: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do catalisador e do tempo, mantendo a pressão no nível central (0).	76
Figura 63: Concentrações de glicose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.	77
Figura 64: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose após 24 h de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).	78
Figura 65: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose após 48 h de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).	79
Figura 66: Conversão enzimática da celulose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.	80
Figura 67: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática após 24 h (ETAPA II do planejamento).	81
Figura 68: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática após 48 h (ETAPA II do planejamento).	81
Figura 69: Superfície de resposta para a Conversão Enzimática em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).	84
Figura 70: Recuperação Global de glicose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).	85
Figura 71: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 24 h de reação de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).	86

Figura 72: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 48 h de reação de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).	87
Figura 73: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).	90
Figura 74: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do catalisador e da pressão, mantendo o tempo no nível central (0).	91
Figura 75: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do catalisador e do tempo, mantendo a pressão no nível central (0).	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis investigados para cada uma das variáveis.	27
Tabela 2: Matriz de planejamento completa para o planejamento Fatorial Fracionado.	27
Tabela 3: Composição da palha de cana-de-açúcar em trabalhos de referência.	40
Tabela 4: Composição das correntes do diagrama esquemático utilizadas para exemplificar o cálculo do Índice de Fracionamento.	37
Tabela 5: Índice de Fracionamento da biomassa calculado a partir dos rendimentos e seletividades dos componentes celulose e hemiceluloses para cada um dos ensaios da ETAPA I do planejamento.	50
Tabela 6: Níveis investigados para cada uma das variáveis.	60
Tabela 7: Matriz experimental completa para o planejamento DCCR.	61
Tabela 8: Índice de Fracionamento calculado a partir dos rendimentos e seletividades dos componentes celulose e hemiceluloses de cada um dos ensaios da ETAPA II do planejamento.	69
Tabela 9: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	71
Tabela 10: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	72
Tabela 11: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	73
Tabela 12: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para a Conversão Enzimática (48 h)	82
Tabela 13: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	82
Tabela 14: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	83
Tabela 15: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para o Rendimento Global (Considerando 48 h de Hidrólise Enzimática).	88
Tabela 16: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.	88

Tabela 17: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Rendimento Global.	89
Tabela 18: Condições de processo e dados da matéria-prima.	102
Tabela 19: Dados do produto (palha pré-tratada) e Balanço de massa.	103
Tabela 20: Composição das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento.	104
Tabela 21: Composição (em massa) das frações solúveis e insolúveis após o pré-tratamento.	105
Tabela 22: Recuperação dos principais componentes após pré-tratamento.	106
Tabela 23: Dados da hidrólise enzimática e recuperação global de glicose.	107
Tabela 24: Condições de processo e dados da matéria-prima.	108
Tabela 25: Dados do produto (palha pré-tratada) e balanço de massa.	109
Tabela 26: Composição das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento.	110
Tabela 27: Composição (em massa) das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento.	111
Tabela 28: Recuperação dos principais componentes após pré-tratamento.	112
Tabela 29: Dados da hidrólise enzimática e recuperação global de glicose.	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPT	Biomassa Pré-Tratada
C5	Açúcares de cinco carbonos
C6	Açúcares de seis carbonos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
FPU	Filter Paper Unit
HMF	Hydroxymethylfurfural
IF	Índice de Fracionamento
Mono	Monômero
Oligo	Oligômero
PDU	Process Development Unit
SS	Sólidos Solúveis
TS	Total Solids

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral	2
1.1.1 Objetivos Específicos	2
1.2 Principais contribuições deste trabalho.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biomassa Lignocelulósica	4
2.1.1 Principais Constituintes	5
2.2 Biomassas para produção de etanol de segunda geração.....	6
2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar	7
2.2.2 Palha de cana-de-açúcar.....	9
2.2.3 Culturas Energéticas dedicadas à biomassa.....	11
2.3 Etapas do processo de produção de etanol de segunda geração	14
2.3.1 Pré-tratamento.....	15
2.3.1.1 Explosão com Vapor.....	16
2.3.1.2 Processo Hidrotérmico.....	18
2.3.1.3 Hidrólise Ácida Diluída.....	18
2.3.1.4 Pré-tratamento alcalino	19
2.3.1.5 Líquidos Iônicos	19
2.3.2 Hidrólise Enzimática	21
2.4 Desenvolvimento de processos para produção de etanol de segunda geração utilizando palha de cana-de-açúcar como matéria-prima.	23
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	24
3.1 Planejamento experimental.....	25
3.2 Equipamentos	28
3.3 Coleta e preparo da palha de cana-de-açúcar.....	29
3.4 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”	31
3.5 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar	33
3.6 Caracterização da palha de cana-de-açúcar pré-tratada.....	34

3.7 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada	34
3.8 Índice de Fracionamento.....	35
3.9 Recuperação Global.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 ETAPA I: Avaliação das variáveis de processo de maior efeito.	40
4.1.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”	40
4.1.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar	41
4.1.3 Hidrólise Enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada.....	52
4.1.4 Recuperação Global.....	57
4.1.5 Conclusões da ETAPA I.....	59
4.2 ETAPA II: Identificação de condições ótimas de processo a partir da superfície de resposta.	60
4.2.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”	62
4.2.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar	64
4.2.3 Hidrólise Enzimática da palha de cana-de-açúcar	77
4.2.4 Recuperação Global.....	85
4.2.5 Conclusões da ETAPA II.....	92
4.3 Conclusões Gerais	93
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICE A.....	102
APÊNDICE B	108

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de energia é uma necessidade básica para o desenvolvimento econômico mundial. Dados publicados no *World Energy Outlook 2012*, partindo da estimativa de crescimento do produto interno bruto (PIB) mundial de 3,5% por ano entre 2010 e 2035, juntamente com o aumento populacional de 6,8 bilhões para 8,6 bilhões no mesmo período, apontam para um aumento de 35% na demanda de energia primária mundial até 2035. Associado a essa previsão está o fato de que 80% dessa demanda atualmente é suprida por fontes de origem fóssil (carvão mineral, petróleo e gás natural), o que resulta em milhares de toneladas de CO₂ emitidas para atmosfera, sendo essa uma das principais causas do efeito estufa e consequente aquecimento global (International Energy Agency 2012).

Dentro deste contexto, a busca por fontes renováveis para uso como matéria-prima de uma ampla gama de produtos, muito deles substitutos diretos do petróleo, cada vez mais tem se tornado foco de pesquisas por instituições diversas em todo o mundo. Entre as fontes de energia renováveis a biomassa é a mais pesquisada, superando, por exemplo, a solar, eólica, hídrica e geotérmica juntas (Manzano-Agugliaro et al., 2013).

Uma vez que o setor de transportes responde por mais da metade do consumo de petróleo no mundo, aumentar a produção e uso dos biocombustíveis, com destaque para o etanol, é visto como uma das principais ações necessárias para reduzir o consumo de petróleo. Vários países já anunciaram planos e medidas para ampliar a inserção do etanol como combustível, principalmente por meio da mistura à gasolina, o que triplicará a demanda atual ao longo dos próximos 20 anos (International Energy Agency 2012).

Em se tratando da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, foco deste trabalho, os novos processos são uma das mais inovadoras tecnologias em fase de desenvolvimento e potencialmente podem resultar em aumento significativo da produção de biocombustíveis, resultando ainda em uma gama de outros subprodutos, considerados compostos de valor agregado dentro do conceito de biorrefinarias (FitzPatrick et al., 2010; Kamm & Kamm, 2004; Menon & Rao, 2012).

No entanto, muitos fatores físico-químicos, estruturais e composicionais associados à biomassa contribuem para a complexidade e consequente inviabilidade econômica dos processos de conversão, se o processo não for adequadamente desenvolvido. Uma das rotas tecnológicas que tem recebido bastante atenção, por conta principalmente do potencial de desenvolvimento atrelado à biotecnologia moderna, é a rota enzimática, que acontece em condições brandas de temperatura e proporciona reações de elevada especificidade, o que resulta em altos rendimentos e baixa produção de produtos indesejáveis. Para essa rota os processos de pré-tratamento da biomassa são considerados fundamentais, uma vez que existe a necessidade de alterar e/ou remover impedimentos estruturais e composicionais para a etapa de hidrólise, possibilitando a melhora da taxa de hidrólise enzimática e o aumento no rendimento de açúcares a partir da celulose.

Investigações experimentais das mudanças físicas e reações químicas que ocorrem durante o pré-tratamento são importantes para o desenvolvimento de modelos que possam ser utilizados no projeto racional de processos de pré-tratamento. Além disso, condições operacionais de processo podem ser desenvolvidas sob medida para características químicas e estruturais específicas de diferentes fontes de materiais lignocelulósicos (Mosier et al. 2005).

1.1 Objetivo Geral

O Objetivo deste trabalho é avaliar o potencial do pré-tratamento por explosão com vapor da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática.

1.1.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo principal do trabalho os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos.

i. Estudar entre as variáveis de processo, pressão, tempo, concentração de catalisador e umidade, quais são as de maior efeito na eficiência do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar. Os indicadores de eficiência são: a) o rendimento e seletividade no fracionamento dos seus principais constituintes (celulose e hemiceluloses) e b) a posterior conversão da celulose pela hidrólise enzimática.

ii. Identificar condições ótimas de processo com base nas variáveis de maior efeito. Para isso serão geradas superfícies de respostas que relacionam os níveis operacionais das principais variáveis com respostas de eficiência, fracionamento dos componentes celulose e hemiceluloses durante pré-tratamento, conversão enzimática e recuperação global.

1.2 Principais contribuições deste trabalho

Diante da perspectiva de elevada demanda por biomassa para produção de etanol de segunda geração o conhecimento sobre o potencial de uso da palha como matéria-prima e a avaliação experimental de diferentes tipos de processo são de extrema importância. Dentro deste contexto se destacam como principais contribuições desse trabalho:

- Uso da palha de cana-de-açúcar com matéria-prima. Uma vez que a maior parte dos estudos para desenvolvimento do etanol 2G são realizados com bagaço de cana-de-açúcar a disponibilidade de dados do potencial da palha são escassos.

- O processamento da palha de cana-de-açúcar proveniente diretamente do campo e também do processo de enfardamento. Desta forma a matéria-prima foi avaliada da forma que realmente será utilizada em processos de escala industrial, onde quantidade substancial de impurezas minerais são incorporadas à biomassa.

- A experimentação da etapa de pré-tratamento por explosão com vapor em escala de PDU (*“Process Development Unit”*), de forma que os dados gerados estão mais próximo da escala industrial e por esse motivo são mais apropriados para avaliações técnico-econômicas de processo.

- A proposição do Índice de Fracionamento (IF) para avaliar a eficiência de recuperação não somente da fração celulose mais também da fração hemicelulose de forma integrada.

- Planejamento experimental completo em duas etapas. Desta forma foi possível avaliar o efeito de variáveis importantes como umidade e catalizador, além da pressão e tempo que normalmente são investigadas.

- Balanço de massa completo. A partir desse trabalho uma quantidade maior de dados detalhados de rendimentos das diferentes etapas do processo tornam-se disponíveis e podem ser utilizados como benchmark para o aperfeiçoamento do processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

Atualmente, uma das matérias-primas com maior potencial para produção de etanol é a biomassa lignocelulósica, pois além da disponibilidade em grande quantidade em diferentes regiões do globo, o uso dessa biomassa para produção de grandes quantidades de combustíveis para o transporte, em princípio, não interfere no suprimento de alimentos e na biodiversidade.

A biomassa lignocelulósica consiste na parede celular das plantas, a qual é composta principalmente por biopolímeros, como a celulose, que corresponde a 35-50% do total, as hemiceluloses, 20 a 35%, e a lignina, 10-25%. Cinzas e outros componentes menores também estão presentes na biomassa lignocelulósica. Todos esses componentes estão arranjados em um complexo heterogêneo de polímeros de carboidratos e lignina, contendo de 55 a 75% de carboidratos em peso seco (Figura 1) (Cao & Aita 2013; Ojeda et al., 2011; Abud et al., 2013; Singh et al., 2014).

A parede celular é dividida em três camadas; a parede celular primária, não lignificada e mais fina; a parede celular secundária, altamente lignificada e mais espessa; e a lamela média, que é responsável por fornecer suporte às células adjacentes. A estrutura geral da

parede celular contém microfibrilas incorporadas em uma matriz amorfa, resultando em uma estrutura rígida e compacta. As microfibrilas são compostas de celulose, enquanto o material amorfo contém hemiceluloses e lignina. A celulose e as hemiceluloses estão rigorosamente associadas com a lignina, provendo, desse modo, proteção contra a ação de agentes hidrolíticos, tais como as enzimas (Abud et al., 2013).

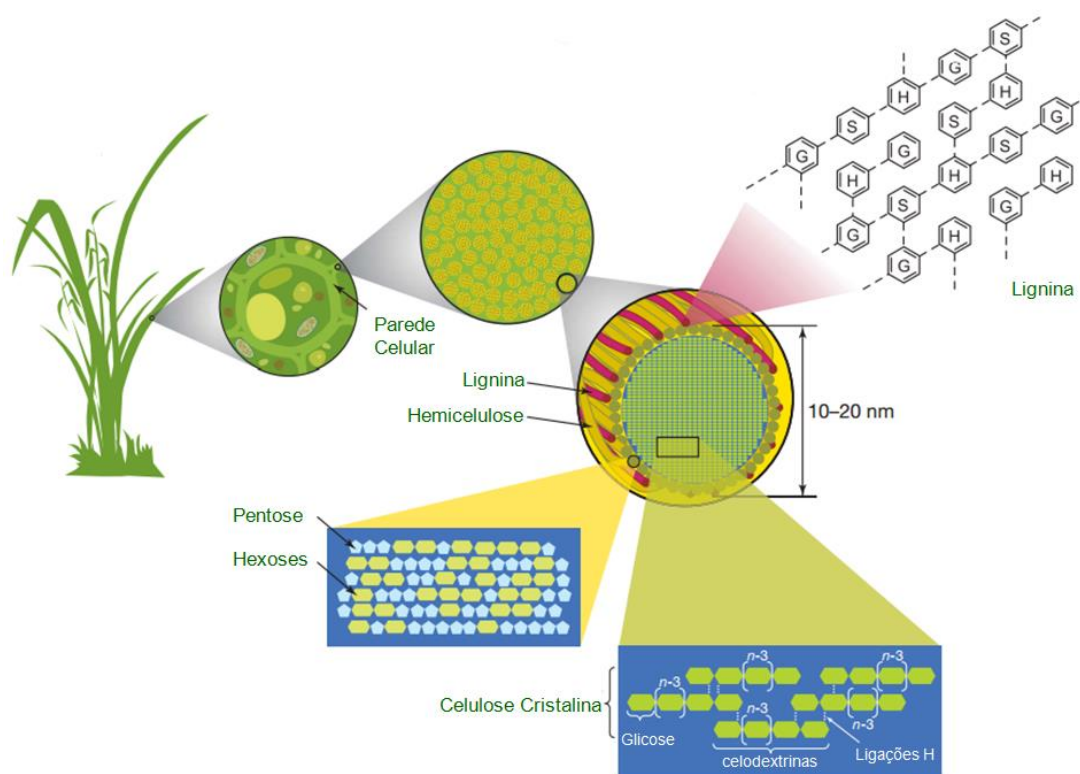


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica (Rubin 2008).

2.1.1 Principais Constituintes

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o principal constituinte estrutural da parede celular. Ele é um homopolímero formado por monômeros de D-glicose ligados por ligações β 1-4, tendo a celobiose (2 unidades de glicose) como unidade construtiva, e possui regiões cristalinas, altamente ordenadas, resistentes à despolimerização e insolúveis em água, e regiões não cristalinas, ou seja, amorfas. Ela é organizada em fibrilas, envolta por hemiceluloses e

lignina, e fornece resistência mecânica e estabilidade química às plantas (Fernando et al., 2012; Singh et al., 2014; Mosier et al., 2005)

As hemiceluloses são outros componentes presentes na biomassa lignocelulósica em quantidades significativas. São heteropolímeros que apresentam compostos de baixo peso molecular e uma mistura de monossacarídeos de 5 (pentoses) e 6 (hexoses) carbonos, como glicose, manose, xilose e arabinose, em uma estrutura aleatória, ramificada e amorfa, que possui pouca força de ligação, sendo, portanto, mais susceptível à hidrólise química, enzimática e ao calor, comparando-se à celulose (Fernando et al., 2012; Singh et al., 2014)

As hemiceluloses formam ligações de hidrogênio com a celulose, ligações covalentes com lignina, principalmente ligações benzil-éter, e ligações éster com acetil e ácidos hidroxicinâmicos, as quais restringem a liberação dos polímeros hemicelulósicos da parede celular, sendo necessário, portanto, seu isolamento (Bian et al., 2012).

As hemiceluloses são fonte potencial de açúcares fermentescíveis, os quais podem dar origem a diversos produtos (Singh et al., 2014).

A lignina ($C_9H_{10}O_2(OCH_3)_n$) é um heteropolímero aromático complexo que apresenta alta estabilidade, e completa a estrutura rígida das paredes celulares de plantas e árvores. Entre os constituintes da biomassa, ela é a mais resistente aos ataques biológicos (Fernando et al., 2012; Jonglertjunya et al., 2014; Singh et al., 2014). Ela fornece rigidez, impermeabilidade e resistência mecânica aos tecidos vegetais, e é a principal responsável pela recalcitrância da biomassa (Ragauskas et al., 2014; Azadi et al., 2013).

Além dos três principais compostos, há outros compostos em menor quantidade, que são extraíveis, tais como as resinas, lipídeos e ácidos graxos, fenóis, fitoesteróis, sais e minerais (Long et al., 2013).

2.2 Biomassas para produção de etanol de segunda geração

Biomassas de diversos tipos têm sido investigadas, ao redor do mundo, como matérias-primas em processos de conversão para uma gama de produtos (Figura 2). Cada região possui uma biomassa característica com maior potencial de aplicação devido a

diversos fatores como, por exemplo, tipo de solo, clima, resistência a pragas entre outros. No Brasil, além do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, o estudo e desenvolvimento da cana energia comparado a outras culturas energéticas merece destaque.



Figura 2: Diversidade de biomassas utilizada em projetos de etanol de segunda geração no mundo: Espiga de milho (A), Palha de Milho (B), Lascas de Madeira (C), Palha de Trigo (D), Palha de Arroz (E) e Palha de Cevada (F).

2.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Entre as diversas biomassas, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes (Figura 3). Somente no Brasil foram produzidas 659 milhões de toneladas de cana-de-açúcar durante a safra 13/14. Em geral 1 tonelada de cana-de-açúcar gera em torno de 140 kg de bagaço (base seca); isso resulta em quantidades expressivas dessa biomassa disponíveis nas biorrefinarias de cana-de-açúcar no Brasil.

Após as mudanças na regulação do mercado da eletricidade que permitiram a venda de bioeletricidade à rede, centrais de cogeração alimentadas com bagaço foram construídas dentro das biorrefinarias proporcionando assim uma nova fonte de renda. No entanto, existem opções de tecnologias em desenvolvimento que podem proporcionar o uso mais eficiente

dessa biomassa, como por exemplo, a geração de eletricidade a partir da gaseificação ou a produção de etanol de segunda geração pela hidrólise enzimática (Dantas et al., 2013).

Algumas vantagens são evidentes quando se compara o bagaço de cana-de-açúcar com outras biomassas, entre elas destaca-se o fato de o bagaço já está disponível dentro da indústria, eliminando custos de transporte, além do fato que depois de processar a cana-de-açúcar nas moendas, o bagaço já é obtido com umidade e tamanho de fibras adequados para o processo. Uma desvantagem dessa biomassa é a quantidade de areia presente, que em média representa em torno de 2 a 4% da biomassa, mas pode alcançar valores superiores a 10%, dependendo das condições de colheita e procedimentos de limpeza da cana-de-açúcar. Estas impurezas causam desgastes nos equipamentos de processo devido à abrasão e também aumentam a capacidade tamponante da biomassa, impedido a ação dos ácidos e reduzindo assim a eficiência na solubilização da hemicelulose. A Figura 3 mostra a forma como o bagaço fica disponível “*in-natura*” após o processamento da cana-de-açúcar.



Figura 3: Bagaço de cana-de-açúcar estocado dentro de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar (arquivo pessoal).

2.2.2 Palha de cana-de-açúcar

A definição de palha diverge dependendo da área de especialidade e da literatura consultada, podendo ser chamada também de palhiço ou palhada. Na indústria das biorrefinarias de cana-de-açúcar o mais comum é considerar a palha como a massa orgânica formada por folhas verdes, folhas secas e ponteiros da cana-de-açúcar (Figura 4).

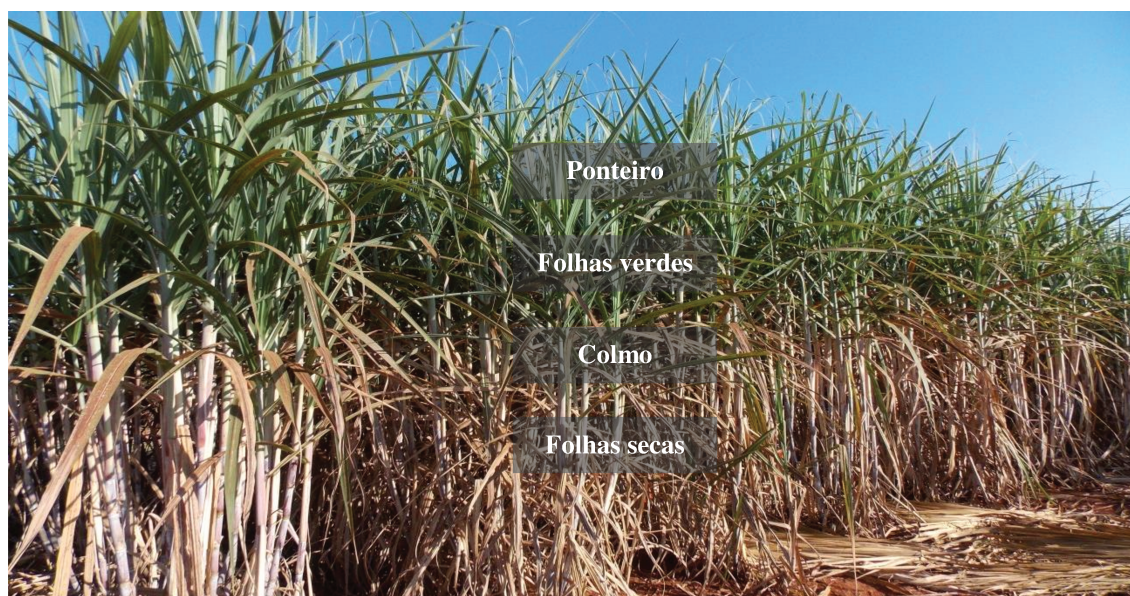


Figura 4: Partes que constituem a palha de cana-de-açúcar (arquivo pessoal).

Durante muito tempo a palha foi queimada nos canaviais com o objetivo de facilitar as operações de corte, carregamento e transporte da cana-de-açúcar. Contudo, aspectos legais, ambientais e econômicos induziram a mecanização da colheita, que dispensa a prática da queima. Reforçando este processo de mecanização, uma série de programas e legislações foram estabelecidas. No estado de São Paulo, por exemplo, em 2007, ficou acordado no Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro que 100% das áreas mecanizáveis (declividade de até 12%) deveriam eliminar a queima até 2014, e no caso das áreas não mecanizáveis (declividade superior a 12%), o prazo para eliminar por completa a queima é 2017 (Leal et al., 2013).

Com a eliminação da queima cerca de 140 kg de palha (base seca) por tonelada de cana-de-açúcar é disponibilizada no campo e se considerada a produção atual de cana-de-açúcar cerca de 92 milhões de toneladas de palha são produzidos no Brasil. Estudos agronômicos demonstram que o excesso de palha deixada no campo afeta a umidade e temperatura do solo, favorece a proliferação de parasitas e acarreta em prejuízos para a cultura; contudo, sua total remoção impacta na fertilidade e retenção de água do solo, e pode torná-lo mais susceptível à erosão. Dessa forma é importante manter parte da palha no campo e a estimativa é que essa quantidade seja entre 30 a 50% da palha produzida. Consequentemente cerca de 50 a 70% pode ser removida e utilizada para cogeração de energia ou produção de etanol de segunda geração (Leal et al., 2013; Oliveira et al., 2013).

Um dos principais desafios para uso da palha é o transporte dessa biomassa do campo para a indústria a custos competitivos. Nos últimos anos foram testadas diferentes alternativas, como por exemplo, levar a palha juntamente com a cana-de-açúcar; no entanto, a baixa densidade da palha inviabiliza esse tipo de operação. O enfardamento da palha é a rota que atualmente apresenta melhor viabilidade técnico-econômica e já é praticado em alguns projetos em escala industrial. Nessa rota, a palha é adensada através de máquinas, chamadas enfardadoras, e o fardo resultante pode alcançar em torno de 230 kg/m³ (Figura 5).



Figura 5: Máquina enfardadora de palha de cana-de-açúcar (GranBio 2014).

2.2.3 Culturas Energéticas dedicadas à biomassa

O termo “Culturas Energéticas” ou em inglês “*Energy Crops*” é usado para se referir às culturas que são cultivadas exclusivamente com a finalidade de produzir biomassa lignocelulósica, não sendo destinada, portanto, à alimentação. Inicialmente, elas foram desenvolvidas para serem usadas em processos de combustão e conversão térmica; entretanto, como oferecem altos rendimentos, ou seja, massa de biomassa por hectare, elas se tornaram fontes de grande interesse para a produção de biocombustíveis de segunda geração (Koçar & Civaş 2013; Rahman et al., 2014).

Estas culturas são, principalmente, as gramíneas perenes e as árvores de rápido crescimento. Dentre as gramíneas perenes, as principais usadas como culturas energéticas são o *Miscanthus*, *Switchgrass* e, mais recentemente, uma variedade especial de cana-de-açúcar que está sendo chamada de “Cana Energia” (Kim & Day 2011; Atkinson 2009).

Miscanthus é uma cultura perene, possui mecanismo bioquímico C4 para fixação do carbono, originária da Ásia, da família *Poaceae*, pertencente à tribo *Andropogoneae*, a qual inclui o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar. Nos últimos 5 – 10 anos, a espécie *Miscanthus*

foi avaliada como uma fonte potencial para a produção de energia, pois possui rendimentos elevados de material lignocelulósico (Atkinson 2009; de Souza et al., 2013). A taxa fotossintética da espécie *Miscanthus* é cerca de $20 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; esse rendimento fotossintético resulta em maiores taxas de crescimento da planta – para plantas C4, $50 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, comparado com as C3, $30\text{-}40 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Esta capacidade também implica em uma maior captura de radiação solar, que pode ser melhorada em temperaturas mais elevadas. Com essas características, a produção de energia a partir dessa fonte é uma das maiores, comparadas com outras fontes de energia renováveis (Głowacka 2011; W. Zhang et al., 2013).

A relação da energia da espécie *Miscanthus* é cerca de 1:32 maior que a de qualquer cultura agrícola atual, como, por exemplo, o trigo. Portanto, essa espécie é uma fonte muito atraente para a geração de energia renovável, e além de possui elevado rendimento é de fácil cultivo, e tem baixa exigência de nutrientes, como o nitrogênio (Atkinson 2009).

Switchgrass é uma planta perene, C4, de clima quente, nativa da América do Norte. Embora seja de clima quente, é tolerante ao frio, e isso possibilita a existência de diversas culturas adaptadas em várias regiões da América do Norte. Essa espécie foi identificada como uma cultura energética, e é uma promessa no setor de bioenergia, pois apresenta alta produtividade, adequação a qualidade do solo de cultivo, baixa exigência de água e nutrientes, benefícios ambientais e flexibilidade de uso (Keshwani & Cheng 2009).

A Cana Energia tem sido desenvolvida a partir do cruzamento da cana-de-açúcar tradicional com seus parentes silvestres ou com outras espécies do gênero *Miscanthus* e *Erianthus*. Normalmente esses não têm a capacidade de acumular níveis tão elevados de açúcar, como a cana-de-açúcar cultivada; contudo apresentam características desejáveis, como a resistência a doenças e a tolerância ao frio. Portanto, com o cruzamento, se obtém um híbrido que apresenta maior teor de fibra, e melhor tolerância ao frio (Knoll et al., 2013).

Dois tipos de cana energia estão atualmente em desenvolvimento. A cana energia tipo I é selecionada e cultivada a fim de maximizar tanto os açúcares presentes, quanto as fibras.

No início do desenvolvimento acreditava-se que com o uso de genótipos voltados à produção de biomassa, e com o uso integral da planta, inclusive o topo e as folhas da planta, poderia aumentar o rendimento da biomassa em até 2 ou 3 vezes mais, o que deu origem as pesquisas de desenvolvimento desse tipo de cana-de-açúcar (Fedenko et al., 2013; Knoll et al., 2013).

A cana energia tipo I apresenta teor de açúcar semelhante às culturas tradicionais, aproximadamente 130 g/kg de massa fresca, e o que a diferencia é a maior fração de fibras, cerca de 170 g/kg de massa fresca. Desse modo, observa-se que esse tipo tem o propósito de produzir biomassa lignocelulósica, além do açúcar, para gerar etanol, maximizando seu rendimento (Knoll et al., 2013).

A cana energia tipo II é definida como a cana que é selecionada e cultivada visando obter principalmente (ou somente) fibras; desse modo, se torna uma grande fonte de matéria-prima para gerar eletricidade e produzir etanol celulósico. Elas apresentam um teor relativamente baixo de açúcares, sendo cultivadas visando à obtenção de biomassa lignocelulósica. Na base seca, apresentam somente 50 g/kg de açúcares, e cerca de 300 g/kg de fibras, teor bem mais elevado que o presente na cana energia tipo I (170 g/kg), e na cultura tradicional (120 g/kg). Além disso, esse tipo é o que apresenta o menor teor de água, o que lhe rende cerca de 860 g/kg de fibra na massa seca (Khan et al., 2013; Knoll et al., 2013).

Na Figura 6 são apresentadas as diferenças na composição dos três tipos de cana-de-açúcar.

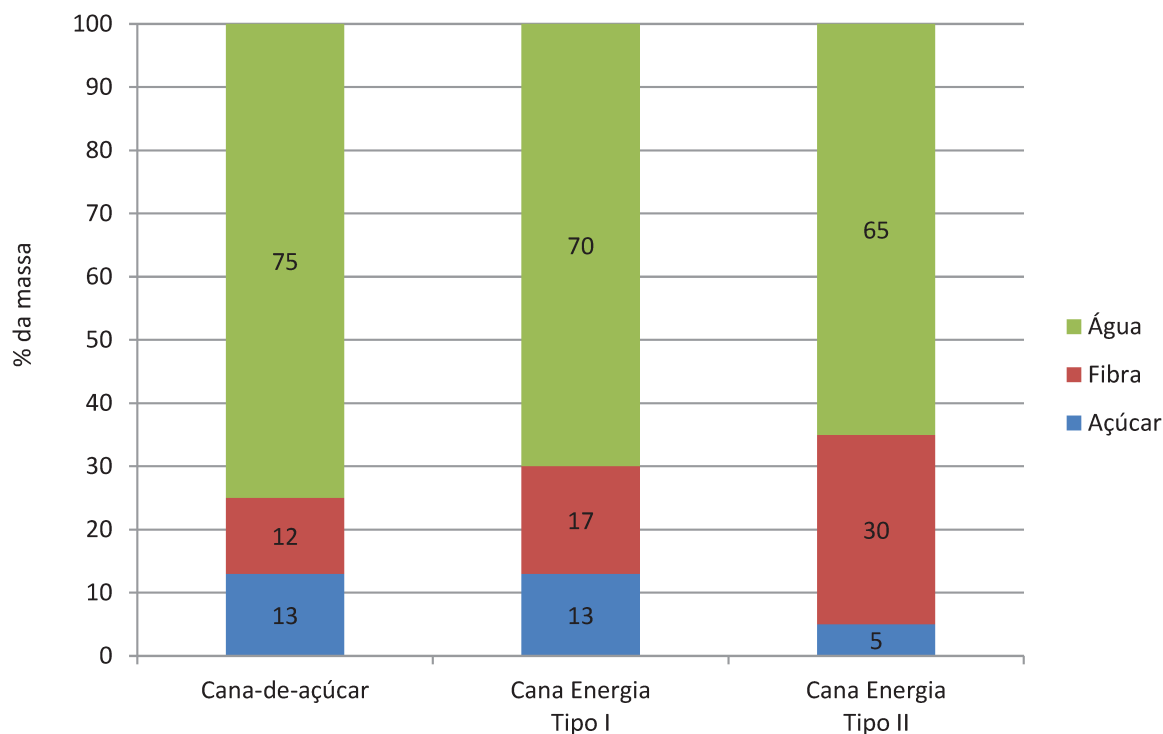


Figura 6: Composição da cana-de-açúcar, cana energia tipo I e cana energia tipo II. Adaptado de Tew & Cobill, 2008.

2.3 Etapas do processo de produção de etanol de segunda geração

O processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos envolve três principais etapas: o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, o qual permite a conversão da estrutura recalcitrante em intermediários celulósicos reativos; a hidrólise enzimática da celulose, a qual é responsável por hidrolisar os intermediários obtidos no pré-tratamento em açúcares fermentáveis; e, por fim, a fermentação, que produz etanol celulósico a partir dos açúcares presentes (Singh et al., 2014; Biswas et al., 2014).

2.3.1 Pré-tratamento

O objetivo desta etapa é romper a estrutura da parede celular, pela solubilização das hemiceluloses e da lignina, a fim de tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática (Figura 7). Um pré-tratamento eficaz provoca redução no tamanho das partículas, aumento da área superficial (porosidade), redução na cristalinidade da celulose, quebra das hemiceluloses, e redistribuição da lignina sem que se tenha a formação de produtos que inibam a ação microbiana na fermentação do etanol. Desse modo, é necessário otimizar os parâmetros do processo, especificamente para cada tipo de matéria-prima, com o propósito de melhorar a eficiência do mesmo (Amiri et al., 2013; Biswas et al., 2014; Njoku et al., 2013; Mosier et al., 2005)

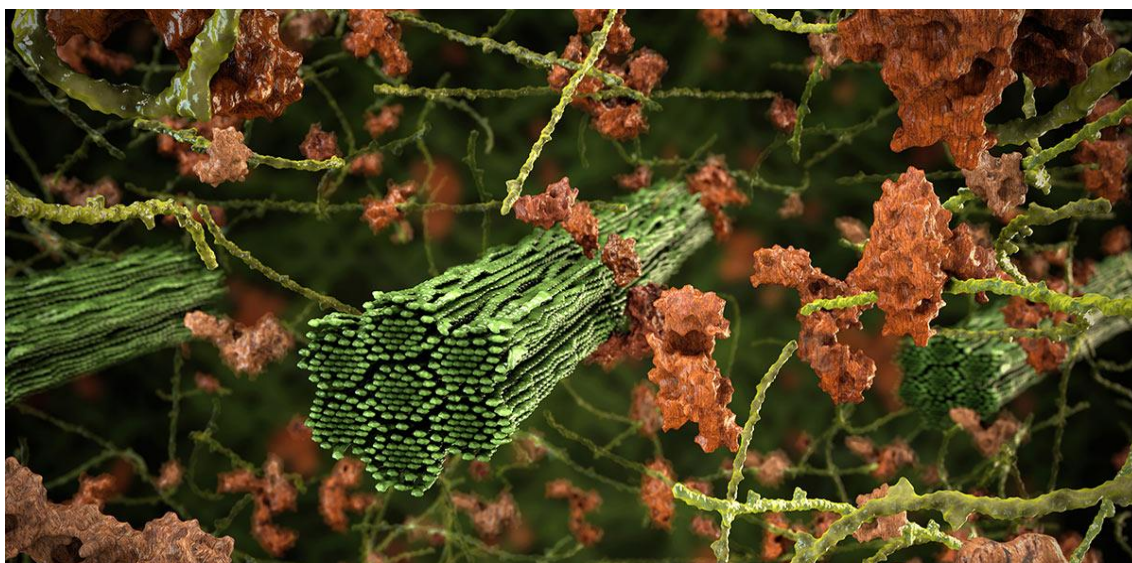


Figura 7: Ilustração do efeito do pré-tratamento na fibra de biomassa: As microfibrilas de celulose (em verde) expostas após remoção das hemiceluloses, porém com partes de lignina (em marrom) presas na sua estrutura. (Thomas Splettstoesser 2014).

O pré-tratamento é uma etapa que exerce grande influência nas etapas subsequentes, caso não seja adequado causa, principalmente, baixa taxa de hidrólise enzimática e resulta em compostos inibidores da etapa de fermentação. Além disso, estudos demonstram que a etapa de pré-tratamento é uma das que exigem maiores investimentos, sendo responsável por até 40% do investimento total (Singh et al., 2014; Biswas et al., 2014; Kuhad et al., 2011)

Existem diversos processos de pré-tratamento, alguns em estágio de desenvolvimento mais avançado e, portanto mais competitivos no curto prazo, e outros em estágios mais iniciais de desenvolvimento, com potencial de serem competitivos a longo prazo. Os processos são em geral divididos em físicos, químicos, térmicos, termoquímicos, biológicos e mesmo uma combinação deles (Njoku et al., 2013; Biswas et al., 2014). Alguns processos bem conhecidos de pré-tratamento são explosão com vapor; processo hidrotérmico catalisado ou não; hidrólise ácida; pré-tratamento alcalino, e mais recentemente tem sido demonstrado o potencial dos líquidos iônicos para pré-tratamento. Existe um consenso na comunidade científica de que não existirá um único pré-tratamento que será aplicado para todos os tipos de biomassa e objetivos. Ao invés disso, diferentes pré-tratamentos ou combinações de diferentes pré-tratamentos serão utilizados de acordo com necessidades específicas. Por exemplo, pré-tratamentos diferentes serão utilizados para: (a) obtenção de produtos de baixo valor econômico e grande quantidade de produção (*commodities*), em comparação com (b) produtos de alto valor agregado e baixo volume de produção (especialidades químicas) (Saddler & Kumar 2013).

2.3.1.1 Explosão com Vapor

Há diversos métodos de pré-tratamento empregados na atualidade; entre esses, o de explosão com vapor tem demonstrado ser eficiente para diferentes materiais lignocelulósicos, incluindo o bagaço de cana (Oliveira et al., 2013; Soares et al., 2011; Aguiar et al., 2013).

O pré-tratamento por explosão com vapor é um método que combina ruptura mecânica e ações químicas, consistindo no aquecimento da biomassa com vapor saturado, seguido de uma descompressão súbita do sistema pressurizado. No processo, são empregadas temperaturas entre 180 a 240°C e pressões em torno de 5 a 20 kgf/cm², por um tempo de reação que varia de 2 a 30 minutos, podendo ser realizado na presença ou não de um catalisador. Durante a reação, o vapor penetra no material lignocelulósico, e, em seu interior, ele se condensa, formando água líquida. Após a reação, se segue uma descompressão explosiva, onde a água é rapidamente evaporada, gerando a destruição da estrutura da biomassa. O processo causa a hidrólise parcial de hemiceluloses e lignina, e a desfibrilação dos feixes de celulose, que resulta no aumento da acessibilidade pelas enzimas nessas

estruturas, facilitando a hidrólise e posterior fermentação (Singh et al., 2014; Aguiar et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Chen et al., 2014).

O processo pode ser compreendido por duas etapas, a auto hidrólise e a descompressão. Na primeira, a alta temperatura promove a formação de ácido acético a partir de grupos acetila ligados às hemiceluloses, o que culmina na hidrólise destas. A segunda etapa, a fase de descompressão, causa a redução do tamanho das partículas da biomassa, aumentando o acesso enzimático à celulose (Rocha et al., 2012). Estudos sugerem que a eficiência do processo se relaciona com diversos fatores, tais como a temperatura empregada, o tempo ao qual a biomassa fica submetida às condições do tratamento, o tamanho da partícula e o teor de umidade (Talebnia et al., 2010; Liu et al., 2013; Zhang et al., 2012).

O pré-tratamento da biomassa por explosão com vapor apresenta algumas vantagens em relação aos outros. As principais vantagens são a menor utilização de produtos químicos perigosos, à sua alta eficiência no uso de energia, e o baixo impacto ambiental. Entretanto, o processo apresenta também algumas desvantagens como a formação de produtos químicos tóxicos, e a ruptura incompleta da lignina durante o processo (Rocha et al., 2012).

O uso de catalizadores para melhorar a eficiência do pré-tratamento por explosão com vapor já foi bastante investigado. Após análise dos resultados reportados na literatura é possível evidenciar que os catalizadores provocam uma maior solubilização das hemiceluloses em condições de baixa severidade, desta forma uma fração maior das hemiceluloses são recuperadas na fração líquida na forma de açúcares monoméricos. Entre os catalisadores ácidos mais empregados podemos citar o SO_2 que por sua forma gasosa permite melhor homogeneização com a biomassa e em contato com a água (umidade da biomassa ou vapor condensado) reage para formar o ácido sulfuroso que é menos corrosivo para os equipamentos quando comparado com outros ácidos mais fortes como o ácido sulfúrico, por exemplo. No entanto, o custo do catalizador ainda é uma desvantagem quando comparado com o processo autocatalítico. Outros ácidos citados são o CO_2 e o ácido fosfórico (H_3PO_4), o primeiro por ser encontrado disponível dentro das biorrefinarias de cana-de-açúcar, como resultado da fermentação para produção do etanol, parece ser uma vantagem, porém, a necessidade de concentrar e a maior dificuldade de impregnação são características que diminuem sua atratividade. Já o ácido fosfórico (H_3PO_4) pode ser impregnado na

biomassa mais facilmente e seu uso também resulta em maiores teores de fósforo, considerado nutriente importante para a fermentação. Nesse caso o custo associado é o principal fator limitante para seu uso (Söderström et al., 2002; Ramos 2003; Macrelli et al., 2012; Aguiar et al., 2013).

2.3.1.2 Processo Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico consiste em submeter o material lignocelulósico a altas temperaturas (150 a 230°C) e pressão, baseado na presença de água (na forma líquida ou de vapor), incluindo o uso de catalisador ou não, com o propósito de transformar os polissacarídeos em moléculas de baixo peso molecular, que sejam solúveis em água (Duarte et al., 2012; Boussarsar et al., 2009; Ruiz et al., 2013).

As principais desvantagens do processo são o elevado consumo de energia; a formação de subprodutos, como ácidos carboxílicos (principalmente ácido acético e fórmico), formados pela oxidação e fragmentação dos polissacarídeos; formação de furfural e hidroximetilfurfural por meio da reação de desidratação da glicose e xilose, e o risco de diluir as soluções de açúcar (Duarte et al. 2012). E suas vantagens, quando o processo não catalisado é utilizado, se concentram na prevenção da corrosão e ausência da necessidade de uma etapa de neutralização, quando comparado com métodos que utilizam ácidos (Boussarsar et al., 2009).

2.3.1.3 Hidrólise Ácida Diluída

Esse método envolve a mistura da biomassa lignocelulósica com os ácidos diluídos, os quais são submetidos a um processo de aquecimento, a uma temperatura moderada. Com o objetivo de aquecer a mistura, outro método pode ser utilizado, como o aquecimento por micro-ondas, onde há conversão de energia eletromagnética em energia térmica. Esses processos aceleram a hidrólise da estrutura cristalina presente na biomassa (Chen et al., 2012).

A utilização de ácidos diluídos na etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica leva à hidrólise das hemiceluloses e da celulose amorfa, gerando alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Entre os processos utilizando ácidos diluídos, o com

ácido sulfúrico tem sido considerado como um dos mais rentáveis. No entanto, a exigência de equipamentos fabricados com materiais mais nobres para suportar as condições ácidas é uma desvantagem desse tipo de processo além dos subprodutos de degradação da biomassa (Chen et al., 2012; Jiang et al., 2013).

2.3.1.4 Pré-tratamento alcalino

Este método, assim como a hidrólise ácida, utiliza reagente diluído (soluções alcalinas diluídas), em condições moderadas e controladas, o que provoca a redução da cristalinidade da celulose, perturbações na estrutura da lignina, e quebra das ligações lignina-carboidrato. O principal efeito desse processo é a remoção da lignina presente na biomassa lignocelulósica, aumentando a reatividade dos polissacarídeos restantes, além de remover os grupos acetil e os ácidos urônicos das hemiceluloses. Os reagentes mais comuns são o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou amônia (Chen et al., 2012; Khuong et al., 2014).

Em alguns casos o pré-tratamento alcalino é utilizado como uma segunda etapa de processo após a biomassa ser submetida a um pré-tratamento com ácido diluído, por exemplo. Nesses casos a hidrólise enzimática da celulose é favorecida, porém muitas vezes o rendimento final de glicose é inferior, quando comparado com o pré-tratamento em uma etapa, devido às perdas acumuladas pela inclusão de mais uma etapa de pré-tratamento (Wanderley et al., 2013; Guo et al., 2013).

2.3.1.5 Líquidos Iônicos

O pré-tratamento com líquidos iônicos pode ser considerado um pré-tratamento avançado, seu desenvolvimento é relativamente recente quando comparado a outros tipos de processo. Em contato com o líquido iônico a biomassa pode ser completamente dissolvida sob condições suaves de temperatura (Perez-Pimienta et al., 2013). Líquidos iônicos são sais iônicos que apresentam baixo ponto de fusão (geralmente abaixo de 100°C), conhecidos como solventes “verdes” (Zhu et al., 2012).

Esse método apresenta várias vantagens em relação aos outros. Entre elas se destaca a temperatura requerida no processo, que é inferior à de outros, e a utilização de reagentes e processos químicos menos nocivos. Entretanto, outros pontos também são considerados,

como sua alta polaridade, grande poder solvente, baixa volatilidade e o fato de não ser inflamável (Qiu & Aita 2013; Sun et al., 2013).

Esse método envolve a mistura do material lignocelulósico ao solvente, na proporção determinada, em condições adequadas de tempo e temperatura. Assim, pode-se obter uma dissolução parcial ou completa da biomassa lignocelulósica. Após a dissolução, é realizada a regeneração da biomassa, utilizando líquidos como água, acetona, diclorometano. O resultado é uma biomassa constituída principalmente por carboidratos (Zhu et al., 2012).

O custo do líquido iônico ainda é elevado; nesse caso os processos em desenvolvimento buscam reutilizar o mesmo para diminuir seu consumo (Lopes et al., 2013). No entanto, um grande entrave à introdução desse processo em larga escala é a toxicidade do líquido iônico tanto para as enzimas que realizam a hidrólise da celulose quanto para os microrganismos necessários para fermentação dos açúcares produzidos a partir da biomassa por meio desse processo; por isso, uma etapa de lavagem é necessária para remover o líquido iônico após o pré-tratamento, o que, em larga escala, torna o processo inviável. Para contornar o efeito tóxico pesquisas estão em desenvolvimento com o objetivo de identificar coquetéis enzimáticos e microrganismos tolerantes ao líquido iônico residual no meio (Ruegg et al., 2014; Shi et al., 2013).

Para superar a questão da inibição das enzimas pelo líquido iônico os pesquisadores do *Joint BioEnergy Institute* (JBEI), ligado ao Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE), desenvolveram um coquetel de enzimas tolerante tanto ao líquido iônico quanto ao calor. O caminho seguido na pesquisa foi a exploração de bactérias termófilas, que, ao contrário dos fungos filamentosos normalmente utilizados para produção de enzimas, são capazes de se desenvolver em altas temperaturas e também em condições alcalinas. Essas enzimas foram testadas posteriormente para desenvolver um processo que integra pré-tratamento e hidrólise enzimática em apenas uma etapa, ou seja, uma vez que essas enzimas toleram até 20% de líquidos iônicos no meio reacional, a hidrólise enzimática pode ser realizada simultaneamente ao pré-tratamento em um mesmo equipamento, resultando em um salto significativo em direção a viabilidade técnica econômica dessa tecnologia (Shi et al., 2013).

Pesquisadores do *Joint BioEnergy Institute* (JBEI) seguiram em frente no desenvolvimento também de soluções para superar a inibição da fermentação pelo líquido iônico residual. Nesse caso o estudo realizado identificou a origem genética da resistência microbiana aos líquidos iônicos, sendo identificados dois genes em *Enterobacter lignolyticus*, uma bactéria que vive no solo e é tolerante aos líquidos iônicos. Então, o gene isolado foi introduzido a uma cepa da bactéria *Escherichia coli* para alcançar altos níveis de produção de etanol. Ao transferir esse gene as cepas de *E. coli*, esta adquire a capacidade de crescer bem mesmo na presença de concentrações tóxicas de líquidos iônicos (Ruegg et al., 2014).

2.3.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é uma etapa essencial para a produção de etanol celulósico dentro da rota biotecnológica, que pode ser considerada a mais proeminente para a conversão da biomassa em açúcares monoméricos, os quais são posteriormente fermentados para produção de bioetanol (Zhang & Wu 2013; Dyk & Pletschke 2012). Comparada à hidrólise ácida, a enzimática apresenta inúmeras vantagens, motivo pelo qual é amplamente empregada; entre essas, podem ser apontadas as temperaturas requeridas, que são menores que as necessárias para a hidrólise ácida, e a menor formação de subprodutos; contudo, a vantagem que apresenta maior destaque é a obtenção de altos rendimentos de produção sob condições moderadas de processo (Zhang et al., 2013; Newman et al., 2013).

A hidrólise enzimática da biomassa envolve várias etapas e ocorre em um sistema heterogêneo, no qual a celulose insolúvel é inicialmente quebrada, na interface sólido-líquido, pela ação de enzimas. Essa degradação inicial é seguida por uma hidrólise em fase líquida dos intermediários solúveis, tais como os celuloligossacarídeos curtos e as celobioses, que são clivados pela β -glicosidase para produção de glicose (Andrić et al., 2010). A degradação dos carboidratos da biomassa envolve a utilização de várias enzimas, também conhecidos como “coquetel enzimático”, as quais atuam em sinergia, ou seja, a atividade das mesmas em conjunto é superior à soma das atividades individuais.

Embora o processo envolva grande número de enzimas, de diferentes classes, como por exemplo, celulasas, hemicelulasas, ligninases, entre outras, geralmente três são necessárias para degradar a celulose em glicose, sendo a $\text{exo-1,4-}\beta$ glucanase (celobiohidrolase), a $\text{endo-1,4-}\beta$ -glucanase e as β -glicosidades (celobioses). As $\text{exo-1,4-}\beta$ -glucanases atacam as extremidades não-redutoras da cadeia de celulose, dando origem as celobioses; as $\text{endo-1,4-}\beta$ -glucanases atuam no interior da cadeia, reduzindo o grau de polimerização, sendo responsáveis por hidrolisar aleatoriamente as ligações β -1,4 da macromolécula; e as β -glicosidases convertem os oligossacarídeos, tais como a celobiose, em monômeros de glicose (Das et al., 2011).

Diversos fatores podem alterar a eficácia do processo de hidrólise enzimática, como a concentração do substrato, a atividade da celulase e as condições de reação, como pH e temperatura (Biswas et al., 2014).

As concentrações de enzima e substrato são os principais fatores que interferem na produção e taxa de hidrólise enzimática da celulose. Em relação ao substrato, quando se tem baixa concentração, um incremento resulta em aumento na taxa de produção e hidrólise até certo ponto, pois altas concentrações podem gerar inibição do substrato, reduzindo a velocidade de reação. Além disso, a susceptibilidade do substrato depende das suas características, tais como sua cristalinidade, grau de polimerização, área superficial e teor de lignina. Em relação à atividade da enzima (celulase), se tem que ao incrementar sua concentração, se obtém maiores taxas de hidrólise; entretanto, há um aumento substancial no custo do processo. As concentrações enzimáticas comumente utilizadas variam de 7 a 33 FPU/g de substrato (Modenbach & Nokes 2013; Zhang & Wu 2013).

As enzimas apresentam especificidades quanto às condições em que atuam nos processos, como pH e temperatura, as quais devem ser identificadas e otimizadas para se obter um elevado nível de hidrólise dos substratos. Quando as condições empregadas não são ideais, o processo exigirá o uso de maior quantidade de enzimas, o que se reflete na elevação dos custos (Dyk & Pletschke 2012). As celulasas obtidas a partir de fungos filamentosos geralmente apresentam pH ótimo na faixa de 3,6 a 5,0 (ácida), enquanto algumas bactérias podem produzir enzimas resistentes a condições extremas de alcalinidade. Em relação à

temperatura, a faixa de 40 a 50°C é normalmente empregada como condição ótima para a ação das celulasas (Castro & Castro 2012).

Além desses fatores, atualmente, estão sendo desenvolvidas pesquisas quanto ao teor de sólidos presentes no processo de hidrólise; isto é, a relação da quantidade de biomassa e da água. Como é um meio de tornar o processo de produção mais viável economicamente, grande foco tem sido concentrado nos processos que empregam alta carga de sólidos, ou seja, que apresentam pouca ou nenhuma água livre. A hidrólise nestas condições apresenta como principal vantagem a maior concentração de açúcares, que resulta em obtenção de maiores concentrações de etanol; deste modo, o consumo de energia e os custos associados ao processo de destilação podem ser reduzidos. Além disso, como é necessária a adição de menor quantidade de água, há ainda maiores reduções dos custos, devido ao menor volume de água a ser descartado e tratado, o que constitui outra vantagem do processo. Um processo pode ser considerado de alto teor de sólidos se apresentar cerca de 15% de sólidos (Modenbach & Nokes 2013; Toquero & Bolado 2014).

2.4 Desenvolvimento de processos para produção de etanol de segunda geração utilizando palha de cana-de-açúcar como matéria-prima.

Rocha et al., (2012) estudaram o efeito do pré-tratamento e deslignificação na sacarificação enzimática da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, além do pseudocaule de bananeira como biomassa alternativa, objetivando a produção de etanol. Na ocasião foram investigados o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4) seguido de deslignificação com hidróxido de sódio (NaOH) e o pré-tratamento hidrotérmico. O bagaço apresentou conversão máxima (89,2%) pouco superior à alcançada com a palha (85%). Isso mostra que a palha é uma biomassa promissora para uso na produção de etanol.

Mais recentemente, Oliveira et al., (2013) deram continuidade aos trabalhos desenvolvidos por Rocha et al. (2012), avaliando em escala industrial (2,5 m³), o pré-tratamento por explosão com vapor, e em escala piloto (20 L) o pré-tratamento com ácido diluído da palha de cana-de-açúcar, ambos seguidos de deslignificação alcalina. Como resultado foi evidenciada maior conversão enzimática para a palha pré-tratada por explosão a vapor, alcançando 80%, e um acréscimo de mais 5% foi obtido após a etapa de

deslignificação. Os rendimentos das etapas de pré-tratamento podem ser avaliados juntamente com as conversões de hidrólise objetivando uma resposta mais integrada do processo.

Ainda em 2010, a comunidade europeia, por meio do FP7 (Seventh Framework Programme), viabilizou um estudo conjunto entre universidades e empresas, do Brasil e do exterior, com objetivo de desenvolver pesquisas na área de conversão de biomassa para produção de etanol, a partir das biomassas bagaço e palha de cana-de-açúcar. Durante dois anos todas as principais etapas do processo foram investigadas, desde a caracterização minuciosa da biomassa, passando pelo pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação, até a simulação do processo integrado com a usina de cana-de-açúcar atual. Os estudos mostraram que a palha é mais facilmente hidrolisável quando comparada com o bagaço, e a integração dos processos traz vantagens significativas para a viabilidade (Macrelli et al., 2012).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Todas as etapas experimentais descritas a seguir, desde a coleta e preparação da biomassa, passando pelas etapas de caracterização, pré-tratamento, hidrólise enzimática e finalizando com as análises dos produtos e subprodutos foram realizadas nas dependências do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em maior parte na planta piloto do projeto Etanol de Biomassa. Na (Figura 8) é apresentado o fluxograma com as principais etapas do desenvolvimento do processo.

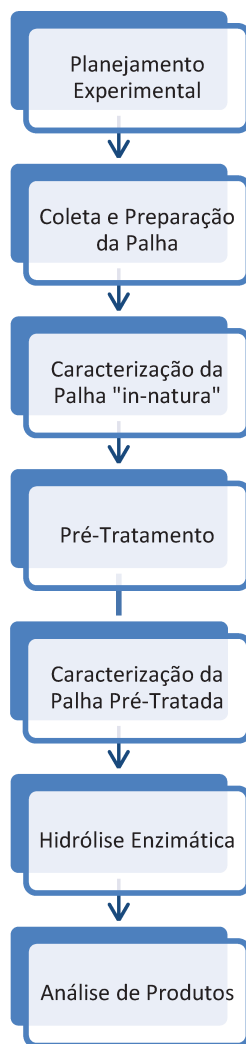


Figura 8: Fluxograma das principais etapas do desenvolvimento do processo.

3.1 Planejamento experimental

O Planejamento Experimental foi estruturado em duas etapas, conforme apresentado na Figura 9.

Na ETAPA I buscou-se identificar as variáveis de maior efeito na recuperação de glicose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Para isso foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com 4 pontos centrais.

Posteriormente, na ETAPA II, foi realizado um planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com o objetivo de identificar a condição ótima do processo a partir da superfície de resposta gerada com base nas variáveis de maior efeito investigadas na ETAPA I.

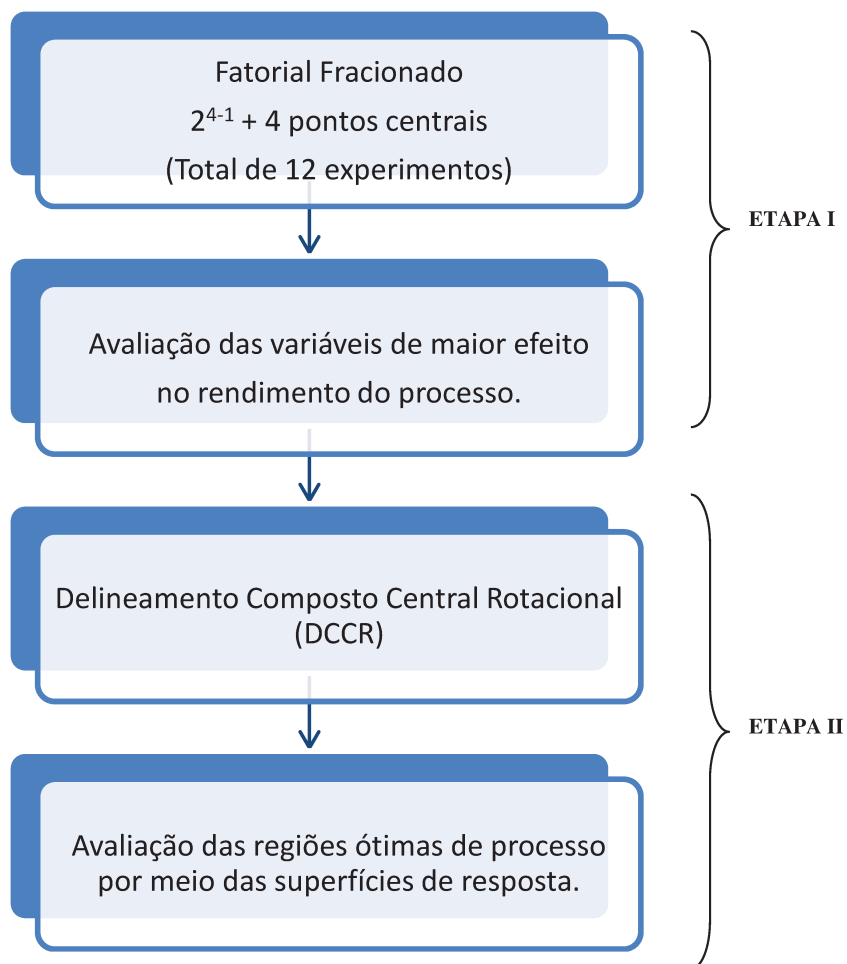


Figura 9: Diagrama ilustrativo das etapas do planejamento experimental.

Nas Tabela 1 e Tabela 2 são apresentados os níveis investigados para cada uma das variáveis e a matriz de planejamento completa para o planejamento Fatorial Fracionado da ETAPA I.

Tabela 1: Níveis investigados para cada uma das variáveis.

4 Fatores	3 Níveis		
	-1	0	1
Pressão (kgf/cm²) (Temp.)*	12 (188°C)	15 (198°C)	18 (207°C)
Tempo (min)	4	6	8
Umidade (%)	10	30	50
Catalisador (%m/m)**	0	2	4

*Temperatura de equilíbrio do vapor na pressão investigada.

**Percentual em relação à massa seca da biomassa (Palha de cana-de-açúcar).

Tabela 2: Matriz de planejamento completa para o planejamento Fatorial Fracionado.

Ensaio	Pressão (Kgf/cm ²)	Tempo (min)	Umidade (%)	Catalisador (% m/m)
1	12	4	10	0
2	18	4	10	4
3	12	8	10	4
4	18	8	10	0
5	12	4	50	4
6	18	4	50	0
7	12	8	50	0
8	18	8	50	4
9	15	6	30	2
10	15	6	30	2
11	15	6	30	2
12	15	6	30	2

A avaliação estatística dos dados experimentais foi realizada utilizando o software *STATISTICA 12* da StatSoft.

3.2 Equipamentos

- Analisador de umidade por infravermelho IV 2002 da marca Gehaka;
- Autoclave vertical modelo 103 da marca Fabber Primar;
- Agitador mecânico modelo 713 da marca Fisatom;
- Balança analítica modelo AX 200 da marca Shimadzu com precisão de $\pm 0,0001$ g;
- Balança semi-analítica modelo DG15 da marca Degimed com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostatzado customizado da marca Adamo com precisão de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$;
- Bomba de vácuo modelo MA 057/3 da marca Marconi;
- Centrifuga modelo 206 da marca Fanem;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) da Waters, com injetor automático, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 2414 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Em power 3;
- Espectrofotômetro UV DR5000 da marca Hach;
- Estufa com circulação e renovação de ar modelo 320-SE da marca Fanem;
- Medidor de pH modelo 827 da marca Metrohm, com precisão de 0,01;
- Moinho de facas modelo MGHS 10/300 da marca SEIBT;
- Mufla da marca Quimis.

3.3 Coleta e preparo da palha de cana-de-açúcar

A Palha de cana-de-açúcar utilizada no planejamento fatorial foi coletada manualmente nas proximidades do Centro de Tecnologia Canavieira, em Piracicaba-SP, em setembro de 2010, um dia após a colheita mecanizada da cana-de-açúcar (Figura 10). Após a coleta, a palha foi picada, utilizando moinho de facas, marca SEIBT, modelo MGHS 10/300 (Figura 11), com o objetivo de propiciar maior homogeneidade no tamanho das partículas (Figura 13 e Figura 14) e alcançar um maior adensamento dentro do reator. Durante o procedimento de picagem foram removidos manualmente pedaços remanescentes de cana-de-açúcar (Figura 12).

Para ajuste da umidade, de acordo com os percentuais estabelecidos no planejamento experimental, para cada experimento, 3,0 kg de palha foram espalhados numa lona plástica e adicionou-se, utilizando-se um regador (Figura 15), a massa de água previamente calculada. Em seguida foi realizada homogeneização da biomassa umedecida e acondicionamento em sacos plásticos fechados para conservação da umidade até o momento da carga no reator de pré-tratamento (Figura 16) que foi realizada após aproximadamente 16h.



Figura 10: Coleta da Palha de cana-de-açúcar no campo.



Figura 11: Minho de facas usado para picagem da palha.



Figura 12: Pedacos remanescentes de cana removidos antes da picagem.



Figura 13: Palha não picada.



Figura 14: Palha Picada.



Figura 15: Adição de água para ajuste da unidade da palha.



Figura 16: Palha preparada para os ensaios de pré-tratamento.

3.4 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”

A palha de cana-de-açúcar foi analisada quanto ao teor dos seus principais constituintes, celulose, hemiceluloses, lignina e cinza, utilizando-se metodologia baseada no procedimento analítico padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável Americano (NREL - National Renewable Energy Laboratory) para análise de biomassa (Sluiter et al. 2012). Este procedimento consiste basicamente numa hidrólise ácida em duas etapas com a finalidade de fracionar a biomassa em porções mais facilmente quantificáveis. A lignina é fracionada em material solúvel em ácido e material insolúvel em ácido. O material insolúvel em ácido inclui cinza e proteínas, as quais são contabilizadas por análise gravimétrica. A lignina solúvel em ácido é quantificada por espectroscopia na região do UV visível. Durante a hidrólise, os carboidratos poliméricos são hidrolisados nas formas monoméricas, as quais são solúveis no líquido de hidrólise. Estes são então mensurados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Cerca de 2,0 g da palha de cana-de-açúcar previamente seca ao ar e moída foi pesada em cadinho, previamente tarado, e posteriormente seca em estufa a 105°C por 24 h para determinação do teor de umidade. A palha seca em estufa foi queimada em bico de Bunsen e posteriormente calcinada em mufla a 575°C por 4h para determinação de cinzas (Figura 17).



Figura 17: Determinação de cinzas na palha: Queima em bico de Bunsen (A), Calcinção na mufla e Amostra das cinzas (C).

Cerca de 300 mg de amostra seca ao ar foram tratados com 3 mL de H_2SO_4 72% (m/m) por uma hora a 40°C em banho termostatizado. Em seguida (Figura 18) foram adicionados 84 mL de água para diluir a concentração do ácido para 4%. A mistura foi

autoclavada a 121°C por 30 minutos (Figura 19), resfriada e filtrada em cadinho de vidro sinterizado de porosidade número 3, previamente secos a 105°C e pesados (Figura 20). Cerca de 10 mL do filtrado foi neutralizado com carbonato de cálcio e centrifugado a 5000 rpm, equivalente a 2700 g (Figura 21), o sobrenadante foi analisado quanto aos teores de açúcares por CLAE utilizando uma coluna BIORAD HPX-87P e água a 0,6 mL/min como eluente e um detector de índice de refração. O material retido no cadinho foi lavado com 50 mL de água, seco em estufa a 105°C por 4 h. O material remanescente no cadinho foi pesado e corresponde a fração da biomassa insolúvel em ácido, ou seja, lignina insolúvel (Klason) e parte do material inorgânico. Em seguida esse material foi calcinado na mufla a 575°C por 4 h, resfriado e pesado. Por diferença de massa foi determinada a lignina insolúvel em ácido.



Figura 18: Amostras da palha antes e depois da hidrólise com ácido concentrado 72% a 40°C.



Figura 19: Amostras autoclavadas após diluição para 4% de concentração do ácido.



Figura 20: Filtração das amostras após hidrólise com ácido diluído.



Figura 21: Neutralização das amostras com carbonato de cálcio.

3.5 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar

Os experimentos de pré-tratamento foram realizados em reator de Explosão com Vapor (“*Steam Explosion*”), com capacidade volumétrica de 65 litros, apresentado na Figura 22. Após a carga do reator com palha, o reator é fechado e inicia-se injeção de vapor; durante o primeiro minuto a válvula de degasagem é mantida aberta para purga dos gases inertes, em seguida fecham-se as válvulas de injeção de vapor e purga e, inicia-se a adição do catalisador gás dióxido de enxofre (SO_2) dentro do reator, o peso do cilindro de gás é monitorado para determinação da quantidade adicionada (Figura 22 C). Após adição do catalisador gasoso inicia-se novamente a adição de vapor para realizar a pressurização até atingir a pressão planejada, aguarda-se o tempo de patamar requerido e ao final é realizada a descompressão súbita do reator. A biomassa pré-tratada é separada do vapor, no ciclone acoplado ao reator, onde é posteriormente coletada. A biomassa coletada abaixo do ciclone foi pesada e foram realizadas amostragens de cada experimento para posterior análise no laboratório (Figura 23). Após cada experimento foi feita a pressurização e despressurização do reator vazio para limpeza do sistema, removendo parte do material que poderia ter ficado na tubulação entre o reator e o ciclone.



Figura 22: Reator de pré-tratamento “*Steam Explosion*” (A), injeção de catalisador no reator (B) e monitoramento da variação de massa do cilindro de gás (C).



Figura 23: Palha de cana-de-açúcar pré-tratada (A) e amostras para posterior análise em laboratório (B).

3.6 Caracterização da palha de cana-de-açúcar pré-tratada

As amostras de palha de cana-de-açúcar pré-tratada foram analisadas, em triplicata, quanto ao percentual de sólidos solúveis por meio de uma extração com água (60°C), numa relação água:sólido 1:10, em duas etapas, sendo a fração líquida obtida analisada quanto ao teor de açúcares monoméricos por CLAE. Para determinação dos açúcares presentes no líquido na forma de oligômeros, foi realizada uma hidrólise ácida diluída e posterior análise por CLAE. A hidrólise com ácido diluído foi realizada adicionando-se 1 mL de solução 72% de ácido sulfúrico a 28 mL do líquido. Após diluição a solução é aquecida sob pressão em autoclave por 1 hora, posteriormente é neutralizada com carbonato de cálcio e acondicionada para análise por CLAE.

A fração sólida insolúvel, constituída por celulose, lignina, hemiceluloses e cinzas foi submetida à análise composicional seguindo o mesmo procedimento descrito para a palha de cana-de-açúcar “in natura”.

3.7 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada

A palha de cana-de-açúcar pré-tratada foi utilizada nos experimentos de hidrólise enzimática exatamente como obtida na etapa de pré-tratamento, ou seja, não foi realizada nenhuma etapa de preparação como, por exemplo, lavagem para remoção de sólidos solúveis,

constituídos principalmente de hemiceluloses solubilizadas na forma de xilose e produtos de degradação. A hidrólise enzimática da palha pré-tratada foi realizada em reator agitado mecanicamente (Figura 24), com volume de trabalho de 500 mL e carga de sólidos de 8%. O pH do meio reacional foi ajustado em 4.8 usando solução citrato de sódio 100 mM no tempo inicial e posteriormente em intervalos de 24 h. A enzima utilizada foi a Cellic CTec II (140 FPU/ml) fornecida pela Novozyme, a massa de enzima utilizada correspondeu a 2 FPU/g de palha pré-tratada (base seca). O tempo total de hidrólise foi 48 h, sendo que uma amostra foi coletada após 12 h do início do experimento. Ao final foi realizada uma filtração a vácuo (Figura 25) para separação da celulignina (sólido residual) do hidrolisado (líquido).



Figura 24: Hidrólise enzimática em reatores agitados.



Figura 25: Filtração do hidrolisado enzimático.

Após separação o hidrolisado enzimático foi analisado por CLAE, nas mesmas condições descritas no item 3.6.

3.8 Índice de Fracionamento

Durante o desenvolvimento de processos de conversão de biomassas lignocelulósicas, a avaliação da eficiência do processo é fundamental, porém percebe-se que muitas vezes a eficiência é avaliada em relação ao componente que dá origem ao produto de interesse. Um exemplo claro é o desenvolvimento de processos de produção de biocombustíveis, que tendo a fração celulósica como componente principal (uma vez que a tecnologia para converter glicose em etanol é consolidada), muitas vezes não se avalia a eficiência de recuperação da

fração hemicelulósica (cuja tecnologia para converter a xilose em etanol ainda está em desenvolvimento). Dentro do conceito de biorrefinarias, onde toda a biomassa deve ser aproveitada para geração de biocombustíveis e produtos diversos, todos os componentes terão importância relevante. Deste modo, se pode imaginar que os processos que serão competitivos no futuro devem ser desenvolvidos buscando maximizar o rendimento de todos os componentes, mesmo que alguns sejam em um primeiro momento secundários.

Dentro desse contexto, um indicador que avalie a eficiência do processo em relação a todos os componentes de forma integrada parece relevante, podendo ser utilizado para comparar diferentes configurações de processos ou diferentes condições operacionais de um mesmo processo.

Neste trabalho é proposto o Índice de Fracionamento da Biomassa, por meio do qual, de forma simples, com base no rendimento e na seletividade em relação à celulose e hemiceluloses, é possível quantificar a eficiência do processo de pré-tratamento de forma integrada.

Abaixo é apresentada a equação para o cálculo do Índice de Fracionamento.

$$IF = (R_C \times S_C) \times (R_H \times S_H) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde o Rendimento (R) e a Seletividade (S) de cada componente, ou seja, celulose e hemiceluloses, indicados com as letras subscritas C e H, respectivamente, são calculados da seguinte forma:

$$R = \frac{\text{Massa do componente na corrente de interesse}}{\text{Massa do componente na biomassa inicial}}$$

$$S = \frac{\text{Massa do componente na corrente de interesse}}{\text{Massa de todos os componentes na corrente de interesse}}$$

Nestes casos a corrente de interesse do componente é aquela na qual se espera recuperar a maior fração do componente.

Em um caso hipotético onde o processo alcançasse uma eficiência ideal tem-se um índice de fracionamento igual a 1. Esse valor pode ser levado em consideração para avaliar quão longe um processo está do fracionamento ideal da biomassa.

Para exemplificar o cálculo do Índice de Fracionamento, no diagrama abaixo (Figura 26) são descritas as correntes de entrada e saída do processo de pré-tratamento visando à solubilização da fração hemicelulósica. Posteriormente, na Tabela 3, é apresentada a composição de cada corrente.

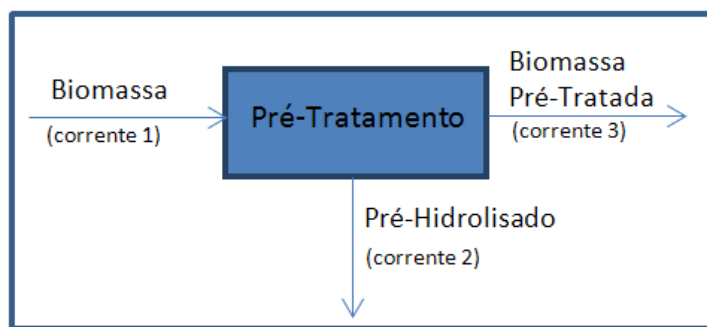


Figura 26: Diagrama esquemático das correntes no processo de pré-tratamento.

Tabela 3: Composição das correntes do diagrama esquemático utilizadas para exemplificar o cálculo do Índice de Fracionamento.

	Corrente 1	Corrente 2	Corrente 3
Celulose (g)	43	4	37
Hemiceluloses (g)	22	16	2

Nesse diagrama, por exemplo, as correntes de interesse de recuperação das hemiceluloses (na forma de xilose solúvel) e da celulose (insolúvel) na biomassa pré-tratada são, respectivamente, as correntes de nº 2 e 3.

Abaixo são calculados os rendimentos e seletividades para cada um dos componentes:

$$R_C = \frac{\text{Massa de celulose na corrente 3}}{\text{Massa de celulose na biomassa inicial}} = \frac{37}{43} = 0,86 \quad (\text{Equação 2})$$

$$S_c = \frac{\text{Massade celulose na corrente 3}}{\text{Massade todos os componentes na corrente 3}} = \frac{37}{39} = 0,95 \quad (\text{Equação 3})$$

$$R_H = \frac{\text{Massade hemicelulose na corrente 2}}{\text{Massade hemicelulose na biomassa inicial}} = \frac{16}{22} = 0,73 \quad (\text{Equação 4})$$

$$S_H = \frac{\text{Massade hemicelulose na corrente 2}}{\text{Massade todos os componentes na corrente 2}} = \frac{16}{20} = 0,80 \quad (\text{Equação 5})$$

Com os resultados obtidos acima se pode calcular o Índice de Fracionamento para o exemplo citado.

$$IF = (0,86 \times 0,97) \times (0,82 \times 0,86) = 0,47 \quad (\text{Equação 6})$$

Neste caso o Índice igual a 0,47 indica que existe um *gap* significativo entre o processo exemplificado e um processo de pré-tratamento ideal. Neste trabalho foram calculados os índices de fracionamento para cada condição de processo investigada, objetivando-se utilizar esse número como parâmetro de resposta para a otimização do processo.

3.9 Recuperação Global

A recuperação global de glicose foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis sobre as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática de forma integrada. A equação a seguir (Equação 1) foi utilizada para calcular a recuperação global.

$$Rend.Global(\%) = \frac{\left(\frac{gBPT}{gB_{innatura}} \right) \times \left(\frac{gGlicose_{hid.enz.}}{gBPT_{hid.enz.}} \right)}{\left(\frac{\%Celulose_{B_{innatura}} \times 1,11}{1gB_{innatura}} \right)} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

gBPT = massa de biomassa (palha) pré-tratada.

$gB_{in\ naturala}$ = massa de biomassa(palha) in natura.

$gGlicose_{hid.enz.}$ = massa de glicose obtida após hidrólise enzimática.

$gBPT_{hid.enz.}$ = massa de biomassa (palha) pré-tratada utilizada na hidrólise enzimática
(de acordo com o sólido total utilizado).

$\%celulose_{Bin\ naturala}$ = percentual de celulose na biomassa (palha) in natura.

Notemos que:

$$\left(\frac{gBPT}{gB_{innaturala}} \right) = \text{Rendimento da etapa de pré-tratamento}$$

$$\left(\frac{gGlicose_{hid.enz.}}{gBPT_{hid.enz.}} \right) = \text{Glicose gerada na hidrólise por massa de Biomassa (palha)}$$

$$\left(\frac{\%Celulose_{B_{innaturala}} \times 1,11}{1gB_{innaturala}} \right) = \text{Máxima glicose obtida por biomassa (palha) in natura.}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ETAPA I: Avaliação das variáveis de processo de maior efeito.

4.1.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”

Na Figura 27 abaixo são apresentados os valores percentuais dos principais constituintes da palha de cana-de-açúcar. Esses valores estão próximos daqueles comumente descritos na literatura (Tabela 4) e as variações podem ser atribuídas a alguns fatores, entre eles a variedade de cana-de-açúcar, época e forma da colheita. No caso específico da forma da colheita, essa é determinante para a quantidade de impurezas quantificadas, principalmente na forma de cinzas.

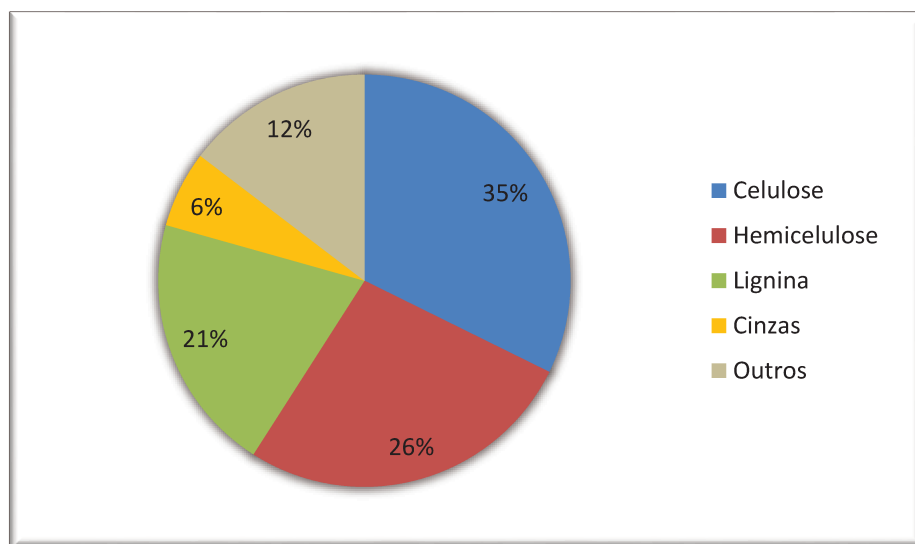


Figura 27: Composição da palha de cana-de-açúcar.

Tabela 4: Composição da palha de cana-de-açúcar em trabalhos de referência.

Referências	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)
Trabalho atual.	35,2	26,3	21,7
Jutakanoke et al., 2012	38,5	23,0	15,6
Oliveira et al., 2013	37,0	28,0	26,0
Rocha et al., 2012	38,1	29,2	24,2
Moutta, 2009	40,8	30,8	25,8

4.1.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar

Nas Figura 28 e Figura 29 são apresentados todos os perfis de pressurização e aquecimento do reator durante os experimentos de pré-tratamento, respectivamente. Observa-se que o tempo de pressurização até atingir a pressão de patamar desejada foi de 40s a 1,5 min para 12 kgf/cm², 1,5 a 2 min para 15 kgf/cm² e 2 a 2,5 min para 18 kgf/cm².

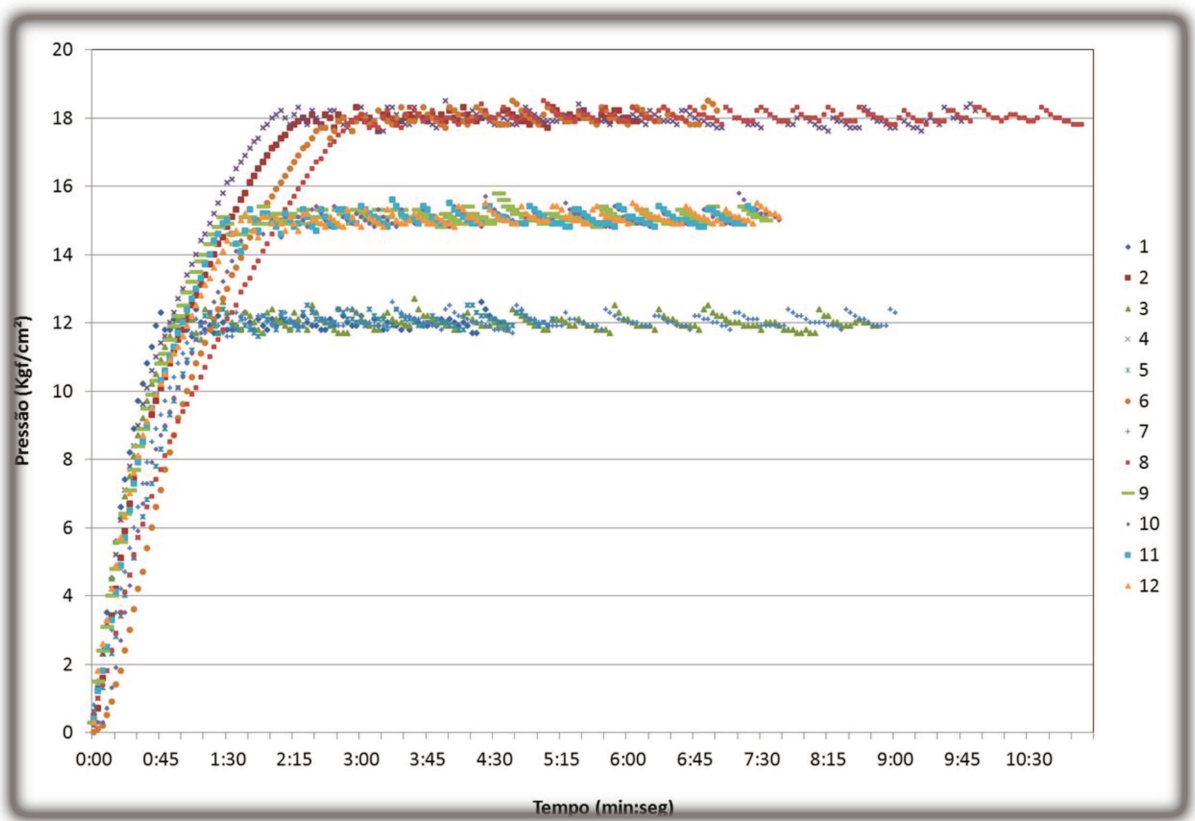


Figura 28: Perfil de pressurização do reator de pré-tratamento para todas as condições investigadas.

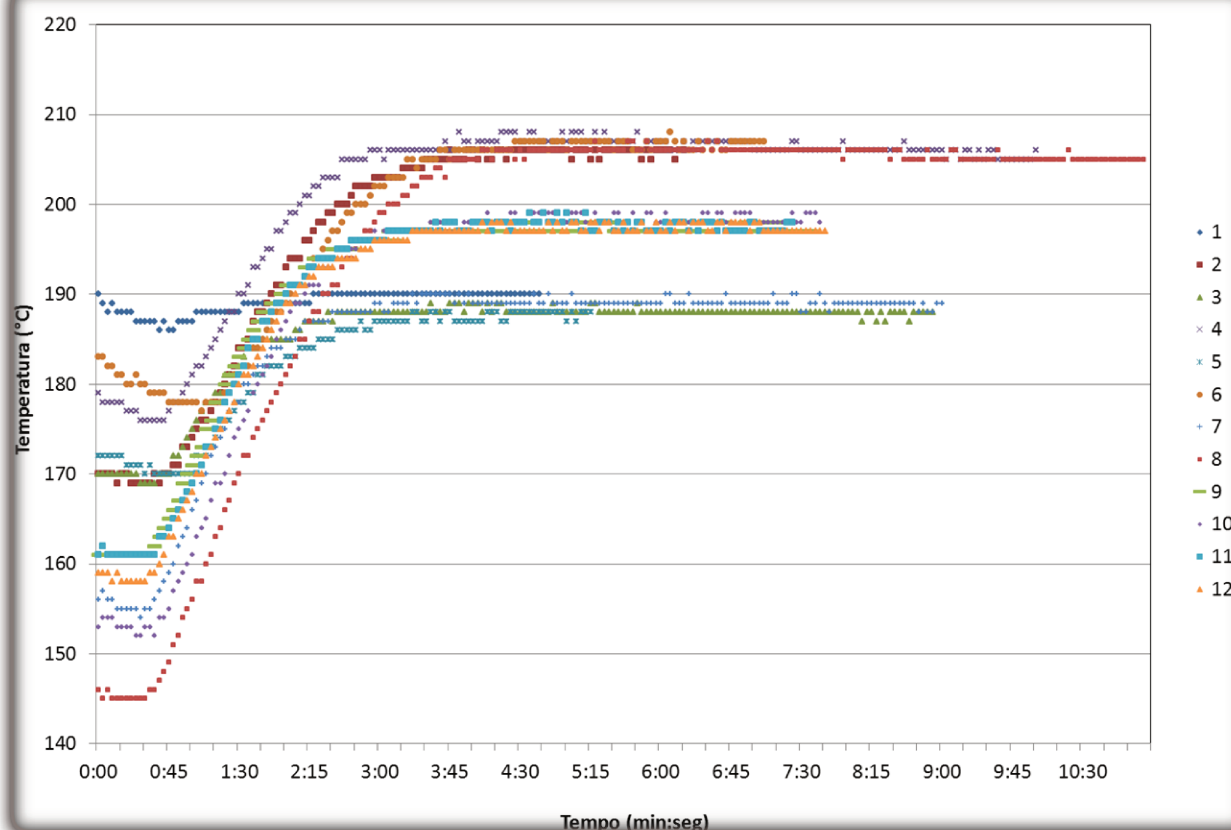


Figura 29: Perfil de aquecimento do reator de pré-tratamento para todas as condições investigadas.

Na Figura 30 é apresentado o balanço de massa dos sólidos no processo, onde é possível observar o percentual de palha recuperado após pré-tratamento em relação à palha “*in-natura*” inicial. Foi obtida uma recuperação na faixa de 78 a 92% para os ensaios de 1 a 8 e uma média de 91% para os ensaios de 9 a 12 (pontos centrais) do planejamento fatorial. Pode-se observar que a menor recuperação (78%) foi obtida na condição de maior severidade do processo (Pressão = 18 Kgf/cm², tempo = 8 min, Umidade = 50% e catalisador = 4% m/m). Condições de alta severidade devem ser evitadas, mesmo que a biomassa pré-tratada proporcione elevada conversão enzimática da celulose. Isso se deve primeiramente porque resultam em menores rendimentos de pré-tratamento, como evidenciado, e assim influenciam diretamente na recuperação global do processo e, em segundo lugar, a severidade está diretamente associada à geração de produtos de degradação (Furfural e HMF) que são inibidores da fermentação.

Além disso, a maior parte da degradação está associada geralmente à fração hemicelulósica da biomassa, que mesmo não sendo o principal produto do processo para produção de etanol no presente trabalho, possui potencial para aplicações diversas, aumentando assim a sustentabilidade do processo como um todo.

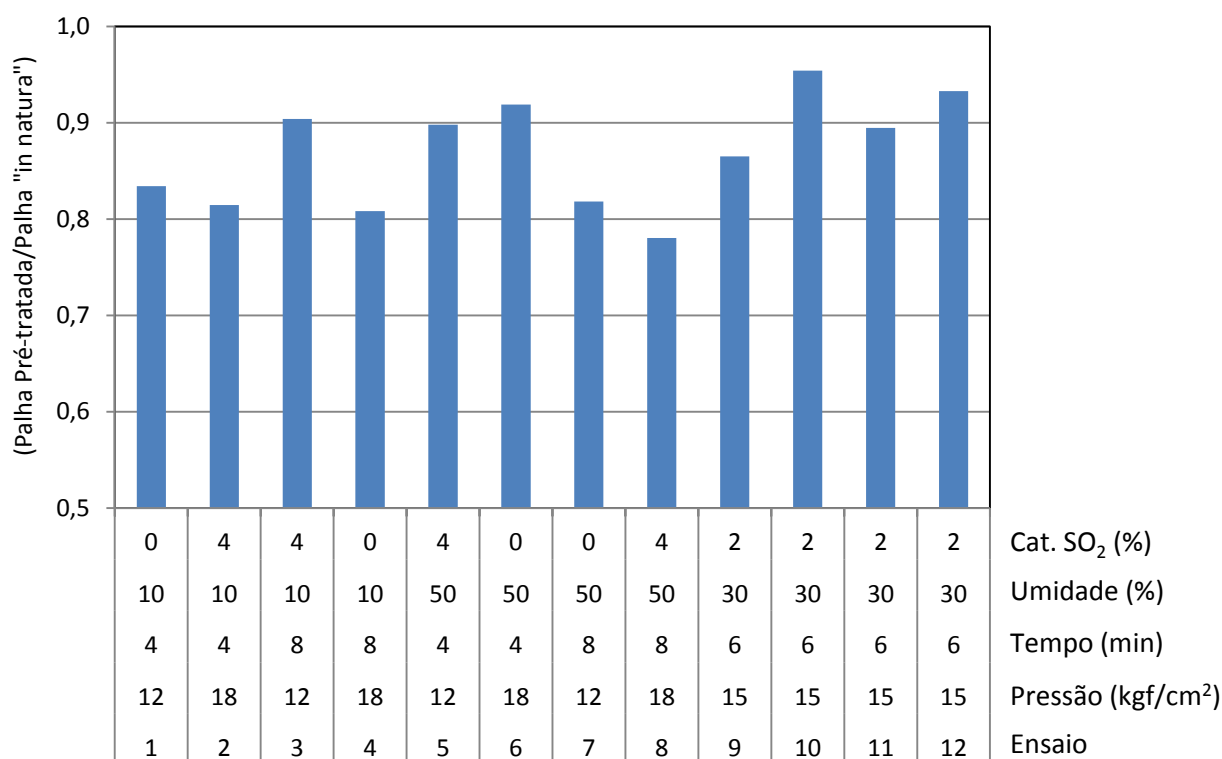


Figura 30: Rendimento do pré-tratamento, em relação à recuperação total de sólidos, para cada uma das condições investigadas.

Na Figura 31 é apresentado o Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação de massa no pré-tratamento. Como pode ser observado, nenhuma das variáveis investigadas apresentaram efeito significativo a um nível de 90% confiança. Se pode neste caso fazer uso da análise por meio de gráficos normais. Essa é uma técnica alternativa para se distinguir, nos resultados de um planejamento, os valores que correspondem realmente aos efeitos. A análise por gráficos normais mostra os efeitos significativos e independe do nível de confiança escolhido.

Na Figura 32 é apresentado o gráfico normal traçado com os efeitos das variáveis sobre o rendimento do pré-tratamento. Pode-se observar que os efeitos não estão consideravelmente afastados da reta sobre a origem com inclinação 1, indicando que possivelmente são provenientes de uma distribuição normal com média zero e, portanto, não têm significado físico. Neste caso, confirmando o gráfico de Pareto anterior, as variáveis realmente não apresentaram efeito significativo sobre o rendimento do pré-tratamento.

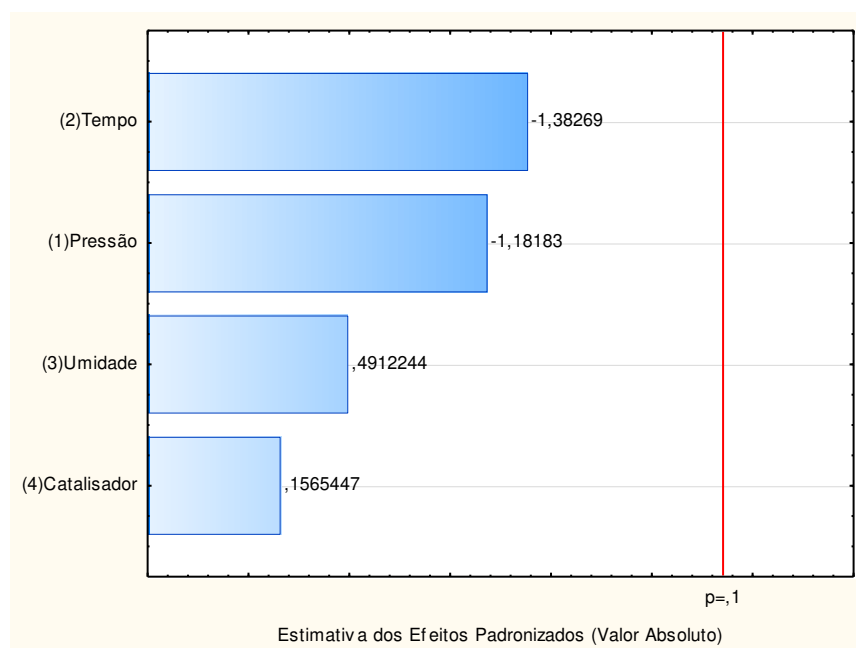


Figura 31: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação de massa no pré-tratamento.

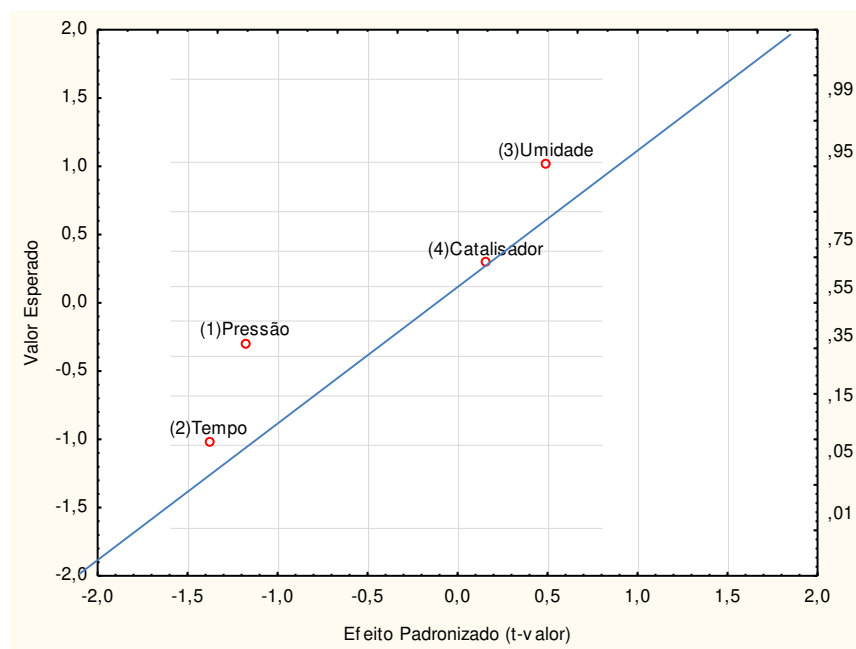


Figura 32: Gráfico normal dos efeitos das variáveis sobre o rendimento do pré-tratamento.

Na Figura 33 são apresentados os resultados de glicose solúvel recuperada no pré-hidrolisado, na forma mono e oligo. Como é de se esperar, se pode observar que o valor máximo de glicose no pré-hidrolisado (9,5%) foi alcançado na condição de maior severidade de processo. O catalisador foi evidenciado claramente como a variável de maior efeito no diagrama de Pareto (Figura 34) com 90% de significância, seguido pelo efeito da pressão. Interessante perceber a relação oligo/mono, apresentada na Figura 35; a quantidade de oligômeros de glicose foi 18 vezes maior que a quantidade de monômeros quando não utilizou-se catalisador, por outro lado foi observada razão entre 1 e 3 quando utilizou-se catalisador. Neste caso, como se pode observar no diagrama de Pareto (Figura 36), o catalisador novamente apresentou o maior efeito, desta vez, seguido pela pressão como variável de segundo maior efeito.

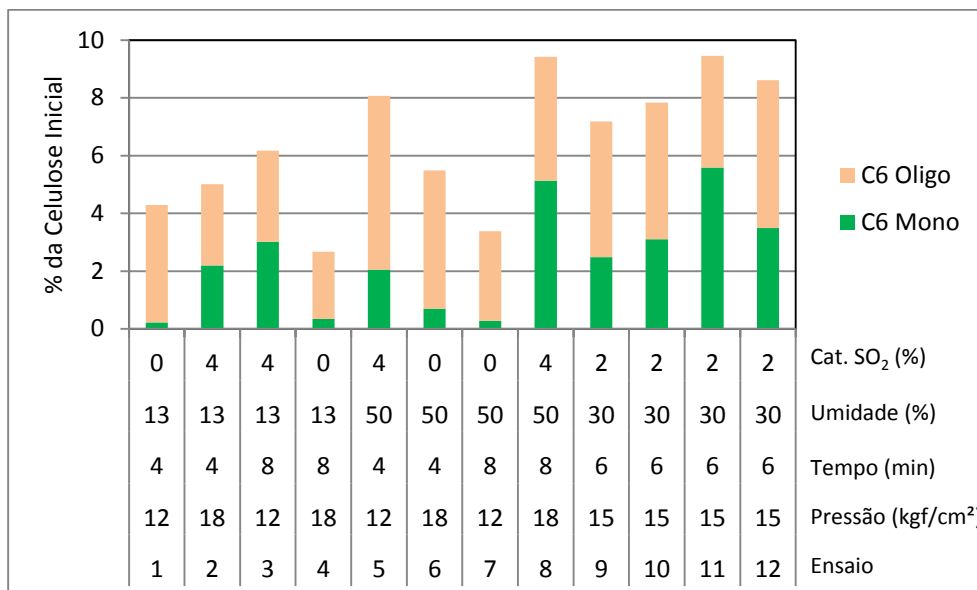


Figura 33: Glicose recuperada no pré-hidrolisado em relação a celulose da biomassa inicial.

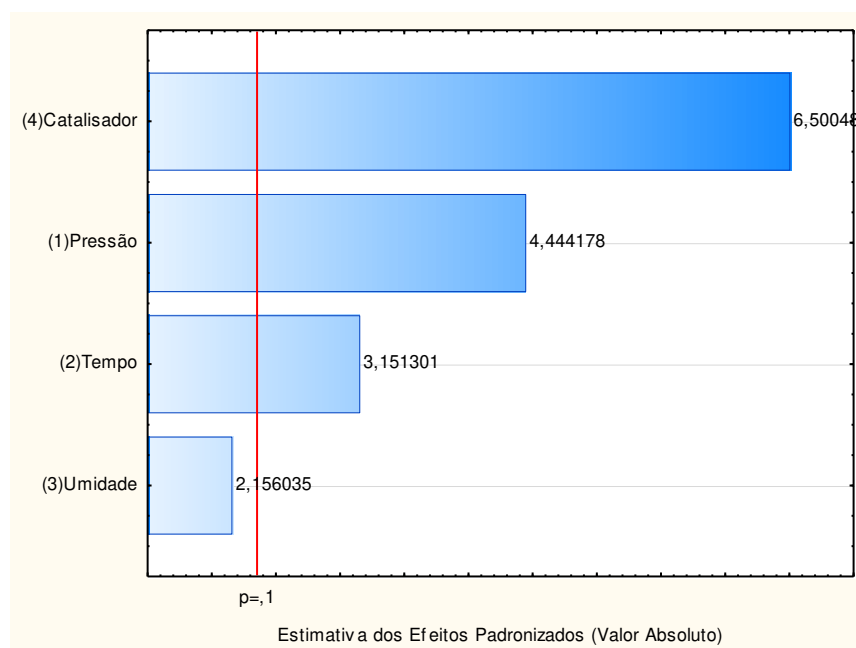


Figura 34: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a glicose recuperada no pré-hidrolisado.

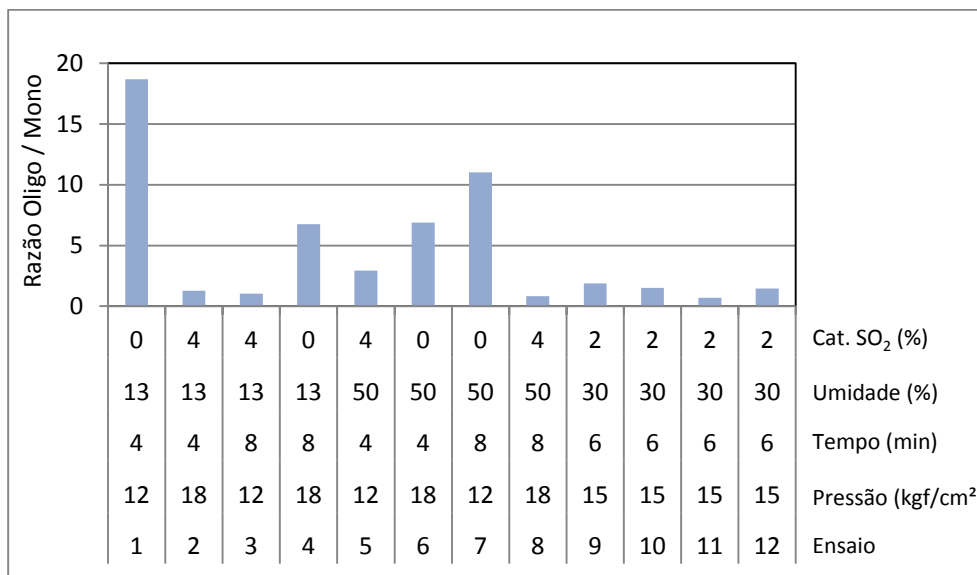


Figura 35: Relação oligo/mono de glicose recuperada no pré-hidrolisado.

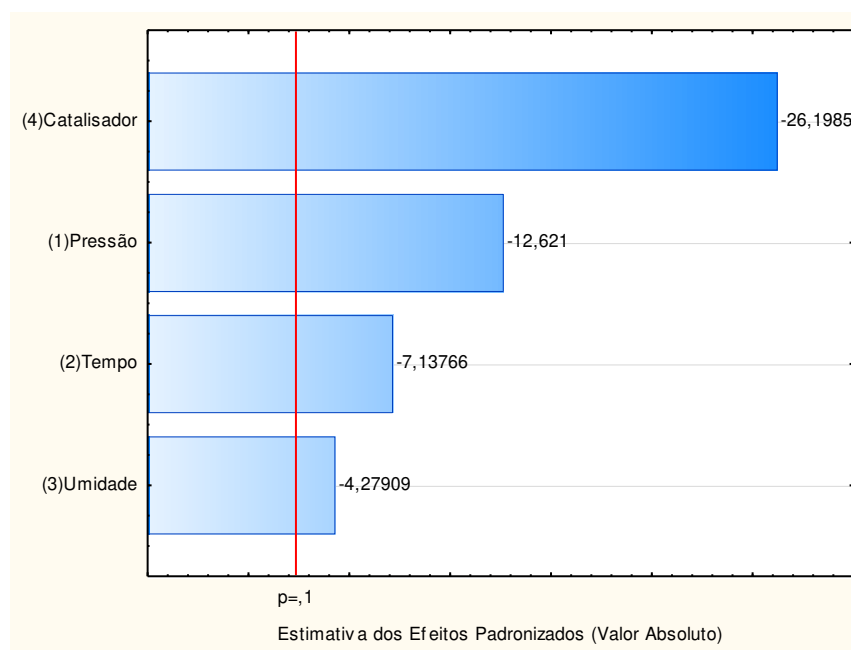


Figura 36: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a razão oligo/mono de glicose recuperada no pré-hidrolisado.

Da mesma forma que apresentado para a glicose, na Figura 37 são apresentados os resultados de xilose solúvel recuperada no pré-hidrolisado, tanto na forma mono como oligo. Pode-se observar recuperação máxima em torno de 44% na condição de maior severidade, porém nessa condição, como foi apresentado anteriormente (Figura 30), foi observada maior

perda de massa, provavelmente associada à solubilização das hemiceluloses. Novamente, o catalisador foi identificado como variável de maior efeito (Figura 38 e Figura 39) tanto na solubilização da hemiceluloses como na hidrólise dos oligossacarídeos a monossacarídeos, diminuindo a razão oligo/mono (Figura 40).

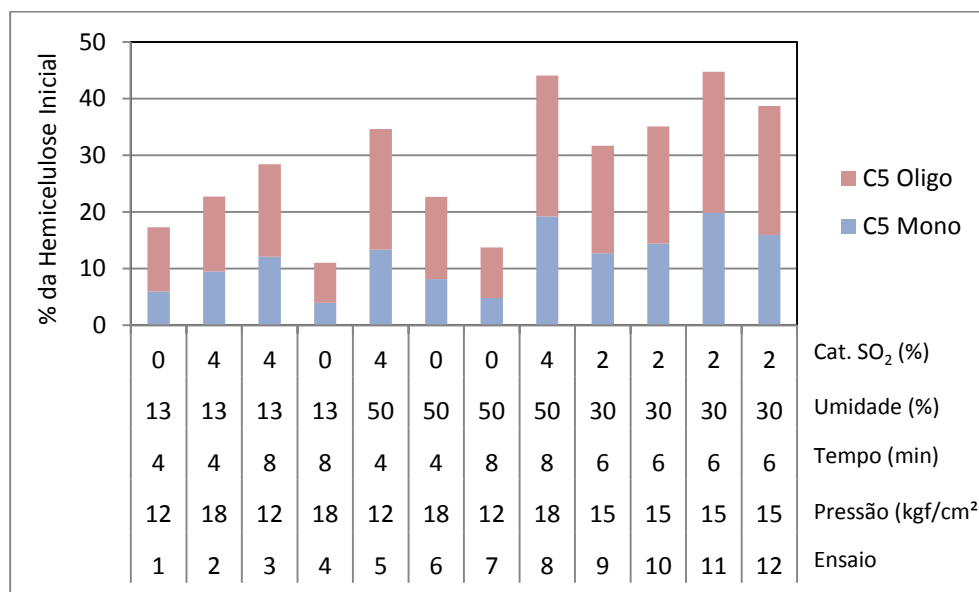


Figura 37: Xilose recuperada no pré-hidrolisado em relação a hemiceluloses da biomassa inicial.

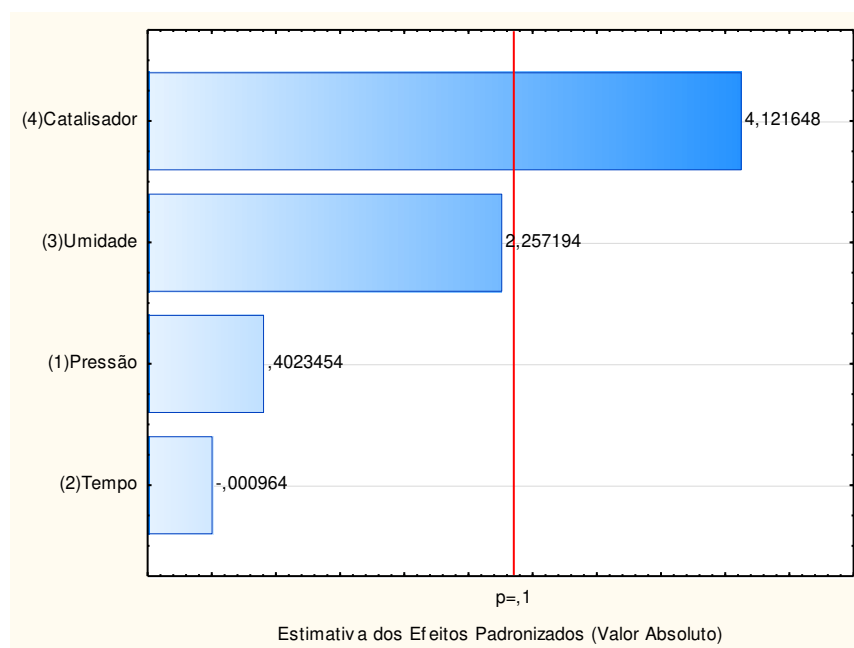


Figura 38: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a xilose recuperada no pré-hidrolisado.

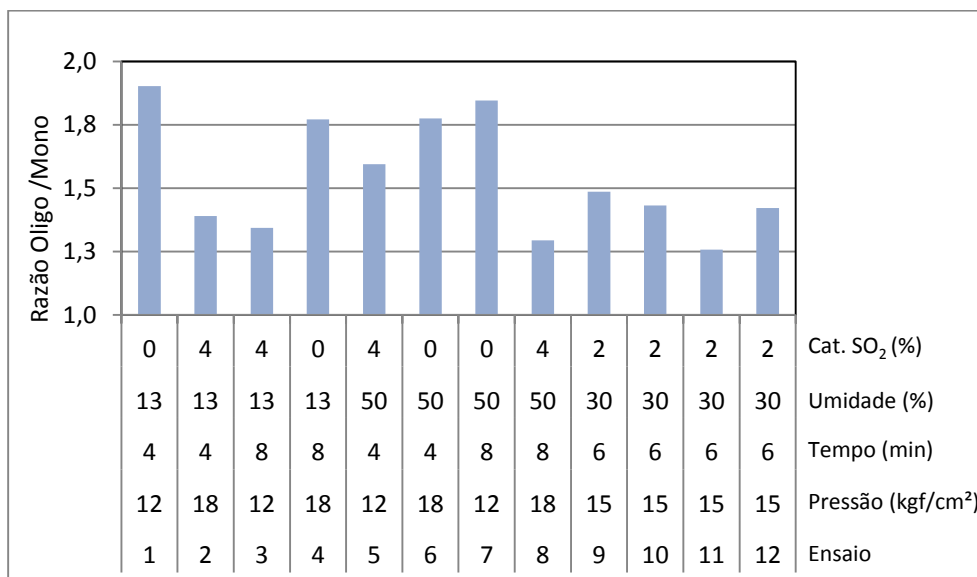


Figura 39: Relação oligo/mono de xilose recuperada no pré-hidrolisado.

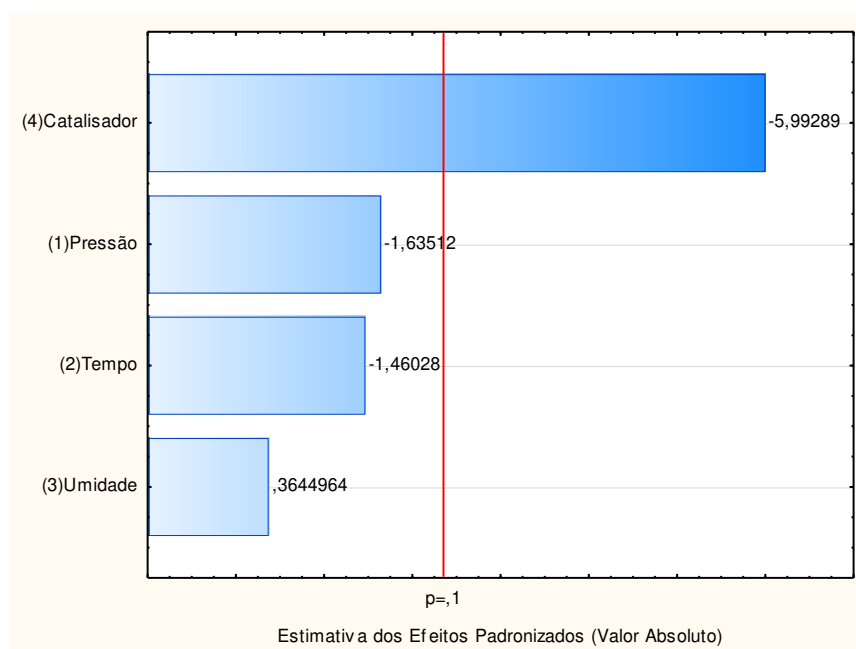


Figura 40: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a razão mono/oligo de xilose recuperada no pré-hidrolisado.

Na Tabela 5 são apresentados os rendimentos e seletividades do processo de pré-tratamento para os componentes celulose e hemiceluloses, calculados através das equações 1 a 4. Se pode observar rendimento máximo de 0,95 e mínimo 0,77 para celulose, com média

de 0,90 no ponto central. A condição de menor severidade testada resultou no maior rendimento (0,95), porém está associada à menor seletividade, principalmente pelo elevado teor de hemiceluloses que permaneceu na fibra da biomassa pré-tratada. No caso das hemiceluloses se pode observar rendimento máximo de 0,44 e mínimo 0,11, com média de 0,38 no ponto central. Na última coluna da Tabela 5 é apresentado o Índice de Fracionamento calculado para todas as condições investigadas. Esses valores podem ser mais facilmente visualizados no gráfico apresentado na Figura 41. O maior valor obtido (0,24) foi próximo do valor médio do ponto central (0,23); para todos os casos se pode observar que o rendimento de hemiceluloses é quem mais impacta negativamente o índice. O catalisador mais uma vez resultou na variável de maior efeito no processo, contribuindo para aumentar o índice, como se pode observar por meio do diagrama de Pareto apresentado na Figura 42.

Tabela 5: Índice de Fracionamento da biomassa calculado a partir dos rendimentos e seletividades dos componentes celulose e hemiceluloses para cada um dos ensaios da ETAPA I do planejamento.

Ensaio	Rendimento Celulose	Seletividade Celulose	Rendimento Hemiceluloses	Seletividade Hemiceluloses	Índice de Fracionamento
1	0,95	0,71	0,17	0,75	0,09
2	0,86	0,86	0,23	0,77	0,13
3	0,86	0,80	0,28	0,78	0,15
4	0,96	0,88	0,11	0,76	0,07
5	0,86	0,80	0,35	0,76	0,18
6	0,91	0,87	0,23	0,76	0,14
7	0,92	0,74	0,14	0,76	0,07
8	0,77	0,89	0,44	0,78	0,24
9	0,91	0,88	0,32	0,77	0,20
10	0,92	0,88	0,35	0,77	0,22
11	0,88	0,90	0,45	0,78	0,28
12	0,91	0,89	0,39	0,77	0,24
Média PC*	0,90	0,89	0,38	0,77	0,23

*Valores médios calculados a partir dos 4 valores do ponto central (Ensaio 9 à 12).

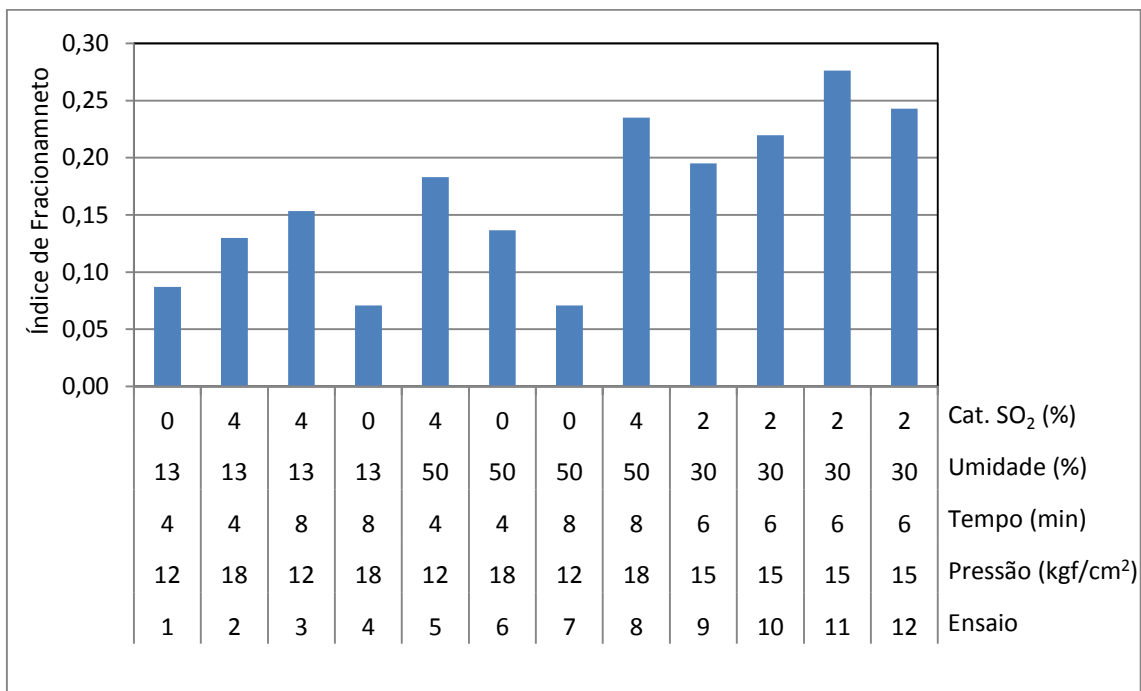


Figura 41: Índice de Fracionamento.

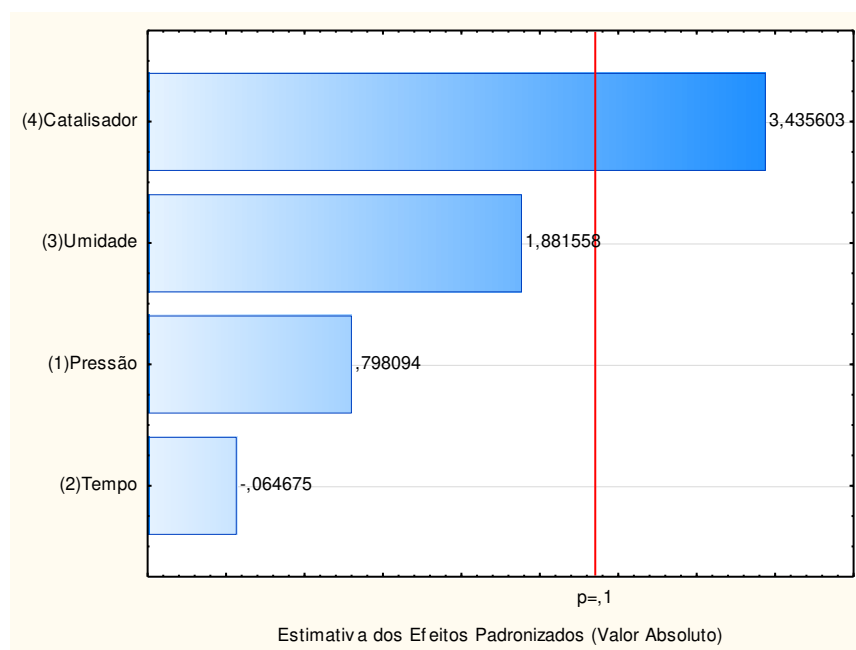


Figura 42: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre o Índice de Fracionamento.

4.1.3 Hidrólise Enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada

Nesse trabalho a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada foi realizada para cada uma das condições investigadas com o objetivo de avaliar a acessibilidade enzimática da fibra, ou seja, em que condições a palha pré-tratada é mais facilmente hidrolisada pelas enzimas; isso significa maior conversão de celulose em glicose no menor tempo. A carga enzimática e o teor de sólidos também são parâmetros importantes para avaliar a acessibilidade enzimática, porém neste trabalho foram mantidos fixos. A carga enzimática de 2 FPU/g de biomassa pré-tratada, que equivale a aproximadamente 5 FPU/g de celulose, é uma carga bastante limitada quando comparada aos valores normalmente descritos na literatura, em torno de 15 FPU/g de celulose (Aguilar et al. 2013). É importante que a carga enzimática seja baixa, pois o preço da enzima ainda é um fator limitante para a viabilidade econômica do processo. Já a carga de sólidos de 8% empregada nesse trabalho é descrita com frequência, porém estudos recentes demonstram que esse valor deve ser maior para viabilizar o processo, sendo assim patamares de 20% de sólidos tem sido investigados (Modenbach and Nokes 2013). No entanto, para alto teores de sólidos sistemas de agitação diferenciados são empregados para garantir a mistura do meio reacional e esses sistemas não são facilmente disponíveis em laboratório, portanto teores de sólidos de 8% são aceitáveis principalmente quando o objetivo principal é avaliar o pré-tratamento e não se pretende otimizar a etapa de hidrólise enzimática.

Na Figura 43 são apresentados os valores de concentração de glicose na hidrólise enzimática após 24 e 48 h. Foram obtidas concentrações na faixa de 11,6 a 20,7 g/L para 24 h e de 14,8 a 27,3 para 48 h. Na média foi possível calcular um aumento de 26,6 % quando se passa de 24 h para 48 h de hidrólise. A correlação calculada entre os resultados de 24 e 48 h foi de 0,84, indicando que existem diferentes taxas de reação de hidrólise para biomassas submetidas a diferentes condições de pré-tratamento.

Nas Figura 44 e Figura 45 são apresentados os diagramas de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose na hidrólise enzimática após 24 e 48 h de reação, respectivamente. Se pode observar, tanto para 24 h quanto para 48 h, que a variável concentração de catalisador seguida da umidade apresentou efeito positivo e significativo na hidrólise enzimática.

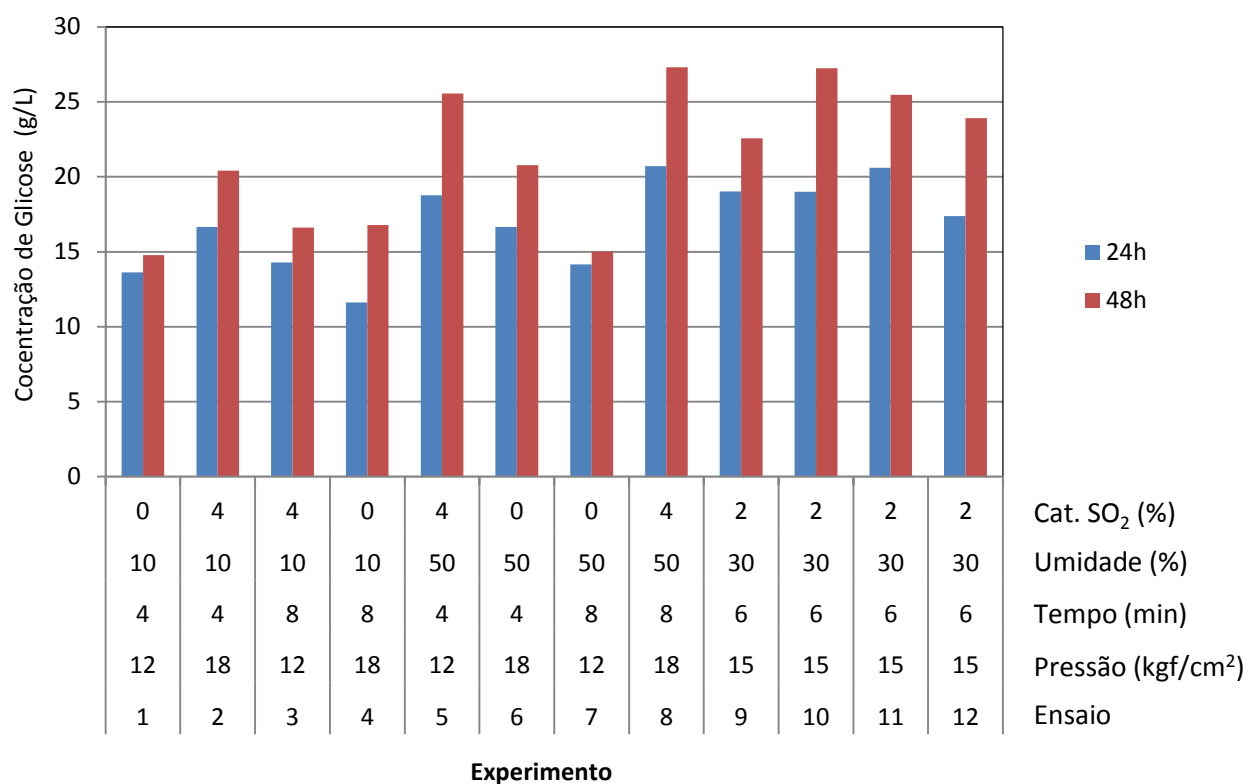


Figura 43: Concentrações de glicose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas.

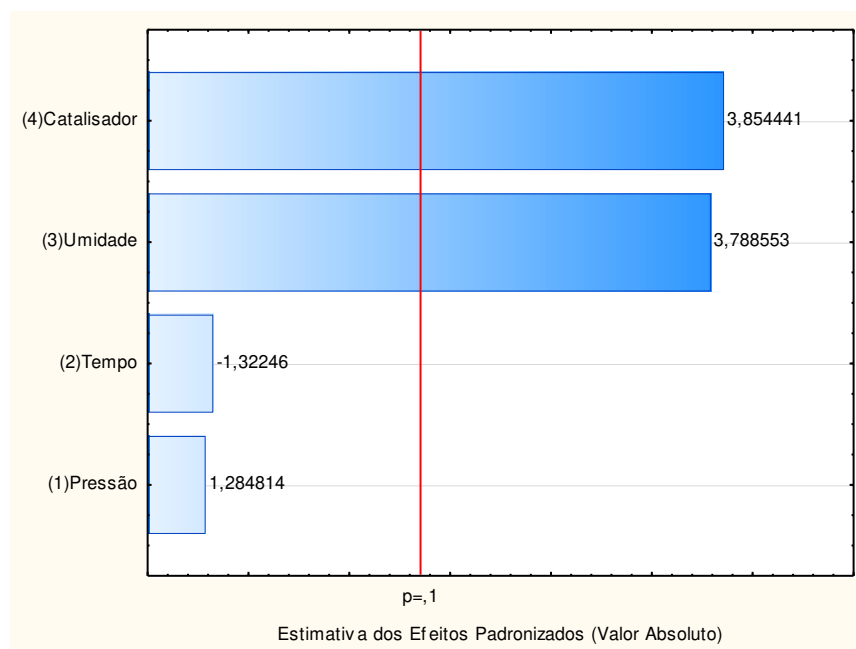


Figura 44: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose na hidrólise enzimática (24 h de reação).

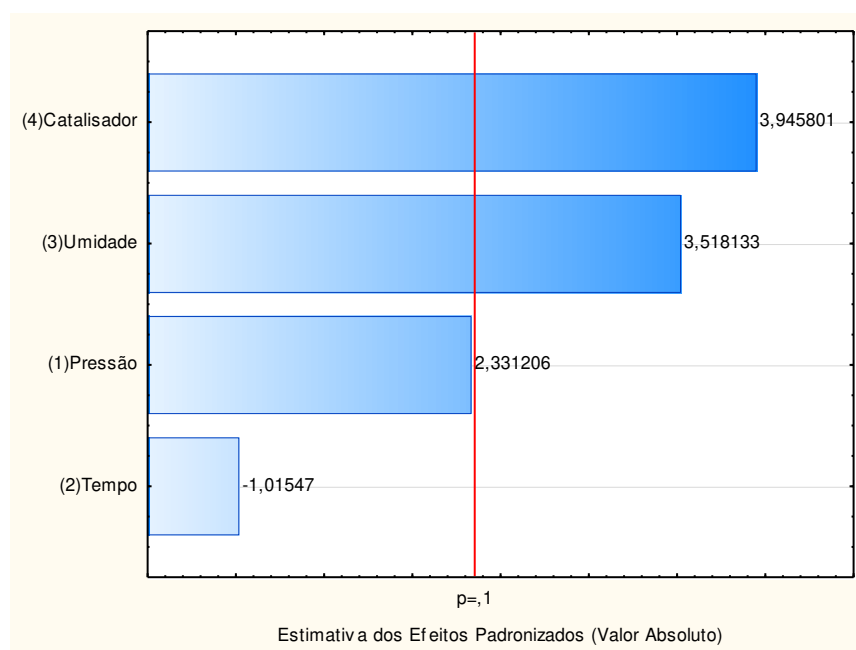


Figura 45: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose na hidrólise enzimática (48 h de reação).

Na Figura 46 são apresentados os resultados de conversão enzimática após 24 e 48 h para cada condição investigada. A conversão máxima obtida foi 60% e 83% para 24 e 48 h respectivamente para o ensaio nº5. No ponto central foram obtidos valores médios de 57% (24 h) e 75% (48 h). A correlação indica que os valores de concentração de glicose e conversão enzimática foi 0,94 para 24 h de hidrólise enzimática e 0,97 para 48 h. Isso evidencia que a concentração de glicose é um bom indicativo da conversão enzimática, de modo que as variáveis de efeito observadas no Diagrama de Pareto apresentados nas Figura 44 e Figura 45 para a concentração de glicose são as mesmas para a conversão enzimática (Figura 47 e Figura 48).

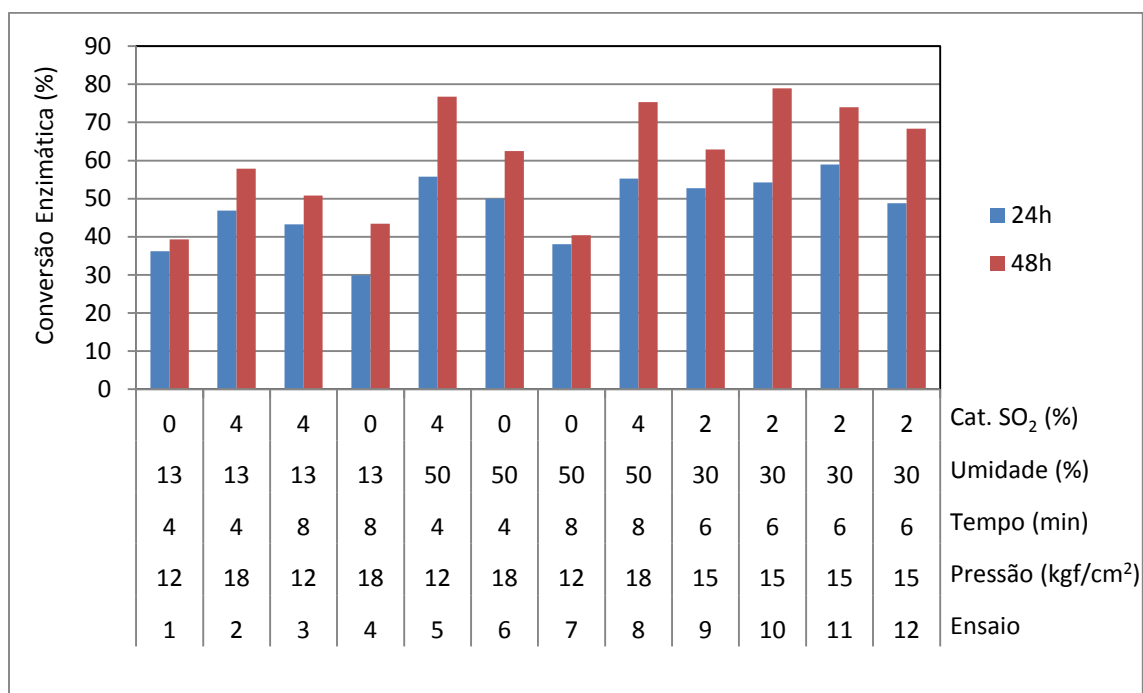


Figura 46: Conversão enzimática da celulose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas.

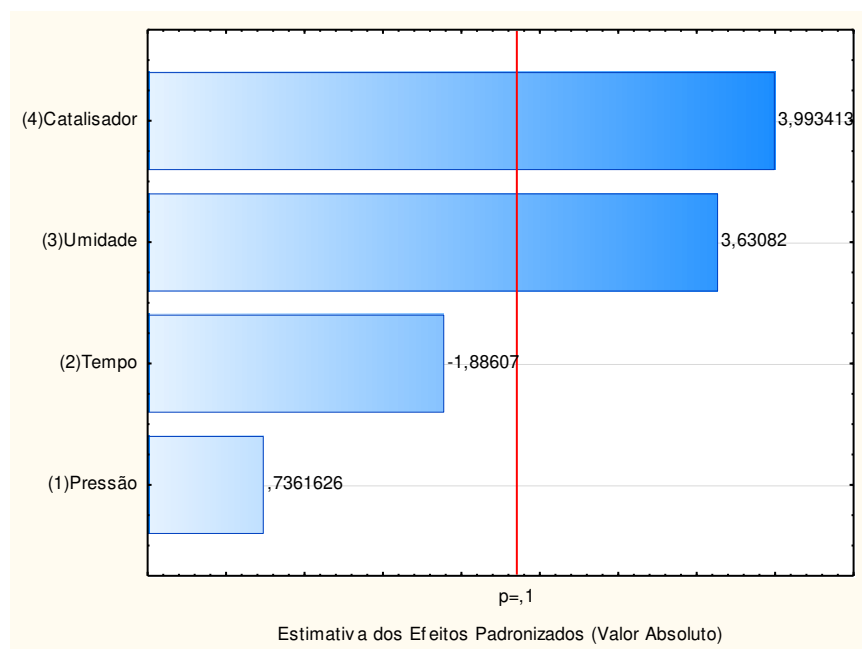


Figura 47: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática (24 h de reação).

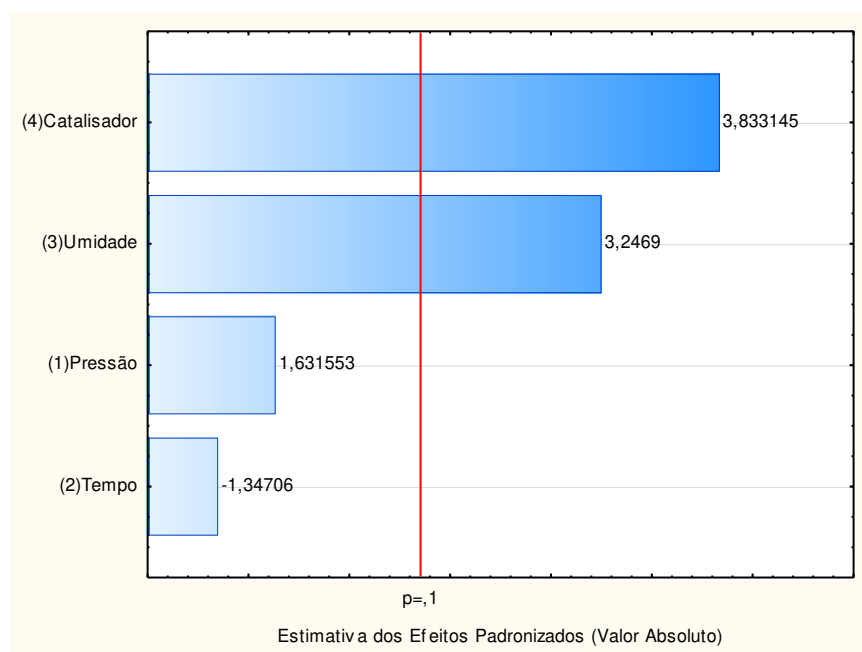


Figura 48: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática (48 h de reação).

4.1.4 Recuperação Global

Na Figura 49 são apresentados os valores de recuperação global de glicose, determinados a partir dos rendimentos da etapa de pré-tratamento e das conversões enzimáticas da palha pré-tratada. Foram obtidos valores médios no ponto central de 55,3% e 72,4% para 24 h e 48 h, respectivamente. Por outro lado, fora da condição do ponto central os maiores valores alcançados foram 53,9% (24 h) e 73,4% (48 h) no ensaio n°5.

Nas Figura 50 e Figura 51 são apresentados os diagramas de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global de glicose para 24 h e 48 h, respectivamente. Pode ser observado, assim como foi verificado para a concentração de glicose na hidrólise enzimática, que as variáveis concentração de catalisador e umidade apresentaram efeitos positivos e significativos na recuperação global, tanto para 24 h quanto para 48 h.

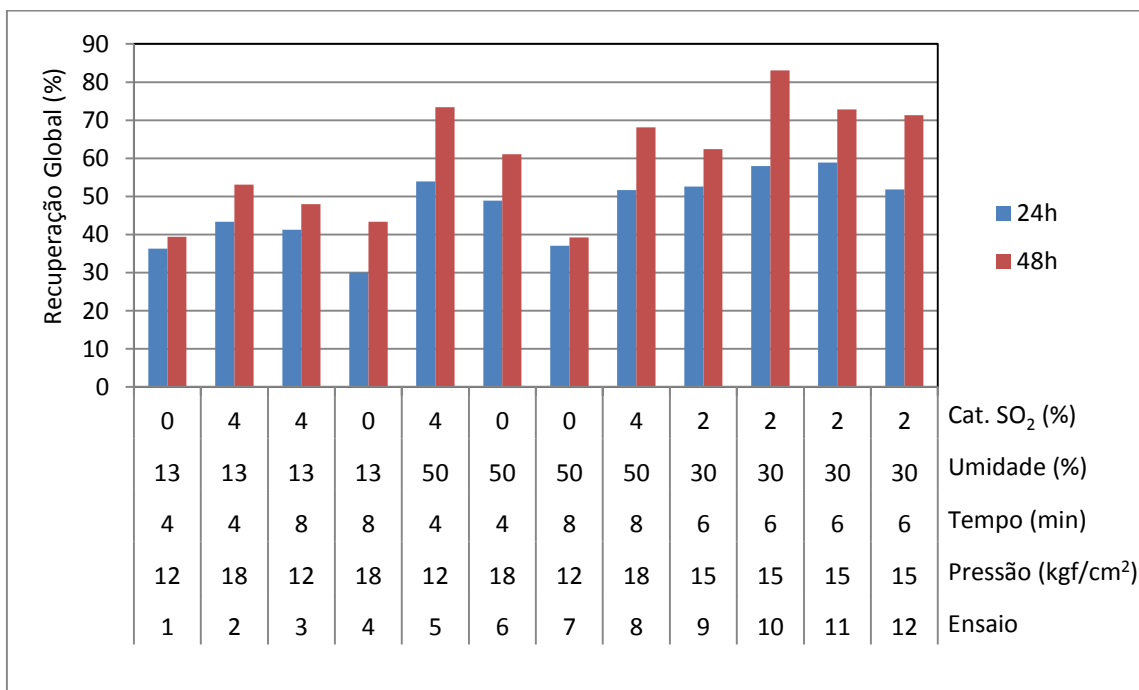


Figura 49: Recuperação Global de glicose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

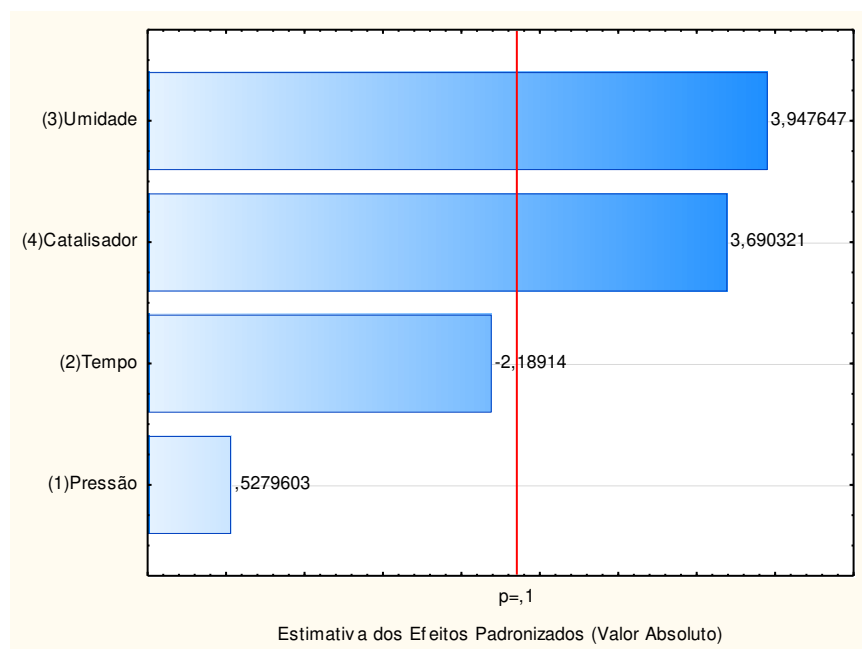


Figura 50: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 24 h de reação de hidrólise enzimática.

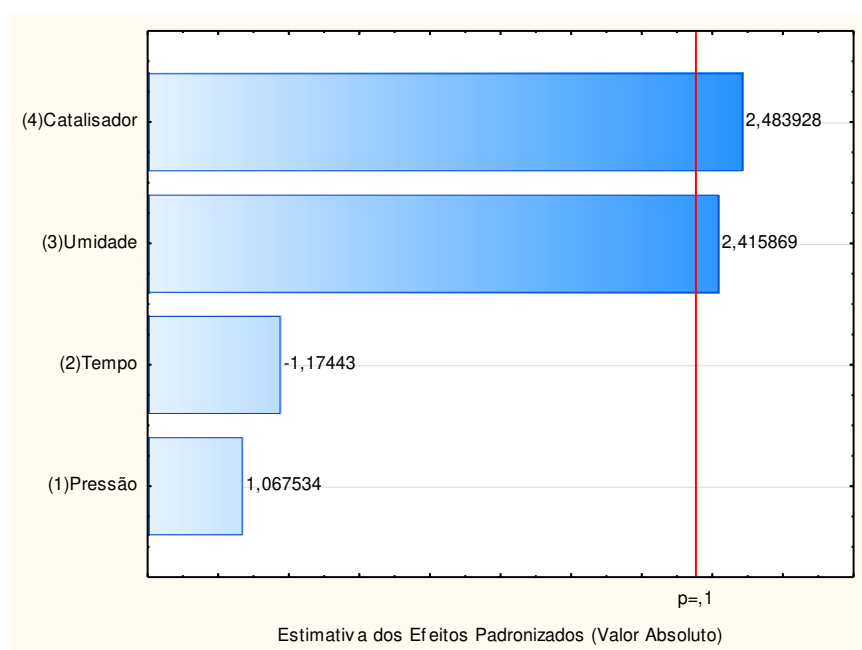


Figura 51: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 48 h de reação de hidrólise enzimática.

4.1.5 Conclusões da ETAPA I

A etapa de preparação da palha de cana-de-açúcar é muito importante para obtenção de uma matéria-prima mais homogênea e livre de impurezas, todas essas características podem afetar negativamente o processo, tanto em rendimentos quanto na operacionalidade.

O Índice de Fracionamento máximo alcançado (0,24) evidência que o processo de pré-tratamento pode ser otimizado visando aproximação do ideal, principalmente com relação ao rendimento de hemiceluloses.

Conversão enzimática máxima da celulose à glicose em torno de 83% foi alcançada nas condições do ensaio n° 5 (pressão = 12kgf/cm²; tempo = 4 min; umidade = 50% e catalisador = 4%) com 48 h de hidrólise sobre condições padrões (8% TS, 2FPU/gTS).

Quanto à recuperação global de glicose (pré-tratamento e hidrólise enzimática) obteve-se um máximo em torno 73% na condição do ensaio n°5, muito próximo do valor obtido para a média no ponto central (72%).

Tanto para o Índice de Fracionamento quanto para a recuperação global de glicose, as variáveis de maior efeito identificadas foram a concentração de catalisador e a umidade, contribuindo positivamente para a maximização das respostas.

4.2 ETAPA II: Identificação de condições ótimas de processo a partir da superfície de resposta.

Na ETAPA I foi evidenciado que as variáveis concentração de catalisador e umidade são as de maior efeito para a maximização das respostas tanto do Índice de Fracionamento como da recuperação global. Uma vez que o aumento do nível da variável umidade provoca maior consumo de energia no processo, e os resultados alcançados com 30% de umidade na primeira etapa foram próximos dos resultados obtidos com 50%, optou-se por fixar a variável umidade no nível de 30% para o planejamento da ETAPA II.

Apesar de na maior parte da ETAPA I não se observar o efeito significativo das variáveis pressão e tempo, quando comparados com os efeitos das variáveis concentração de catalisador e umidade, optou-se por manter a pressão e o tempo como variáveis de estudo, porém a faixa de investigação foi ampliada. Por exemplo, no caso da variável tempo foi investigado de 2 a 10 min ao invés de 4 a 8 min como foi na primeira etapa. Dessa forma as 3 variáveis investigadas no planejamento DCCR da ETAPA II foram pressão, tempo e concentração de catalisador.

Nas Tabela 6 e Tabela 7 são apresentados os níveis investigados para cada uma das variáveis e a matriz de planejamento completa para o planejamento DCCR da ETAPA II.

Tabela 6: Níveis investigados para cada uma das variáveis.

3 Fatores	5 Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Pressão (Kgf/cm²) (temp.)*	10 (180°C)	12 (188°C)	14 (195°C)	16 (201°C)	17 (204°C)
Tempo (min)	2	4	6	8	10
Catalisador (% m/m)**	0,5	0,9	1,5	2,1	2,5

*Temperatura de equilíbrio do vapor na pressão investigada.

**Percentual em relação à massa seca da biomassa (Palha de cana-de-açúcar).

Tabela 7: Matriz experimental completa para o planejamento DCCR.

Ensaio	Pressão (Kgf/cm²)	Tempo (min)	Catalisador (% m/m)
1	12	4	0,9
2	16	4	0,9
3	12	8	0,9
4	16	8	0,9
5	12	4	2,1
6	16	4	2,1
7	12	8	2,1
8	16	8	2,1
9	10	6	1,5
10	17	6	1,5
11	14	2	1,5
12	14	10	1,5
13	14	6	0,5
14	14	6	2,5
15	14	6	1,5
16	14	6	1,5
17	14	6	1,5
18	14	6	1,5

Todos os procedimentos de preparo e análises de amostras, assim como procedimentos de realização dos experimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram realizados exatamente como na ETAPA I e descritos no Item 3.

4.2.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar “in-natura”

A palha de cana-de-açúcar utilizada na ETAPA II foi proveniente de um fardo de palha (Figura 52) obtido após o processo de enfardamento da palha realizado em Maio de 2013 na Usina Santa Maria, localizada em Cerquilha-SP, aproximadamente 60 km de distância do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba-SP. Da mesma forma que a palha coletada no campo para os experimentos da ETAPA I, a palha obtida do fardo foi picada e umedecida como descrita no item 3.4.



Figura 52: Fardos de palha de cana-de-açúcar.

Na Figura 53 é apresentada a composição da palha de cana-de-açúcar utilizada na ETAPA II do planejamento experimental em comparação com a palha utilizada na ETAPA I. Como pode ser observado os valores estão dentro da faixa comumente reportada na literatura (Tabela 4). No caso da palha enfardada, usada na ETAPA II, observa-se principalmente um maior teor de cinzas, e essa é uma característica evidenciada com frequência devido ao processo de enfardamento que incorpora terra ao fardo quando a operação não é realizada de forma correta. Apesar de não ser evidenciado durante os

experimentos, o maior teor de sílica pode acarretar problemas para o processo em escala industrial, principalmente desgastes dos equipamentos devido a abrasividade e também perda de eficiência do pré-tratamento devido ao aumento da capacidade tamponante da biomassa que reduz o pH do meio reacional (Chen et al., 2012; Ramos, 2003).

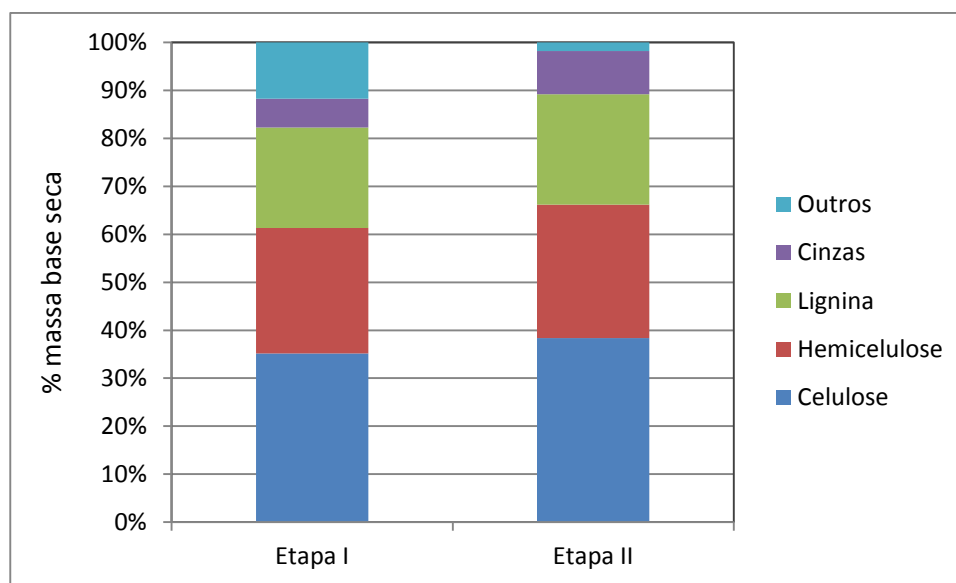


Figura 53: Comparação da composição da palha de cana-de-açúcar utilizada nas ETAPAS I e II.

4.2.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar

Na Figura 54 abaixo é apresentado o balanço de massa dos sólidos no processo, onde é possível observar o percentual de palha recuperada após pré-tratamento em relação à palha in-natura inicial. Foi obtida uma recuperação na faixa de 82 a 97% para os ensaios de 1 a 14 e uma média de 88% para os ensaios de 15 a 18 (pontos centrais) do planejamento DCCR. Pode-se observar que a menor recuperação alcançada (82%) foi na condição de maior tempo investigado (10 min), embora não seja a condição de maior pressão e concentração de catalisador, o que evidencia que operações acima desse tempo resultam em severidade elevada e não desejada para o processo. No caso dos ensaios conduzidos a baixa severidade observa-se maior recuperação na condição do ensaio 2 (16 kgf/cm², 4 min, 0,9% m/m cat.), apesar de que as condições do ensaio 1 (12 kgf/cm², 4 min, 0,9% m/m cat.) podem ser consideradas de menor severidade. Esse comportamento pode ser devido às dificuldades para medição, uma vez que o sistema de coleta de material não é totalmente fechado. De forma geral, dentro das condições investigadas, pode-se obter recuperações de sólidos da ordem de 94% sob diferentes condições de processo. Esses resultados são avaliados de forma mais detalhada a seguir, onde, por exemplo, os rendimentos de celulose e hemiceluloses são apresentados.

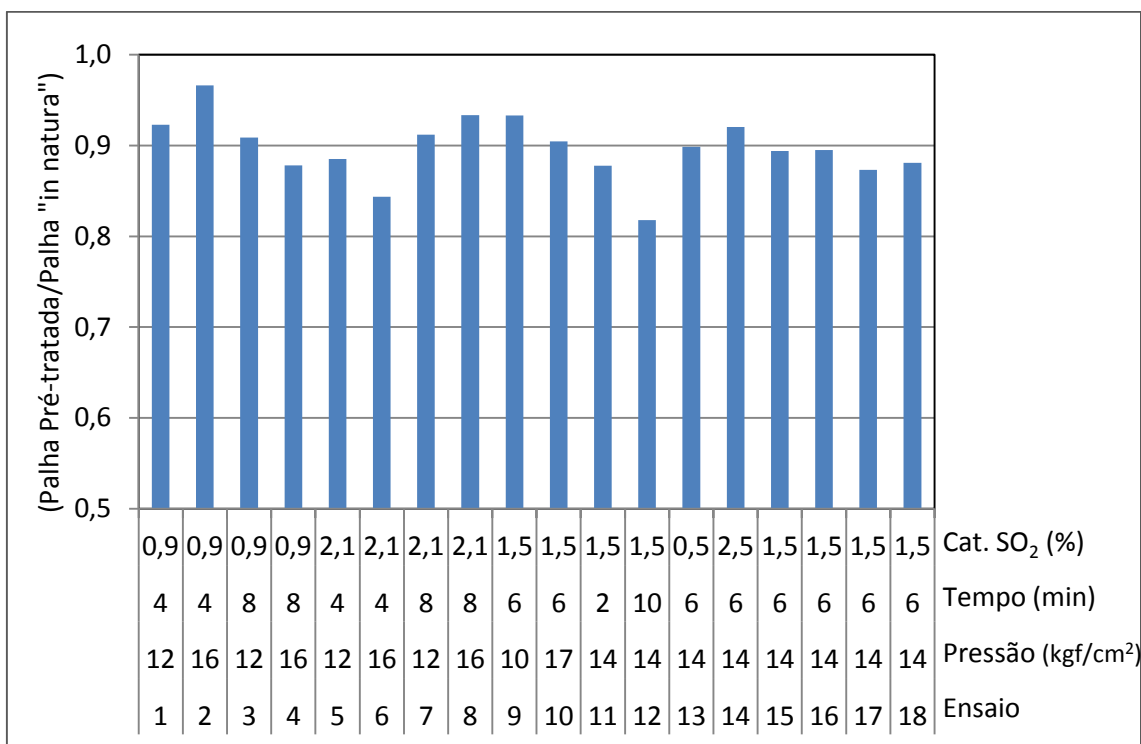


Figura 54: Rendimento do pré-tratamento, em relação a recuperação total de sólidos, para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.

Na Figura 55 são apresentados os resultados de glicose solúvel total (mono e oligo) recuperada no pré-hidrolisado. Como pode ser observado cerca de 3 a 6% da celulose é solubilizada na forma de glicose. Como é de se esperar, se pode observar que somente nas condições de maior severidade a razão oligo/mono é baixa, como por exemplo, no ensaio 8 e 10, que a razão calculada é 1,4 e 4,5. Nos casos de baixa severidade a maior parte da glicose solubilizada é encontrada na forma de oligômeros, podendo alcançar uma razão oligo/mono de até 33,3. No caso de o processo ser realizado somente visando a conversão da glicose essa solubilização deve ser evitada no processo, uma vez que se houver necessidade de separar a corrente de xilose (C5), para processamento isolado, a glicose solúvel pode ser considerada como perda. Nos casos onde não haverá separação da xilose a solubilização de glicose não interfere no rendimento do processo. Já para os processos onde existe a intenção de fermentar a xilose para produção de etanol essa solubilização pode ser desejada uma vez que alguns estudos já demonstraram que uma pequena quantidade de glicose no meio de fermentação é benéfica, pois facilita o transporte da xilose. Avaliando o índice de fracionamento, como foi visto no item 4.1.2 a solubilização de glicose contribui de forma negativa. As condições

investigadas nesse trabalho, tanto na ETAPA I quanto na ETAPA II do planejamento, permitiu menor solubilização quando comparada às condições de processo reportadas na literatura que alcançaram em torno de 30% de solubilização de celulose (Oliveira et al. 2013).

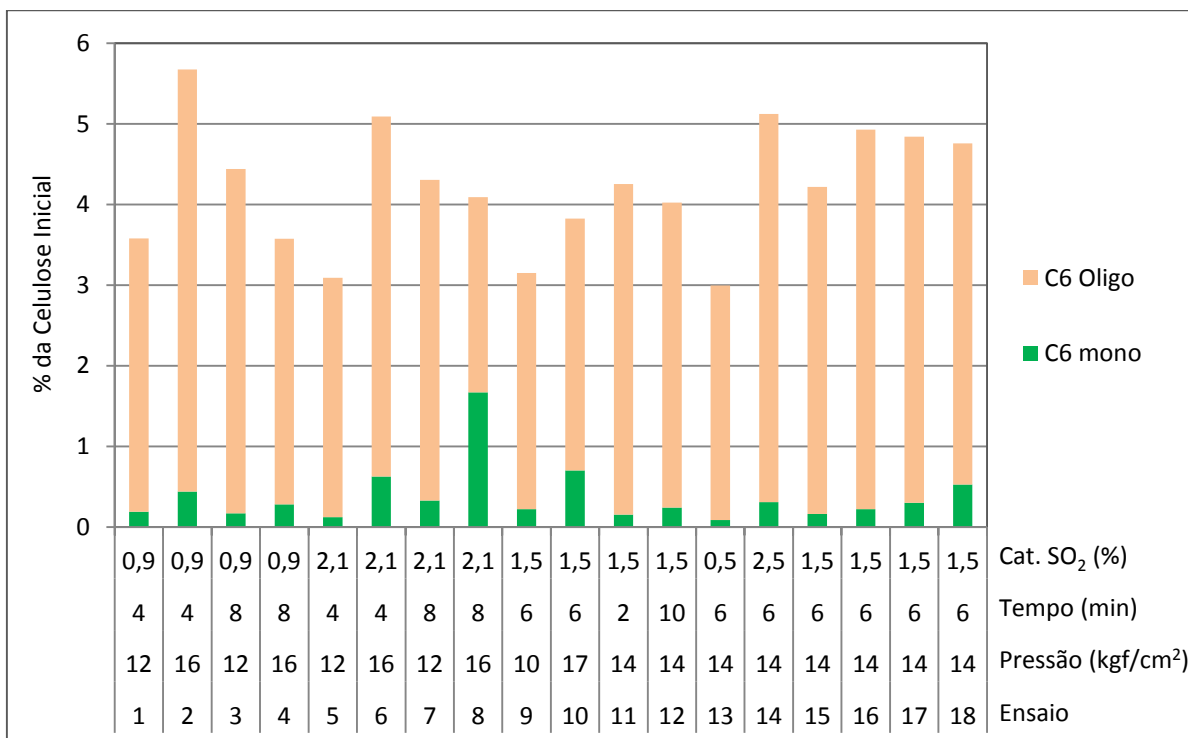


Figura 55: Glicose recuperada no pré-hidrolisado em relação à celulose da biomassa inicial (ETAPA II do planejamento).

Na Figura 56 são apresentados os resultados de xilose solúvel total (mono e oligo) recuperada no pré-hidrolisado. Como pode ser observado entre 16 e 40% das hemiceluloses presentes inicialmente na palha podem ser recuperadas solubilizadas na forma de xilose. Importante observar que nas condições de alta severidade (ensaios 4, 8 e 10) a quantidade observada de hemiceluloses solubilizadas é menor. Como é de se esperar em condições de alta severidade as hemiceluloses não somente são solubilizadas, como também a xilose resultante sofre degradação. Por meio da Figura 57, que apresenta o balanço de massa do pré-tratamento para as hemiceluloses, pode se notar que além da quantidade de xilose solúvel existe a fração de hemiceluloses que permanece na fibra. Nos casos de maior severidade a quantidade na fibra é menor, indicando que ocorreu a solubilização. Esse resultado confirma

que ocorreu a posterior degradação da xilose solubilizada. Ainda por meio da Figura 57 é possível observar que, no mínimo, em condições de baixa severidade (ensaio 5), em torno de 30% das hemiceluloses foram degradadas. Esses resultados evidenciam que para preservar as hemiceluloses durante o processo de pré-tratamento por explosão com vapor é necessário que o processo ocorra em condições de baixa severidade, por consequência, quantidade significativa de hemiceluloses permanecem na fibra e nesse caso o coquetel enzimático utilizado na etapa de hidrólise deverá ter quantidades substanciais de hemicelulases na sua composição.

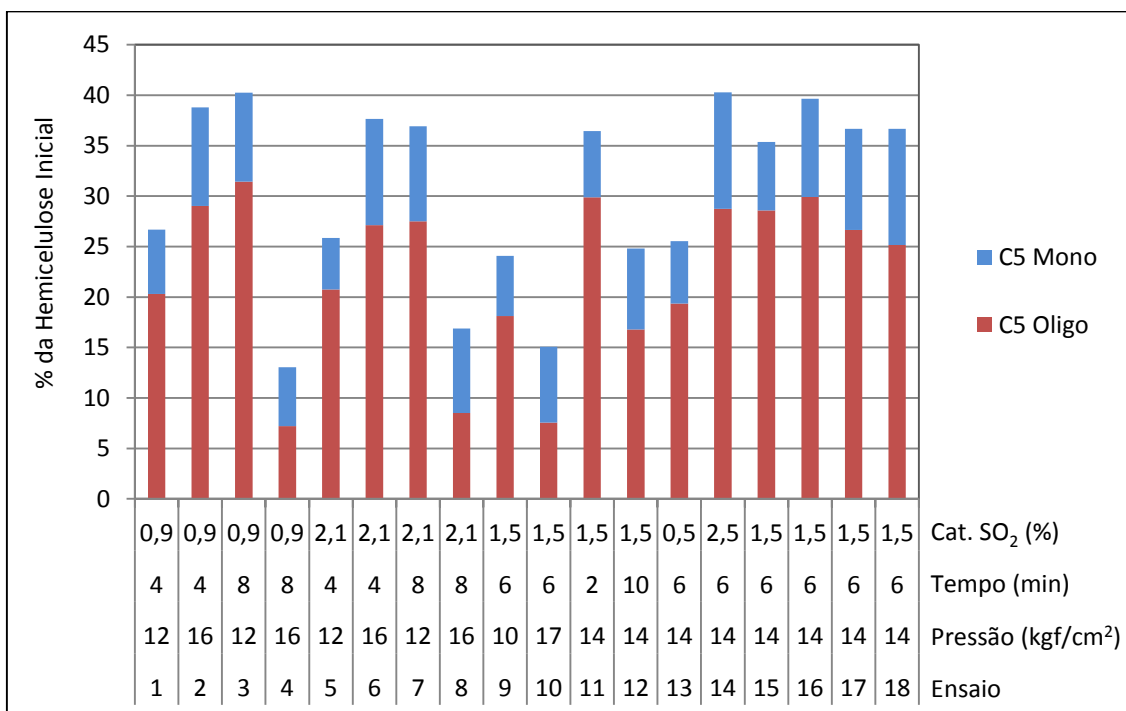


Figura 56: Xilose recuperada no pré-hidrolisado em relação a hemiceluloses da biomassa inicial (ETAPA II do planejamento).

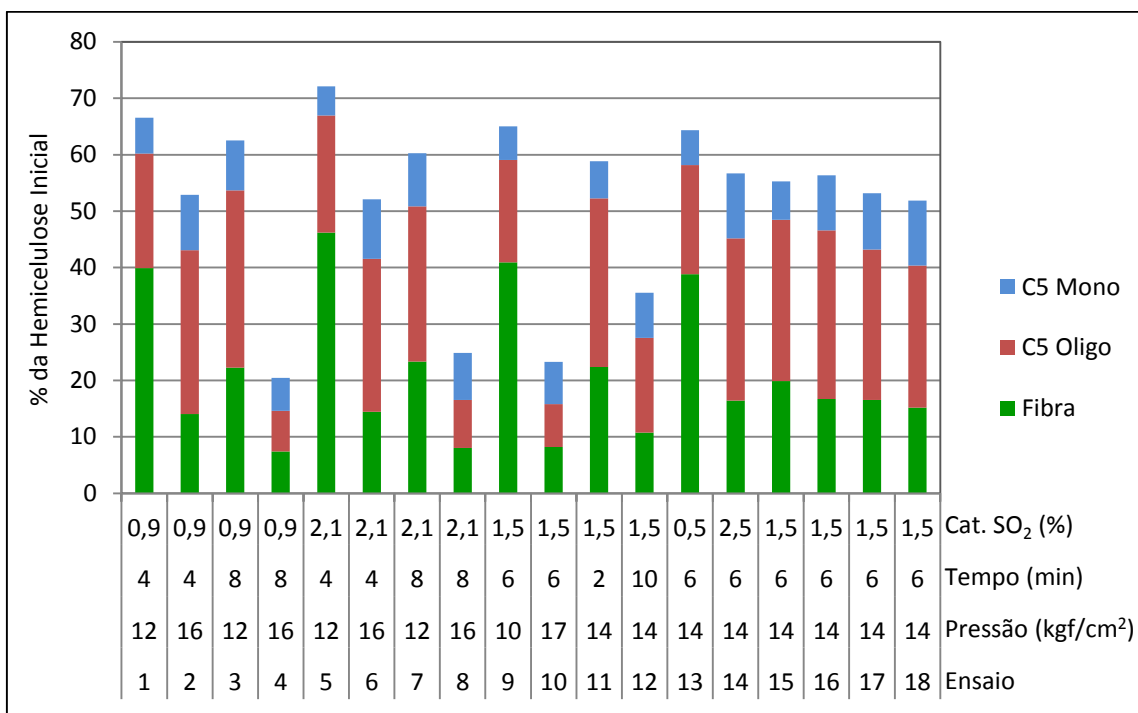


Figura 57: Balanço de massa do pré-tratamento para hemiceluloses.

Como apresentado nas discussões de resultados da ETAPA I do planejamento, o cálculo do Índice de Fracionamento pode ser utilizado para avaliar o pré-tratamento de forma integrada, levando em consideração o rendimento e a seletividade dos componentes celulose e hemiceluloses. Na Tabela 8 o Índice de Fracionamento para os ensaios da ETAPA II do planejamento são apresentados. Esses valores podem ser mais facilmente visualizados no gráfico apresentado na Figura 58. Pode ser observado que valores na faixa de 0,07 a 0,26 foram alcançados. Como na ETAPA I para todos os ensaios se pode observar que o rendimento de hemiceluloses é quem mais impacta negativamente o índice.

Tabela 8: Índice de Fracionamento calculado a partir dos rendimentos e seletividades dos componentes celulose e hemiceluloses de cada um dos ensaios da ETAPA II do planejamento.

Ensaio	Rendimento Celulose	Seletividade Celulose	Rendimento Hemiceluloses	Seletividade Hemiceluloses	Índice
1	0,83	0,74	0,27	0,85	0,14
2	0,89	0,90	0,39	0,83	0,26
3	0,83	0,84	0,40	0,87	0,24
4	0,78	0,94	0,13	0,73	0,07
5	0,93	0,74	0,26	0,86	0,15
6	0,84	0,89	0,38	0,85	0,24
7	0,94	0,85	0,37	0,86	0,26
8	0,93	0,94	0,17	0,75	0,11
9	0,95	0,76	0,24	0,85	0,15
10	0,96	0,94	0,15	0,74	0,10
11	0,86	0,84	0,36	0,86	0,23
12	0,86	0,92	0,25	0,82	0,16
13	0,94	0,77	0,26	0,86	0,16
14	0,87	0,88	0,40	0,85	0,26
15	0,89	0,86	0,35	0,86	0,23
16	0,86	0,88	0,40	0,86	0,26
17	0,86	0,88	0,37	0,85	0,23
18	0,78	0,88	0,37	0,85	0,21
Média PC*	0,85	0,87	0,37	0,85	0,23

*Valores médios calculados a partir dos 4 valores do ponto central (Ensaios 15 à 18).

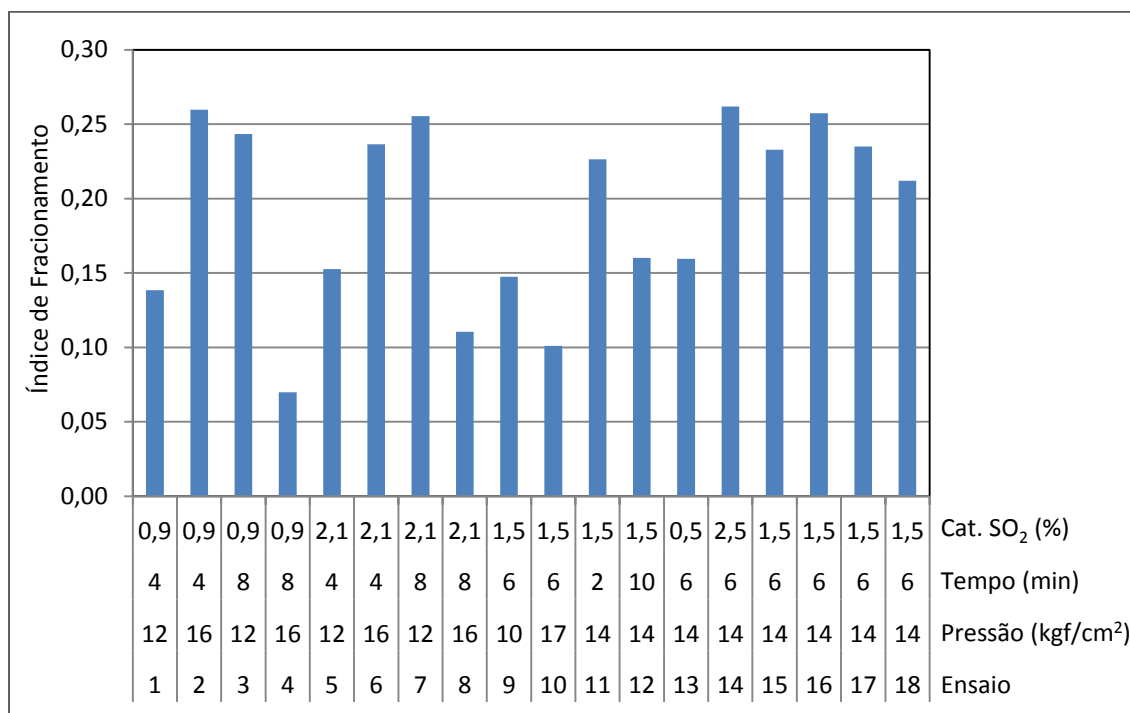


Figura 58: Índice de Fracionamento da Biomassa durante o processo de pré-tratamento (ETAPA II do planejamento).

Por meio do diagrama de Pareto apresentado na Figura 59 se pode observar que as variáveis de maior efeito são a Pressão e o Tempo, assim como a interação entre elas, impactando negativamente o Índice. A concentração de catalisador também é um fator significativo, porém impacta de forma positiva o índice. Esses resultados fazem todo sentido, uma vez que o aumento da severidade, por meio do aumento da pressão e do tempo, somente contribui para a degradação das hemiceluloses e solubilização da celulose, que são resultados indesejáveis e contribuem para menores valores do índice de fracionamento.

Com o objetivo de gerar o modelo que relaciona o resultado do Índice de Fracionamento em função das variáveis de processo investigadas, uma análise mais detalhada dos efeitos das variáveis é apresentada na Tabela 9, onde se pode observar o erro padrão dos efeitos, assim como o “p” valor calculado considerando 90% de confiança (fatores significativos se $p < 0,10$).

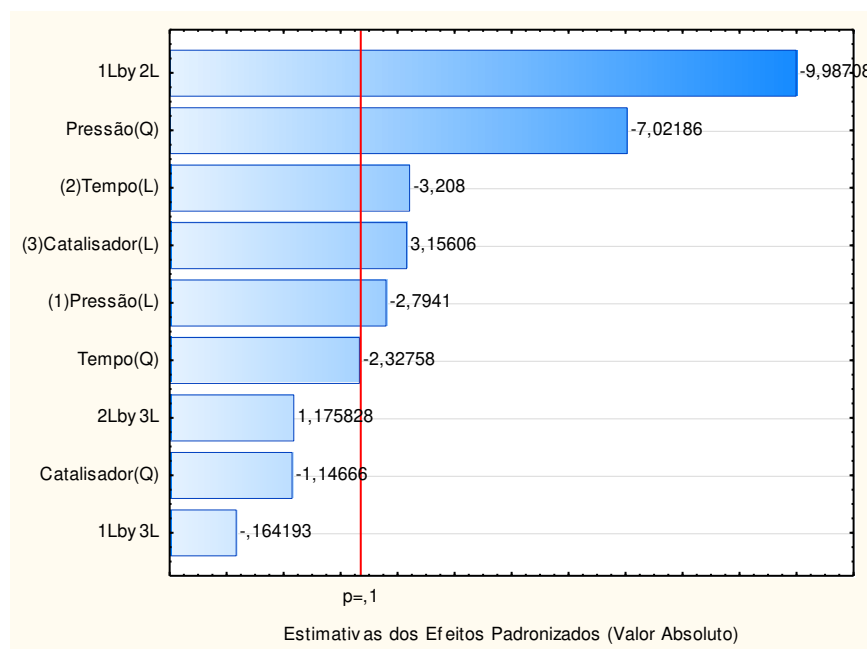


Figura 59: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre o Índice de Fracionamento da Biomassa.

Tabela 9: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

	Efeito	Erro padrão	t(3)	p
Média	0,233774	0,009251	25,26903	*0,000136
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	-0,028036	0,010034	-2,79410	*0,068186
Pressão (Kgf/cm²) (Q)	-0,073285	0,010437	-7,02186	*0,005933
(2) Tempo (min) (L)	-0,032189	0,010034	-3,20800	*0,049031
Tempo (min) (Q)	-0,024292	0,010437	-2,32758	0,102374
(3) Catalisador (%) (L)	0,031667	0,010034	3,15606	*0,051026
Catalisador (%) (Q)	-0,011967	0,010437	-1,14666	0,334686
1 x 2 (L)	-0,130872	0,013104	-9,98708	*0,002136
1 x 3 (L)	-0,002152	0,013104	-0,16419	0,880018
2 x 3 (L)	0,015408	0,013104	1,17583	0,324481

*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança (p<0,10)

Analisando a Tabela 9 nota-se que o efeito quadrático (Q) do tempo e do catalisador, assim como a interação linear (L) dos efeitos da pressão/catalisador (1x3) e do tempo/catalisador (2x3) não se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Para analisar a resposta das variáveis de processo investigadas por meio da superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo é descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(3)	p
Média	0,217660	0,005797	37,54839	0,000042
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	-0,014018	0,010034	-2,79410	0,068186
Pressão (Kgf/cm²) (Q)	-0,033516	0,010055	-6,66677	0,006881
(2) Tempo (min) (L)	-0,016094	0,010034	-3,20800	0,049031
(3) Catalisador (%) (L)	0,015834	0,010034	3,15606	0,051026
1 x 2 (L)	-0,065436	0,013104	-9,98708	0,002136

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos expostos na Tabela 10 pode-se definir a Equação 8 que representa o modelo quadrático que relaciona o Índice de Fracionamento em função das variáveis de processo. Os valores da Pressão (P), Tempo (T) e Catalisador (C) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$\begin{aligned} \text{Índice de Fracionamento (IF)} = & 0,217660 - 0,014018P - 0,033516P^2 - \\ & 0,016094T + 0,015834C - 0,065436PT \end{aligned} \quad \text{Equação 8}$$

A validade do modelo pode ser verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11. O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 21,33 que é maior que o valor tabelado ($F_{(tab.)5,12} = 2,39$), concluindo assim que a equação do modelo quadrático é significativa a 90%. O modelo estudado não apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 1,82 que é menor que o valor tabelado ($F_{(tab.)9,3} = 5,24$).

Tabela 11: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	0,059155	5	0,011831	21,33 ¹
Resíduos	0,006658	12	0,000555	
Falta de ajuste	0,005627	9	0,000625	1,82 ²
Erro puro	0,001030	3	0,000343	
Total	0,065813	17		
% de variação explicada (R ²)	89,88			
% máxima de variação explicável	98,43			

¹ Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

² Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Obs: Valores calculados pelo software STATISTICA 12

Nas Figura 60, Figura 61 e Figura 62 são apresentadas as superfícies de respostas que representam o modelo, sempre em função de duas variáveis e mantendo a terceira variável fixa no nível central do planejamento (0), lembrando que os valores são codificados (Tabela 6). Deve-se perceber que as superfícies estão apresentadas de forma extrapoladas, uma vez que os níveis experimentais reais variam de -1,68 a +1,68 e nas superfícies apresentadas variam de -2,0 a +2,0.

Por meio da superfície de resposta apresentada na Figura 60 é possível observar duas regiões de ótimo, onde Índices de Fracionamento em torno de 0,26 podem ser alcançados. A primeira região é alcançada quando empregado longo período de tempo e baixa pressão e a segunda região é alcançada quando é empregado curto período de tempo e alta pressão, ou seja, uma variável compensa a outra, de modo que na região onde as duas variáveis estão no maior nível é observado uma redução no Índice de Fracionamento.

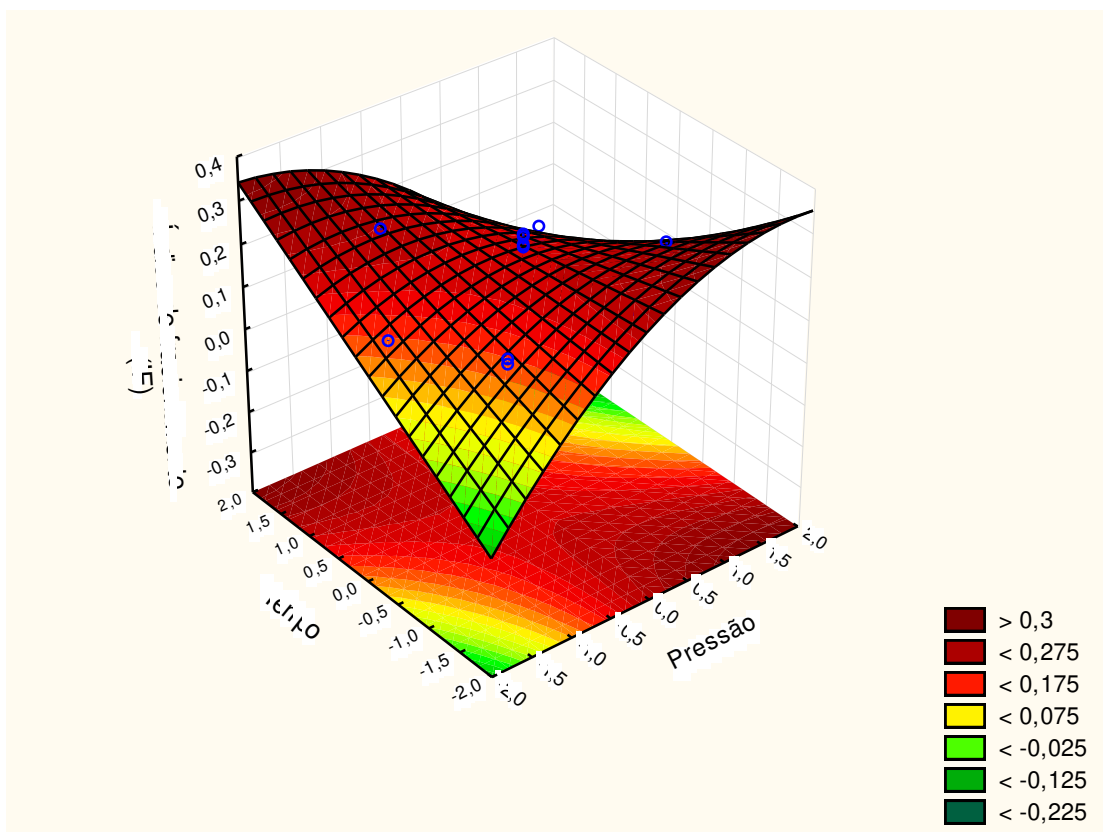


Figura 60: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).

Por meio da superfície de resposta apresentada na Figura 61 é possível observar claramente um ponto ótimo de operação para a pressão em torno do nível central (0) do planejamento. Também pode ser observado que o resultado nesse ponto ótimo de pressão aumenta com o aumento da concentração de catalisador.

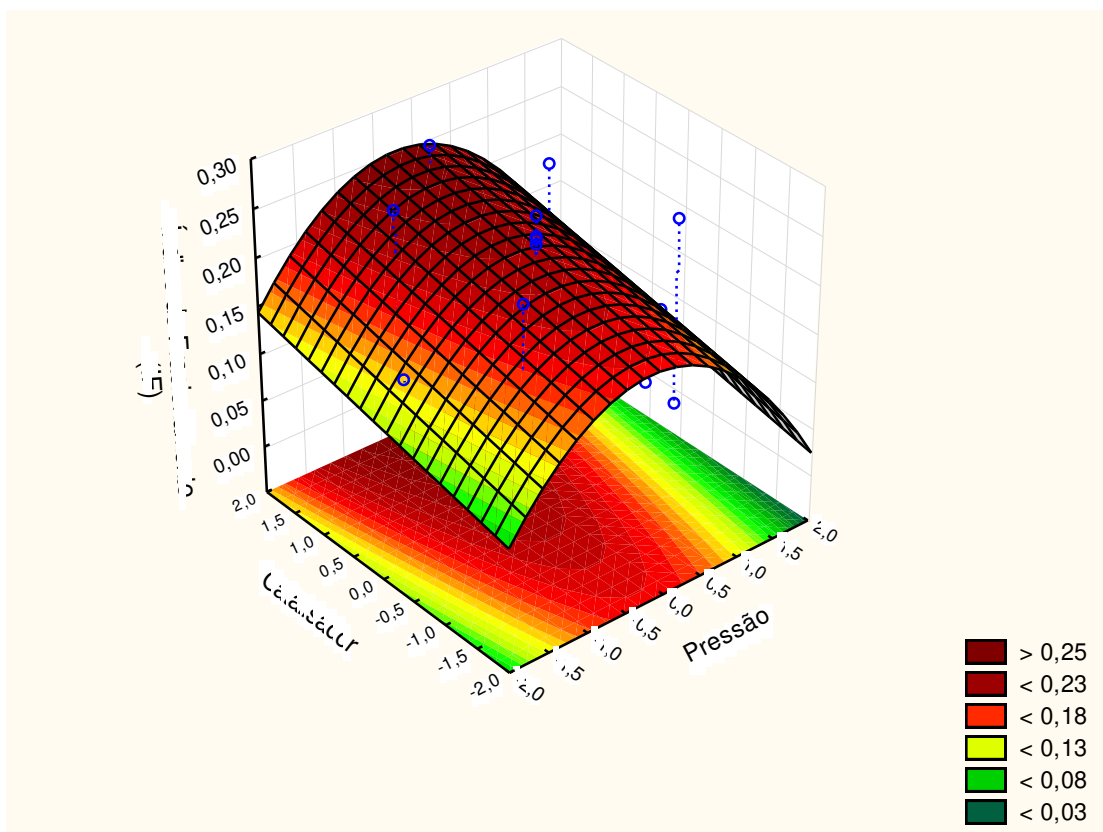


Figura 61: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do catalisador e da pressão, mantendo o tempo no nível central (0).

Por meio da superfície de resposta apresentada na Figura 62 é possível observar que o aumento do tempo já é prejudicial quando a pressão é mantida fixa no nível central (0) do planejamento; logo, deve-se buscar operar em períodos mais curtos de tempo, e o aumento da concentração de catalisador contribui para a melhora do Índice de Fracionamento.

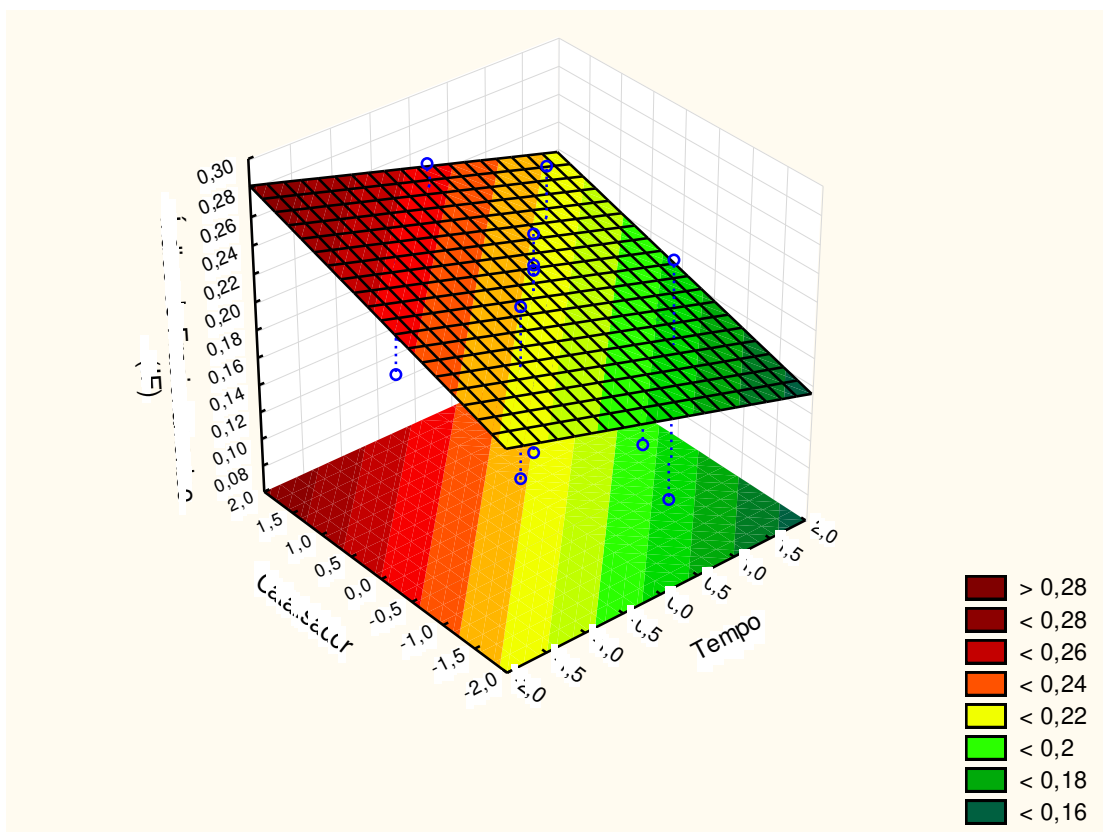


Figura 62: Superfície de resposta para o Índice de Fracionamento em função do catalisador e do tempo, mantendo a pressão no nível central (0).

De forma geral, a partir das condições de processo investigadas é possível estimar que o Índice de Fracionamento máximo factível de ser alcançado é em torno de 0,26, demonstrando que do ponto de vista de fracionamento dos componentes celulose e hemiceluloses o pré-tratamento por explosão com vapor é limitado, devido principalmente ao fato de não solubilizar de forma expressiva as hemiceluloses sem que ocorra a degradação dessa fração.

4.2.3 Hidrólise Enzimática da palha de cana-de-açúcar

Na Figura 63 são apresentados os valores de concentração de glicose após 24 e 48 h de hidrólise enzimática para todas as condições investigadas. Pode-se observar valores da ordem de 11 a 23 g/L em 24 h de reação e valores da ordem de 14 a 28 g/L para 48 h de reação. A diferença calculada entre os valores de 24 e 48 h pode ser de 9 a 36 %, evidenciando que em alguns casos o maior tempo empregado para se obter maior conversão pode compensar o investimento em equipamentos maiores para essa finalidade. De forma geral os melhores resultados são obtidos nas condições de maior severidade, o que indica que a solubilização das hemiceluloses é importante para o coquetel enzimático empregado, ou seja, demonstra falta de hemicelulases no coquetel.

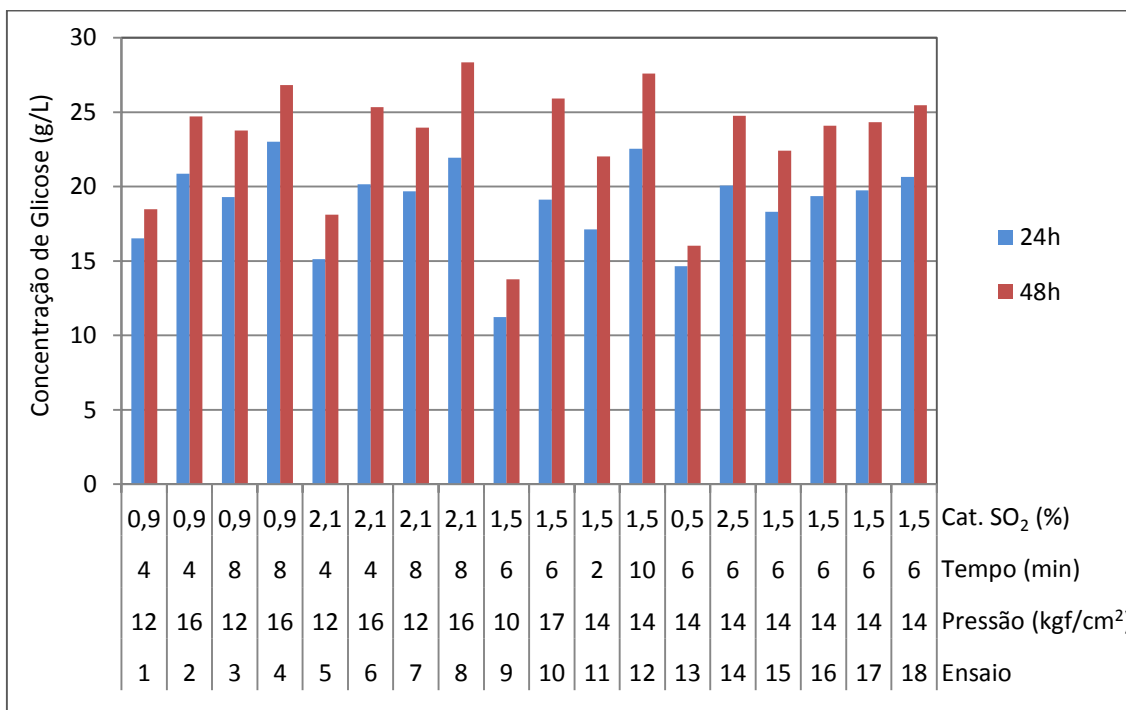


Figura 63: Concentrações de glicose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.

O efeito da severidade comentado no parágrafo anterior também pode ser observado nas Figura 64 e Figura 65, onde são apresentados os diagramas de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose após 24 e 48 h de hidrólise enzimática,

respectivamente. Pode-se observar que as variáveis de maior efeito são a pressão e o tempo, principais responsáveis pela severidade do processo e como foi visto anteriormente, solubilização e degradação das hemiceluloses.

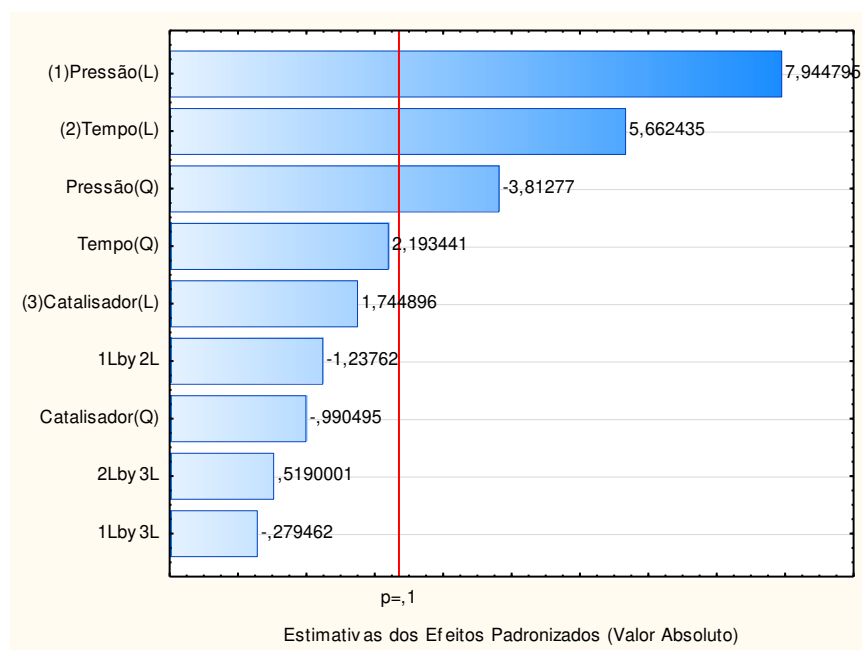


Figura 64: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose após 24 h de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).

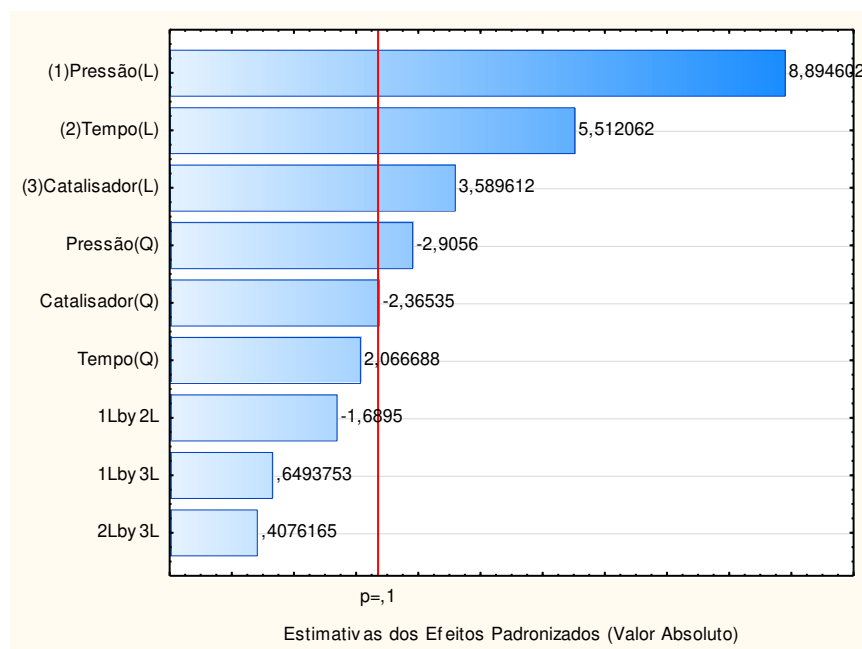


Figura 65: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a concentração de glicose após 48 h de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).

Os resultados de conversão enzimática apresentados na Figura 66 seguem o mesmo comportamento da concentração de glicose apresentados na Figura 63. Conversões de 30 a 70% são alcançadas em 24 h de reação enquanto que para 48 h de reação a faixa de conversão varia de 37 a 82%. Esses resultados são bastante expressivos, uma vez que se utilizou uma carga enzimática baixa (2 FPU/g de biomassa), e ao mesmo tempo demonstram a evolução do desenvolvimento das enzimas, uma vez que resultados semelhantes (80%) para conversão enzimática de palha só foram alcançados com carga enzimática muito superior (15 FPU/g de biomassa) quando se utilizaram as primeiras enzimas disponíveis para esse tipo de investigação, a Celluclast 1.5 L (Oliveira et al. 2013).

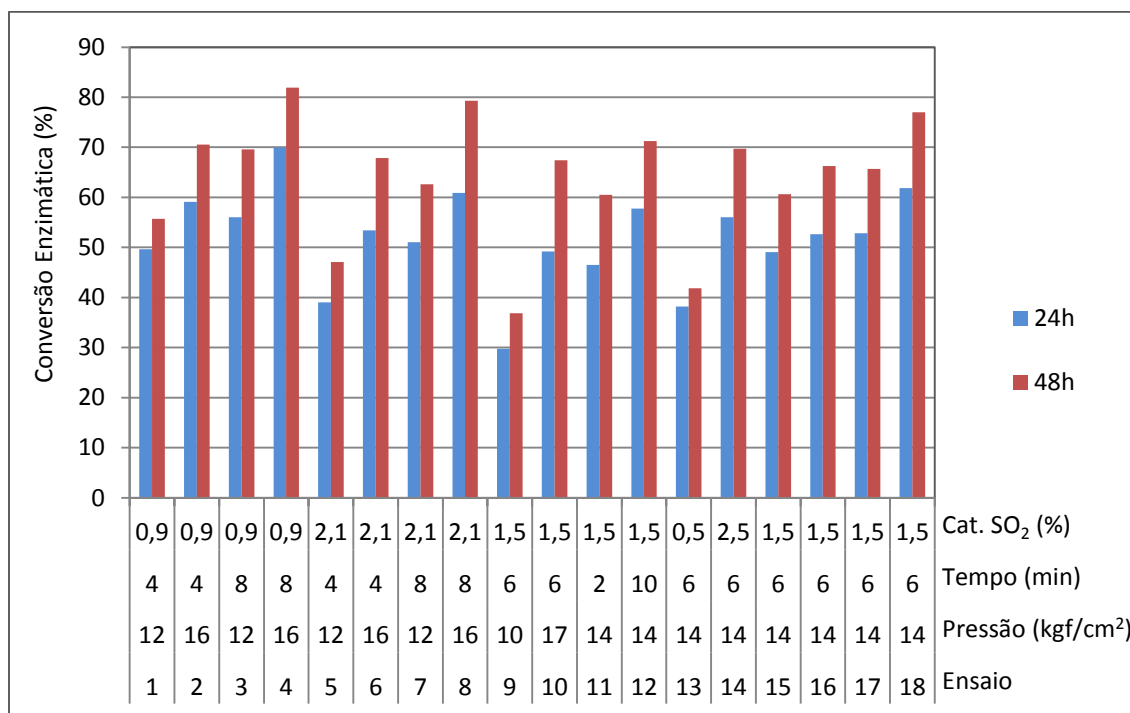


Figura 66: Conversão enzimática da celulose obtidas nos ensaios de hidrólise enzimática para cada uma das condições investigadas na ETAPA II do planejamento.

Por meio dos diagramas de Pareto apresentados nas Figura 67 e Figura 68 pode-se observar que as variáveis de maior efeito são as mesmas observadas para a concentração de glicose. Uma avaliação mais detalhada desses efeitos é apresentada na Tabela 12 onde pode-se observar o erro padrão dos efeitos, assim como o “p” valor calculado para 90% de confiança ($p < 0,10$).

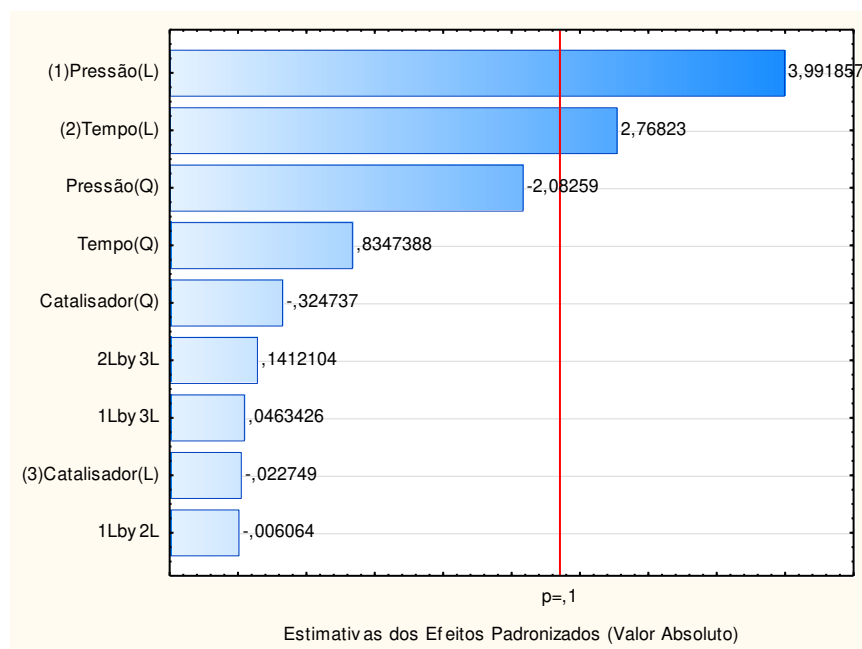


Figura 67: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática após 24 h (ETAPA II do planejamento).

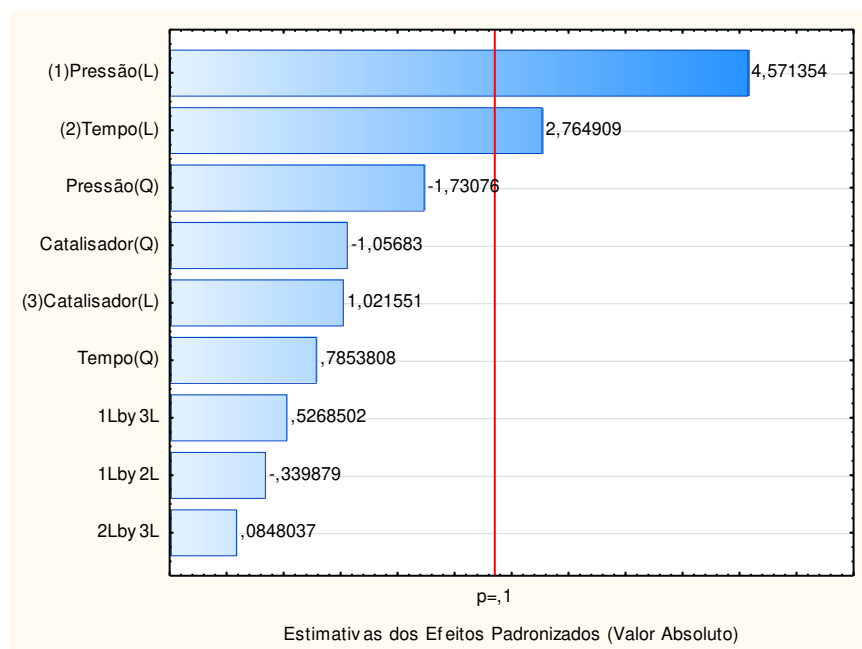


Figura 68: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a conversão enzimática após 48 h (ETAPA II do planejamento).

Tabela 12: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para a Conversão Enzimática (48 h)

	Efeito	Erro padrão	t(3)	p
Média	66,92437	3,429576	19,51389	*0,000294
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	17,00383	3,719648	4,57135	*0,019641
Pressão (Kgf/cm²) (Q)	-6,69628	3,868975	-1,73076	0,181927
(2) Tempo (min) (L)	10,28449	3,719648	2,76491	*0,069865
Tempo (min) (Q)	3,03862	3,868975	0,78538	0,489546
(3) Catalisador (%) (L)	3,79981	3,719648	1,02155	0,382186
Catalisador (%) (Q)	-4,08884	3,868975	-1,05683	0,368166
1 x 2 (L)	-1,65107	4,857809	-0,33988	0,756353
1 x 3 (L)	2,55934	4,857809	0,52685	0,634770
2 x 3 (L)	0,41196	4,857809	0,08480	0,937760

*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança (p<0,10)

Analisando a Tabela 12 nota-se que o efeito linear da pressão e do tempo foram os únicos que se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Para analisar a resposta das variáveis de processo investigadas por meio da superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo é descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(3)	p
Média	63,98827	1,619270	39,51675	0,000036
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	8,50191	3,719648	4,57135	0,019641
(2) Tempo (min) (L)	5,14224	3,719648	2,76491	0,069865

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos expostos na Tabela 13 pode-se definir a Equação 9 que representa o modelo linear que relaciona a conversão enzimática em 48 h em função das variáveis de processo pressão e tempo.

$$\text{Conversão Enzimática (\%)} = 63,98827 + 8,50191P + 5,14224T \quad \text{Equação 9}$$

A validade do modelo pode ser verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 14. O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 8,59 que é maior que o valor tabelado ($F_{(tab.)2,15} = 2,70$), concluindo assim que a equação do modelo quadrático é significativa a 90%. O modelo estudado não apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 1,83 que é menor que o valor tabelado ($F_{(tab.)12,3} = 5,22$).

Tabela 14: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	1347,085901	2	673,542950	8,59
Resíduos	1176,460619	15	78,430708	
Falta de ajuste	1034,871	12	86,239232	1,83
Erro puro	141,590	3	47,196614	
Total	2523,547	17		
% de variação explicada (R^2)	53,38			
% máxima de variação explicável	94,39			

¹ Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

² Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Obs: Valores calculados pelo software STATISTICA 12

O modelo descrito pela Equação 9, que relaciona a conversão enzimática da palha de cana-de-açúcar, após em 48 h de reação, em função das variáveis de processo pressão e tempo, pode ser representado pela superfície de resposta apresentada na Figura 69. É possível observar claramente na superfície de resposta que, no caso do coquetel enzimático utilizado nesse estudo, o pré-tratamento realizado em condições de elevada pressão e tempo permite alcançar maiores conversões na hidrólise enzimática.

É importante reforçar que condições de elevada severidade devem ser evitadas uma vez que parte significativa das hemiceluloses podem ser degradadas e, além de perda dessa fração, compostos inibitórios para a fermentação são gerados. Nesse contexto melhores condições de pré-tratamento devem ser desenvolvidas em conjunto com o desenvolvimento do melhor coquetel enzimático; por exemplo, é possível utilizar hemicelulases em combinação com celulasas para aumentar a conversão da celulose mesmo quando a biomassa

é pré-tratada em condições de baixa severidade, onde parte significativa das hemiceluloses são mantidas na fibra (Petersen et al., 2009).

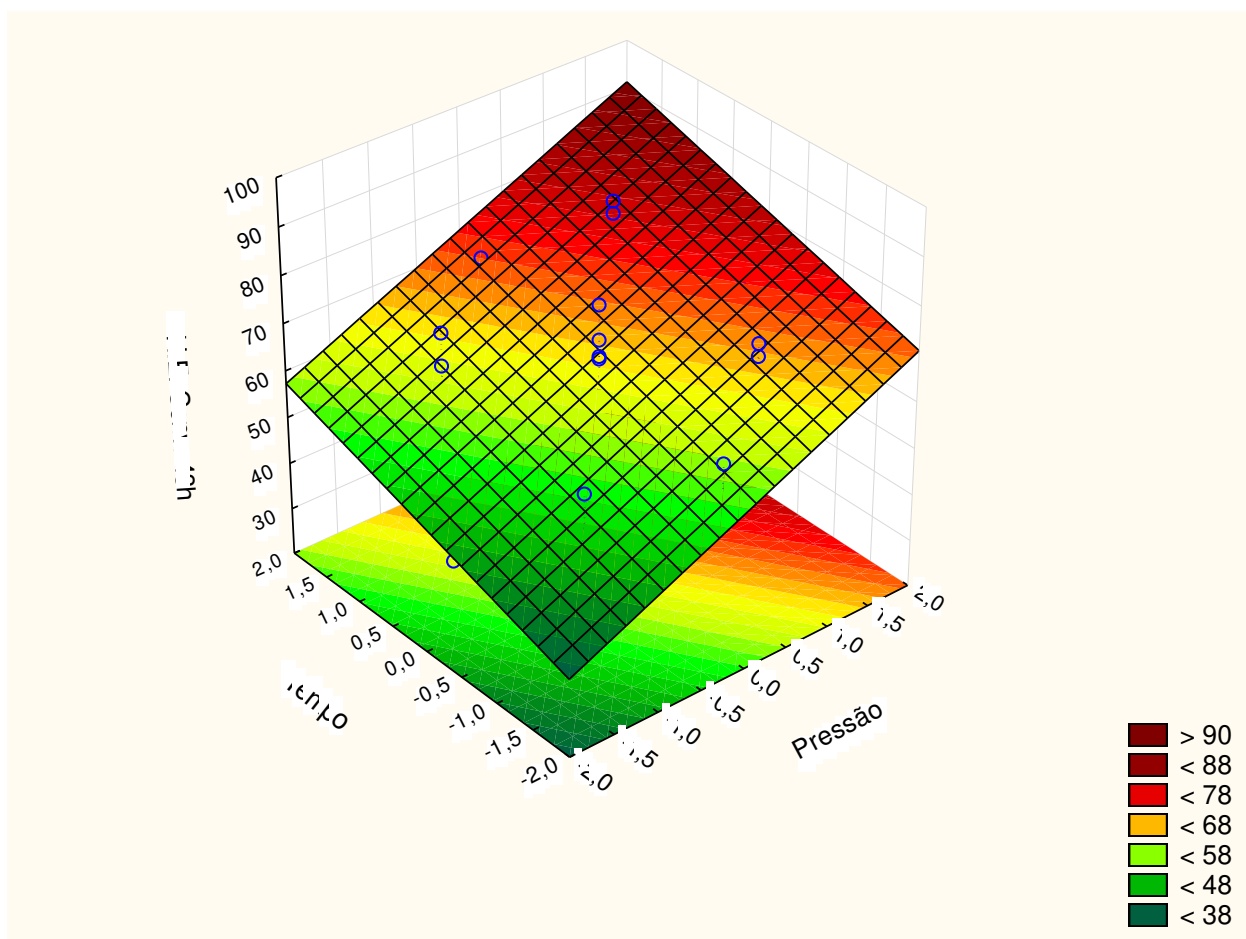


Figura 69: Superfície de resposta para a Conversão Enzimática em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).

4.2.4 Recuperação Global

Após avaliar os resultados de pré-tratamento e hidrólise enzimática separadamente, essas duas etapas são avaliadas de forma integrada por meio da Recuperação Global de glicose (Figura 70), conforme item 4.1.4. Pode-se observar um valor médio de 50 e 60% após 24 e 48 h de hidrólise enzimática, respectivamente. O máximo de 77,5% em 48 h foi alcançado na condição do ensaio 8. A conversão enzimática elevada nessa condição contribuiu com maior impacto para a maior recuperação global, uma vez que do ponto de vista de recuperação de glicose no pré-tratamento não há diferenças extremas significativas entre as condições investigadas, principalmente se for considerado o fato de a glicose solubilizada não ser separada após o pré-tratamento, permanecendo no processo e naturalmente sendo contabilizada na recuperação global.

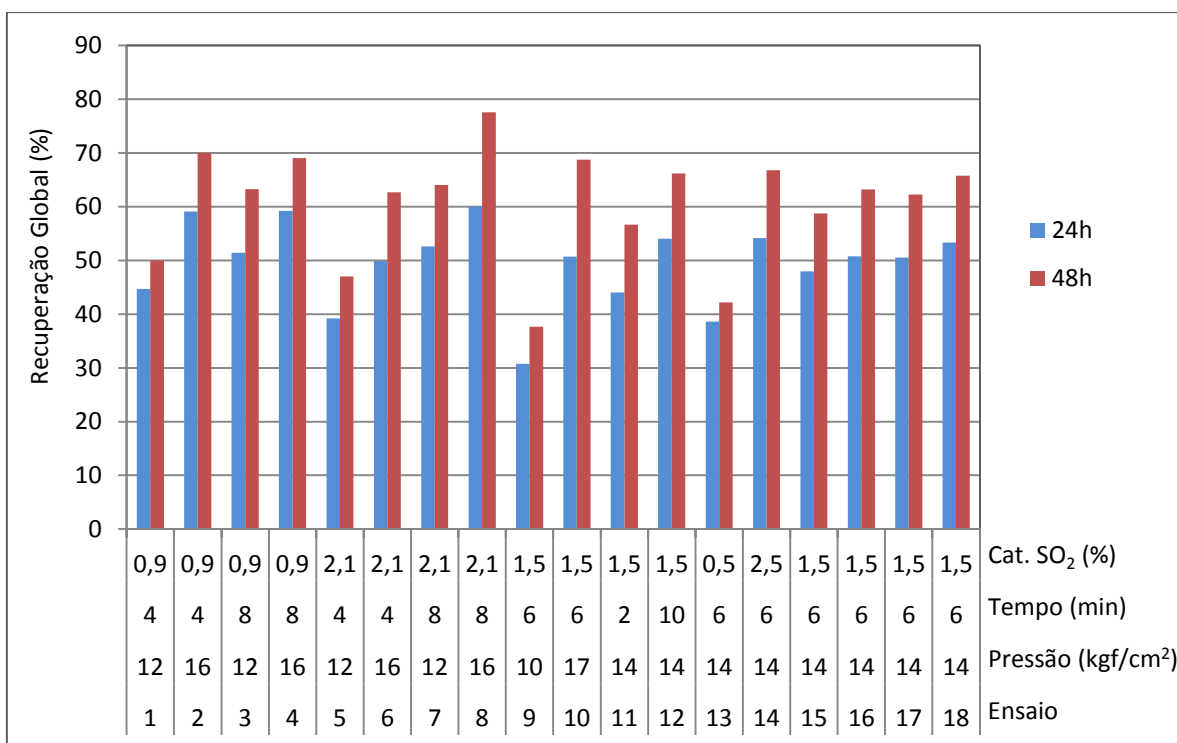


Figura 70: Recuperação Global de glicose após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).

Nas Figura 71 e Figura 72 são apresentados os diagramas de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 24 e 48 h de reação de hidrólise enzimática, respectivamente. Como comentado anteriormente, a maior diferença

de rendimento de glicose entre as condições investigadas acontece na hidrólise enzimática, de forma que as variáveis de maior efeito observadas, pressão e tempo, são as mesmas observadas para a hidrólise enzimática.

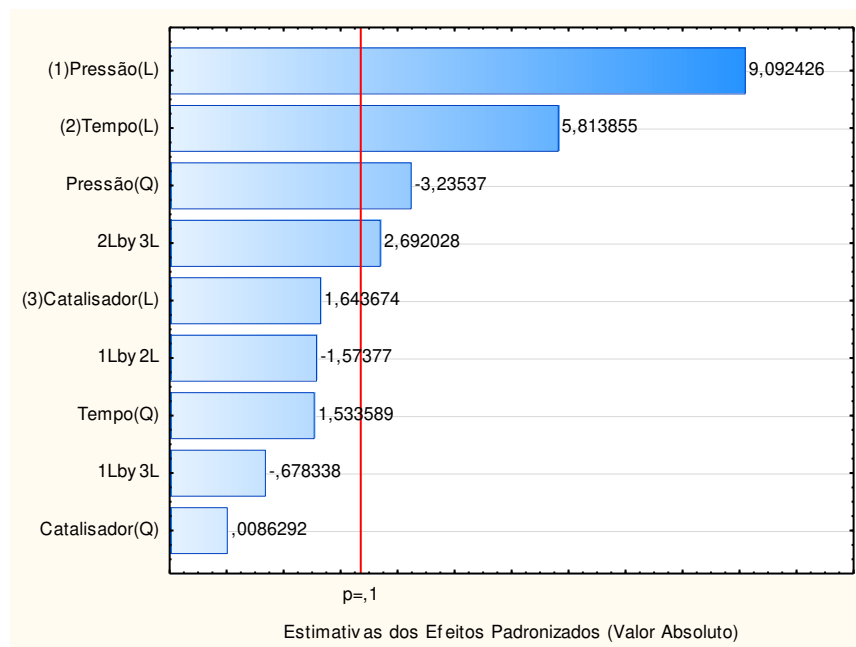


Figura 71: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 24 h de reação de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).

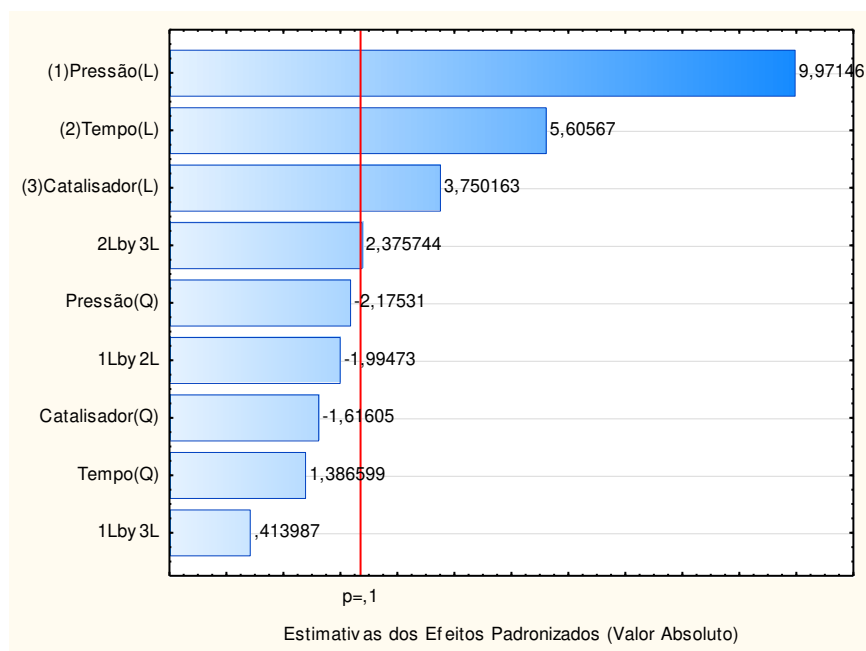


Figura 72: Diagrama de Pareto relacionando o efeito das variáveis sobre a recuperação global do processo, considerando 48 h de reação de hidrólise enzimática (ETAPA II do planejamento).

Tabela 15: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis do planejamento composto central para o Rendimento Global (Considerando 48 h de Hidrólise Enzimática).

	Efeito	Erro padrão	t(3)	p
Média	62,12102	1,451305	42,80356	*0,000028
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	15,69564	1,574056	9,97146	*0,002146
Pressão (Kgf/cm²) (Q)	-3,56152	1,637247	-2,17531	0,117867
(2) Tempo (min) (L)	8,82364	1,574056	5,60567	*0,011219
Tempo (min) (Q)	2,27020	1,637247	1,38660	0,259639
(3) Catalisador (%) (L)	5,90297	1,574056	3,75016	*0,033113
Catalisador (%) (Q)	-2,64587	1,637247	-1,61605	0,204502
1 x 2 (L)	-4,10055	2,055695	-1,99473	0,140040
1 x 3 (L)	0,85103	2,055695	0,41399	0,706701
2 x 3 (L)	4,88380	2,055695	2,37574	*0,097994

*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança (p<0,10)

Analisando a Tabela 15 nota-se que o efeito linear da pressão, do tempo e do catalisador, assim como a interação linear dos efeitos do tempo/catalisador (2x3) se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Para analisar a resposta das variáveis de processo investigadas na superfície de resposta, os coeficientes não significativos foram eliminados e o modelo é descrito pelos coeficientes mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento composto central para o Índice de Fracionamento.

	Coefficiente de Regressão	Erro padrão	t(3)	p
Média	60,62874	0,685232	88,47918	0,000003
(1) Pressão (Kgf/cm²) (L)	7,84782	0,787028	9,97146	0,002146
(2) Tempo (min) (L)	4,41182	0,787028	5,60567	0,011219
(3) Catalisador (%) (L)	2,95148	0,787028	3,75016	0,033113
2 x 3 (L)	2,44190	1,027848	2,37574	0,097994

Com os valores dos coeficientes de regressão estatisticamente significativos expostos na Tabela 16 pode-se definir a Equação 10 que representa o modelo linear que relaciona o rendimento global após 48 h de hidrólise enzimática em função das variáveis de processo investigadas.

$$\text{Rendimento Global (\%)} = 60,62874 + 7,84782P + 4,41182T + 2,95148C + 2,44190TC \quad \text{Equação 10}$$

A validade do modelo pode ser verificada pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 17. O teste F calculado para verificar a regressão do modelo apresentou um valor de 7,53 que é maior que o valor tabelado ($F_{(tab.)4,13} = 2,43$), concluindo assim que a equação do modelo quadrático é significativa a 90%. Entretanto o modelo estudado apresenta evidências de falta de ajuste, pois o teste F calculado apresentou um valor de 6,19 que é maior que o valor tabelado ($F_{(tab.)10,3} = 5,23$).

Essa falta de ajuste pode ser devida a dificuldades de medição, uma vez que o rendimento global é resultado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, desvios em cada uma das etapas quando acumulados podem resultar em uma maior não linearidade na resposta final.

Desta forma o modelo estatístico proposto não pode ser utilizado para fins preditivos. De qualquer forma as superfícies de resposta (Figura 73, Figura 74 e Figura 75) foram traçadas, uma vez que do ponto de vista qualitativo a dependência da resposta em função das variáveis pode ser avaliada.

Tabela 17: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento composto central para o Rendimento Global.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Fcalculado
Regressão	1272,5100	4	318,127488	7,53
Resíduos	548,8987	13	42,222979	
Falta de ajuste	523,5434	10	52,354344	6,19
Erro puro	25,3553	3	8,451765	
Total	1821,4087	17		
% de variação explicada (R^2)	69,86			
% máxima de variação explicável	98,61			

¹ Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

² Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Obs: Valores calculados pelo software STATISTICA 12

Como pode ser observado nas superfícies de resposta (Figura 73, Figura 74 e Figura 75), a recuperação global de glicose é maior nas condições do nível superior das variáveis investigadas.

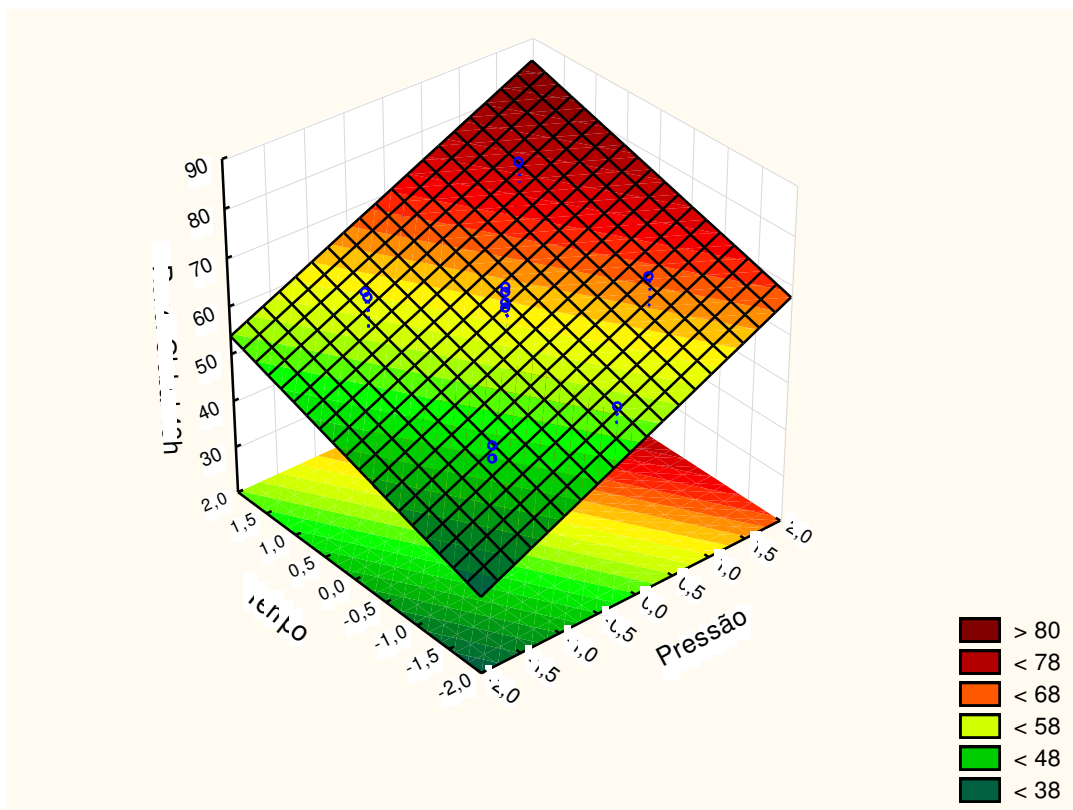


Figura 73: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do tempo e da pressão, mantendo o catalisador no nível central (0).

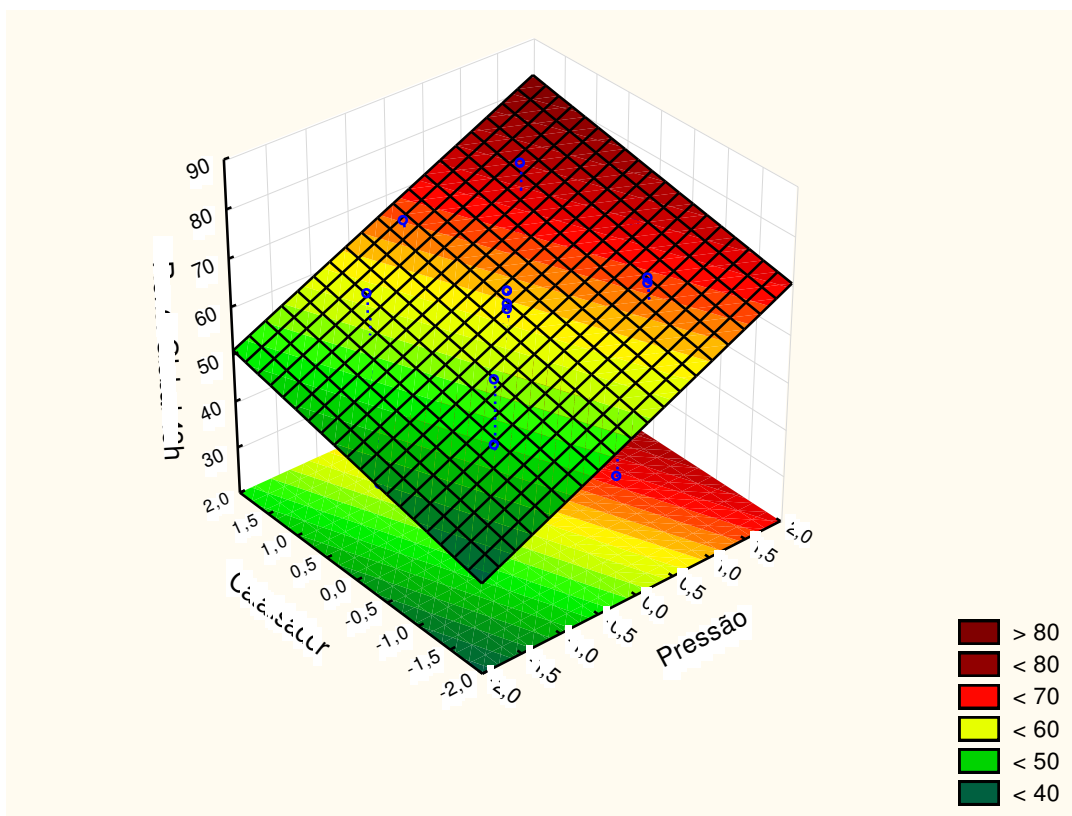


Figura 74: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do catalisador e da pressão, mantendo o tempo no nível central (0).

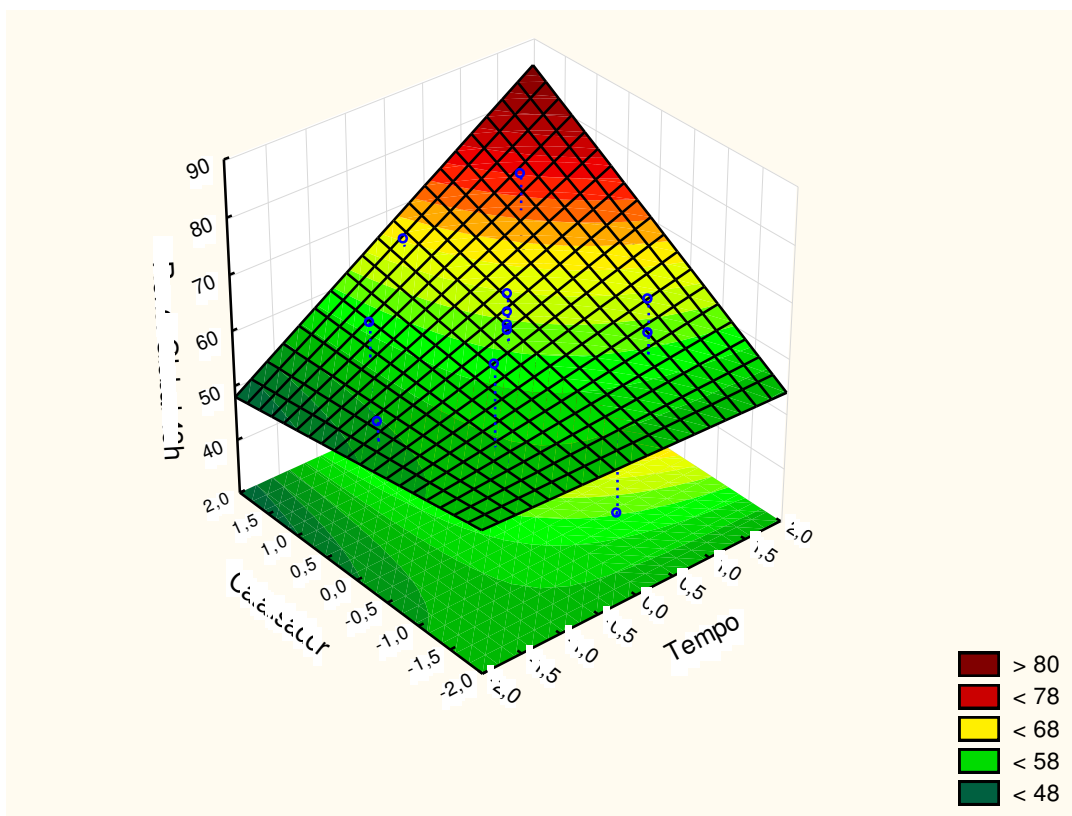


Figura 75: Superfície de resposta para a Recuperação Global de glicose em função do catalisador e do tempo, mantendo a pressão no nível central (0).

4.2.5 Conclusões da ETAPA II

Por meio das superfícies de resposta apresentadas para o Índice de Fracionamento foram identificadas duas regiões de ótimo, que permitem alcançar valores em torno de 0,26. Essas regiões são opostas, ou seja, pode ser empregado longo período de tempo combinado com baixa pressão ou curto período de tempo combinado com alta pressão.

Com base no maior valor alcançado para o Índice de Fracionamento (0,26) pode-se evidenciar que do ponto de vista de fracionamento dos componentes celulose e hemiceluloses o pré-tratamento por explosão com vapor é limitado, devido principalmente ao fato de não solubilizar de forma expressiva as hemiceluloses sem que ocorra a degradação dessa fração.

Os valores mais altos de conversão enzimática (82%) observados nas condições de maior severidade indicam que a solubilização das hemiceluloses é importante para o coquetel enzimático empregado, nestes casos, visando alcançar maior conversão da palha pré-tratada

em baixa severidade, para preservar hemiceluloses, pode-se complementar o coquetel com hemicelulases.

Pré-tratamento da palha em condições de 16 kgf/cm², 8 min e 2,1% m/m SO₂ resulta em 97% de recuperação de celulose, que através da hidrólise enzimática alcança 82% de conversão à glicose em 48 h de reação, utilizando 2 FPU/g de biomassa. A integração dessas duas etapas resulta no máximo de 77,5% de recuperação global de glicose e evidencia o potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração por meio do pré-tratamento por explosão com vapor.

4.3 Conclusões Gerais

A palha de cana-de-açúcar é uma matéria-prima de grande potencial para produção de etanol de segunda geração. No entanto a etapa de preparação não é simples, uma vez que a palha deve ser triturada e a remoção de impurezas minerais deve ser realizada para evitar problemas de abrasão nos equipamentos e perda de eficiência no pré-tratamento, devido à capacidade tamponante conferida ao meio reacional.

O pré-tratamento por explosão com vapor é eficiente para aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose, permitindo assim, altas taxas de conversão e rendimento de glicose. Porém dentro das condições investigadas, foi observado, por meio do cálculo do Índice de Fracionamento da biomassa, que a solubilização eficiente da fração hemicelulósica não é alcançada. Dentro de um contexto mais amplo de biorrefinarias, onde não somente a glicose é valorizada e sim todos os componentes da biomassa, deve-se buscar alternativas para maximizar o rendimento de xilose ao mesmo tempo que é alcançado alto rendimento de glicose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abud, Yuri, Lilian T. Costa, Wanderley de Souza, and Celso Sant'Anna. 2013. "Revealing the Microfibrillar Arrangement of the Cell Wall Surface and the Macromolecular Effects of Thermochemical Pretreatment in Sugarcane by Atomic Force Microscopy." *Industrial Crops and Products* 51 (November): 62–69. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.076.
- Aguiar, Rodrigo Souza, Marcos Henrique Luciano Silveira, Ana Paula Pitarelo, Marcos Lucio Corazza, and Luiz Pereira Ramos. 2013. "Kinetics of Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Steam-Exploded Sugarcane Bagasse." *Bioresource Technology* 147 (November): 416–23. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.067.
- Amiri, Hamid, Keikhosro Karimi, and Hamid Zilouei. 2013. "Organosolv Pretreatment of Rice Straw for Efficient Acetone, Butanol, and Ethanol Production." *Bioresource Technology* 152C (November 23): 450–456. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.038.
- Andrić, Pavle, Anne S Meyer, Peter a Jensen, and Kim Dam-Johansen. 2010. "Reactor Design for Minimizing Product Inhibition during Enzymatic Lignocellulose Hydrolysis: I. Significance and Mechanism of Cellobiose and Glucose Inhibition on Cellulolytic Enzymes." *Biotechnology Advances* 28 (3): 308–24. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.01.003.
- Atkinson, C.J. 2009. "Establishing Perennial Grass Energy Crops in the UK: A Review of Current Propagation Options for Miscanthus." *Biomass and Bioenergy* 33 (5) (May): 752–759. doi:10.1016/j.biombioe.2009.01.005.
- Azadi, Pooya, Oliver R. Inderwildi, Ramin Farnood, and David a. King. 2013. "Liquid Fuels, Hydrogen and Chemicals from Lignin: A Critical Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (May): 506–523. doi:10.1016/j.rser.2012.12.022.
- Bian, Jing, Feng Peng, Xiao-Peng Peng, Feng Xu, Run-Cang Sun, and John F. Kennedy. 2012. "Isolation of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse at Different Temperatures: Structure and Properties." *Carbohydrate Polymers* 88 (2) (April): 638–645. doi:10.1016/j.carbpol.2012.01.010.
- Biswas, Rajib, H. Uellendahl, and B.K. Ahring. 2014. "Wet Explosion Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enhanced Enzymatic Hydrolysis." *Biomass and Bioenergy* 61 (February): 104–113. doi:10.1016/j.biombioe.2013.11.027.
- Boussarsar, Houde, Barbara Rogé, and Mohamed Mathlouthi. 2009. "Optimization of Sugarcane Bagasse Conversion by Hydrothermal Treatment for the Recovery of Xylose." *Bioresource Technology* 100 (24) (December): 6537–42. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.019.

- Cao, Shuo, and Giovanna M Aita. 2013. "Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Yields of Combined Surfactant and Dilute Ammonia Treated Sugarcane Bagasse." *Bioresource Technology* 131 (March): 357–64. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.170.
- Castro, Silvia Machado, and Aline Machado Castro. 2012. "Assessment of the Brazilian Potential for the Production of Enzymes for Biofuels from Agroindustrial Materials." *Biomass Conversion and Biorefinery* 2 (1) (February 9): 87–107. doi:10.1007/s13399-012-0031-9.
- Chen, Hongzhang, Guanhua Li, and Hongqiang Li. 2014. "Novel Pretreatment of Steam Explosion Associated with Ammonium Chloride Preimpregnation." *Bioresource Technology* 153 (February): 154–9. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.025.
- Chen, Wei-Hsin, Song-Ching Ye, and Herng-Kuang Sheen. 2012. "Hydrolysis Characteristics of Sugarcane Bagasse Pretreated by Dilute Acid Solution in a Microwave Irradiation Environment." *Applied Energy* 93 (May): 237–244. doi:10.1016/j.apenergy.2011.12.014.
- Da Costa Lopes, André M, Karen G João, Djonatam F Rubik, Ewa Bogel-Lukasik, Luís C Duarte, Jürgen Andreaus, and Rafał Bogel-Lukasik. 2013. "Pre-Treatment of Lignocellulosic Biomass Using Ionic Liquids: Wheat Straw Fractionation." *Bioresource Technology* 142 (August): 198–208. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.032.
- Dantas, Guilherme a., Luiz F.L. Legey, and Antonella Mazzone. 2013. "Energy from Sugarcane Bagasse in Brazil: An Assessment of the Productivity and Cost of Different Technological Routes." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (May): 356–364. doi:10.1016/j.rser.2012.11.080.
- Das, Sudipto, David Berke-Schlessel, Hai-Feng Ji, John McDonough, and Yen Wei. 2011. "Enzymatic Hydrolysis of Biomass with Recyclable Use of Cellobiase Enzyme Immobilized in Sol-gel Routed Mesoporous Silica." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (1-2) (June): 49–54. doi:10.1016/j.molcatb.2011.02.003.
- De Souza, Amanda P., Rebecca a. Arundale, Frank G. Dohleman, Stephen P. Long, and Marcos S. Buckeridge. 2013. "Will the Exceptional Productivity of Miscanthus X Giganteus Increase Further under Rising Atmospheric CO₂?" *Agricultural and Forest Meteorology* 171-172 (April): 82–92. doi:10.1016/j.agrformet.2012.11.006.
- Duarte, C L, M A Ribeiro, H Oikawa, M N Mori, and C M Napolitano. 2012. "Electron Beam Combined with Hydrothermal Treatment for Enhancing the Enzymatic Convertibility of Sugarcane Bagasse" 81: 1008–1011. doi:10.1016/j.radphyschem.2011.11.008.
- Dyk, J S Van, and B I Pletschke. 2012. "A Review of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis and Synergistic Cooperation between Enzymes — Factors Affecting Enzymes , Conversion and Synergy." *Biotechnology Advances* 30 (6): 1458–1480. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.

- Fedenko, Jeffrey R., John E. Erickson, Kenneth R. Woodard, Lynn E. Sollenberger, Joao M. B. Vendramini, Robert. a. Gilbert, Zane R. Helsel, and Gary F. Peter. 2013. "Biomass Production and Composition of Perennial Grasses Grown for Bioenergy in a Subtropical Climate Across Florida, USA." *BioEnergy Research* 6 (3) (June 11): 1082–1093. doi:10.1007/s12155-013-9342-3.
- Fernando, Felipe, Caliane Bastos, Borba Costa, Gabriel De Castro, Rafael De Pelegrini, Argimiro Resende, Antonio José Gonc, and Roberto De Campos. 2012. "Assessing the Production of First and Second Generation Bioethanol from Sugarcane through the Integration of Global Optimization and Process Detailed Modeling" 43: 1–9. doi:10.1016/j.compchemeng.2012.04.002.
- FitzPatrick, Michael, Pascale Champagne, Michael F Cunningham, and Ralph a Whitney. 2010. "A Biorefinery Processing Perspective: Treatment of Lignocellulosic Materials for the Production of Value-Added Products." *Bioresource Technology* 101 (23) (December): 8915–22. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.125.
- Głowacka, Katarzyna. 2011. "A Review of the Genetic Study of the Energy Crop Miscanthus." *Biomass and Bioenergy* 35 (7) (July): 2445–2454. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.041.
- GranBio 2014, <https://www.flickr.com/photos/100938218@N02>, acessado em 02/04/2014.
- Guo, Bin, Yuanhui Zhang, Guo Yu, Won-Heong Lee, Yong-Su Jin, and Eberhard Morgenroth. 2013. "Two-Stage Acidic-Alkaline Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulose for the High Recovery of Cellulose and Hemicellulose Sugars." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169 (4) (February): 1069–87. doi:10.1007/s12010-012-0038-5.
- International Energy Agency. 2012. "World Energy Outlook."
- Jiang, Li-Qun, Zhen Fang, Xing-Kang Li, Jia Luo, and Suet-Pin Fan. 2013. "Combination of Dilute Acid and Ionic Liquid Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Glucose by Enzymatic Hydrolysis." *Process Biochemistry* 48 (12) (December): 1942–1946. doi:10.1016/j.procbio.2013.09.012.
- Jonglertjunya, Woranart, Teerapong Juntong, Nutthira Pakkang, Nattawee Srimarut, and Chularat Sakdaronnarong. 2014. "Properties of Lignin Extracted from Sugarcane Bagasse and Its Efficacy in Maintaining Postharvest Quality of Limes during Storage." *LWT - Food Science and Technology* 57 (1) (June): 116–125. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.042.
- Jutakanoke R, Leepipatpiboon N, Tolieng V, Kitpreechavanich V, Srinorakutara T, Akaracharanya A. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioenerg*, 2012; 39:283-289.

- Kamm, B, and M Kamm. 2004. "Principles of Biorefineries." *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (2) (April): 137–45. doi:10.1007/s00253-003-1537-7.
- Keshwani, Deepak R, and Jay J Cheng. 2009. "Switchgrass for Bioethanol and Other Value-Added Applications: A Review." *Bioresource Technology* 100 (4) (March): 1515–23. doi:10.1016/j.biortech.2008.09.035.
- Khan, Nisar Ahmad, Renesh Bedre, Arnold Parco, Lina Bernaola, Anna Hale, Collins Kimbeng, Michael Pontif, and Niranjana Baisakh. 2013. "Identification of Cold-Responsive Genes in Sugarcane for Their Use in Genetic Diversity Analysis and Future Functional Marker Development." *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology* 211 (October): 122–31. doi:10.1016/j.plantsci.2013.07.001.
- Khuong, Le Duy, Ryuichiro Kondo, Rizalinda De Leon, To Kim Anh, Kuniyoshi Shimizu, and Ichiro Kamei. 2014. "Bioethanol Production from Alkaline-Pretreated Sugarcane Bagasse by Consolidated Bioprocessing Using *Phlebia* Sp. MG-60." *International Biodeterioration & Biodegradation* 88 (March): 62–68. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.008.
- Kim, Misook, and Donald F Day. 2011. "Composition of Sugar Cane, Energy Cane, and Sweet Sorghum Suitable for Ethanol Production at Louisiana Sugar Mills." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (7) (July): 803–7. doi:10.1007/s10295-010-0812-8.
- Knoll, Joseph E., William F. Anderson, Edward P. Richard, Joy Doran-Peterson, Brian Baldwin, Anna L. Hale, and Ryan P. Viator. 2013. "Harvest Date Effects on Biomass Quality and Ethanol Yield of New Sugarcane (*Saccharum* Hyb.) Genotypes in the Southeast USA." *Biomass and Bioenergy* 56 (September): 147–156. doi:10.1016/j.biombioe.2013.04.018.
- Koçar, Günnur, and Nilgün Civaş. 2013. "An Overview of Biofuels from Energy Crops: Current Status and Future Prospects." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 28 (December): 900–916. doi:10.1016/j.rser.2013.08.022.
- Kuhad, Ramesh Chander, Rishi Gupta, Yogender Pal Kharsa, Ajay Singh, and Y.-H. Percival Zhang. 2011. "Bioethanol Production from Pentose Sugars: Current Status and Future Prospects." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (9) (December): 4950–4962. doi:10.1016/j.rser.2011.07.058.
- Leal, Manoel Regis L.V., Marcelo V. Galdos, Fábio V. Scarpere, Joaquim E.a. Seabra, Arnaldo Walter, and Camila O.F. Oliveira. 2013. "Sugarcane Straw Availability, Quality, Recovery and Energy Use: A Literature Review." *Biomass and Bioenergy* 53 (June): 11–19. doi:10.1016/j.biombioe.2013.03.007.

- Liu, Zhi-Hua, Lei Qin, Feng Pang, Ming-Jie Jin, Bing-Zhi Li, Yong Kang, Bruce E. Dale, and Ying-Jin Yuan. 2013. "Effects of Biomass Particle Size on Steam Explosion Pretreatment Performance for Improving the Enzyme Digestibility of Corn Stover." *Industrial Crops and Products* 44 (January): 176–184. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.009.
- Long, Huiling, Xiaobing Li, Hong Wang, and Jingdun Jia. 2013. "Biomass Resources and Their Bioenergy Potential Estimation: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26 (October): 344–352. doi:10.1016/j.rser.2013.05.035.
- Macrelli, Stefano, Johan Mogensen, and Guido Zacchi. 2012. "Techno-Economic Evaluation of 2nd Generation Bioethanol Production from Sugar Cane Bagasse and Leaves Integrated with the Sugar-Based Ethanol Process." *Biotechnology for Biofuels* 5 (1) (January): 22. doi:10.1186/1754-6834-5-22.
- Manzano-Agugliaro, F., A. Alcayde, F.G. Montoya, A. Zapata-Sierra, and C. Gil. 2013. "Scientific Production of Renewable Energies Worldwide: An Overview." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 18 (February): 134–143. doi:10.1016/j.rser.2012.10.020.
- Menon, Vishnu, and Mala Rao. 2012. "Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & Biorefinery Concept." *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (4) (August): 522–550. doi:10.1016/j.pecs.2012.02.002.
- Modenbach, Alicia a., and Sue E. Nokes. 2013. "Enzymatic Hydrolysis of Biomass at High-Solids Loadings – A Review." *Biomass and Bioenergy* 56 (September): 526–544. doi:10.1016/j.biombioe.2013.05.031.
- Mosier, Nathan, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y Y Lee, Mark Holtzapple, and Michael Ladisch. 2005. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 96 (6) (April): 673–86. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Moutta, R. O. Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.
- Newman, Roger H, Alankar a Vaidya, and Sylke H Campion. 2013. "A Mathematical Model for the Inhibitory Effects of Lignin in Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics." *Bioresource Technology* 130 (February): 757–62. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.122.
- Njoku, S I, B K Ahring, and H Uellendahl. 2013. "Tailoring Wet Explosion Process Parameters for the Pretreatment of Cocksfoot Grass for High Sugar Yields." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170 (7) (August): 1574–88. doi:10.1007/s12010-013-0299-7.

- Ojeda, K., O. Ávila, J. Suárez, and V. Kafarov. 2011. "Evaluation of Technological Alternatives for Process Integration of Sugarcane Bagasse for Sustainable Biofuels production—Part 1." *Chemical Engineering Research and Design* 89 (3) (March): 270–279. doi:10.1016/j.cherd.2010.07.007.
- Oliveira, Fernando M V, Irapuan O Pinheiro, Ana M Souto-Maior, Carlos Martin, Adilson R Gonçalves, and George J M Rocha. 2013. "Industrial-Scale Steam Explosion Pretreatment of Sugarcane Straw for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Production of Second Generation Ethanol and Value-Added Products." *Bioresource Technology* 130 (February): 168–73. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.030.
- Perez-Pimienta, Jose a, Monica G Lopez-Ortega, Patanjali Varanasi, Vitalie Stavila, Gang Cheng, Seema Singh, and Blake a Simmons. 2013. "Comparison of the Impact of Ionic Liquid Pretreatment on Recalcitrance of Agave Bagasse and Switchgrass." *Bioresource Technology* 127 (January): 18–24. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.124.
- Petersen, Mai Østergaard, Jan Larsen, and Mette Hedegaard Thomsen. 2009. "Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Wheat Straw for Production of Bioethanol at Low Water Consumption without Addition of Chemicals." *Biomass and Bioenergy* 33 (5) (May): 834–840. doi:10.1016/j.biombioe.2009.01.004.
- Qiu, Zenghui, and Giovanna M Aita. 2013. "Pretreatment of Energy Cane Bagasse with Recycled Ionic Liquid for Enzymatic Hydrolysis." *Bioresource Technology* 129 (February): 532–7. doi:10.1016/j.biortech.2012.11.062.
- Ragauskas, Arthur J, Gregg T Beckham, Mary J Biddy, Richard Chandra, Fang Chen, Mark F Davis, Brian H Davison, et al. 2014. "Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery." *Science (New York, N.Y.)* 344 (6185) (May 16): 1246843. doi:10.1126/science.1246843.
- Rahman, Md. Mizanur, Suraiya B. Mostafiz, Jukka V. Paatero, and Risto Lahdelma. 2014. "Extension of Energy Crops on Surplus Agricultural Lands: A Potentially Viable Option in Developing Countries While Fossil Fuel Reserves Are Diminishing." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 29 (January): 108–119. doi:10.1016/j.rser.2013.08.092.
- Ramos, Luiz Pereira. 2003. "Review: THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS." *Quim. Nova*, 26 (6): 863–871.
- Rocha, George J M, Carlos Martín, Vinícius F N da Silva, Edgardo O Gómez, and Adilson R Gonçalves. 2012. "Mass Balance of Pilot-Scale Pretreatment of Sugarcane Bagasse by Steam Explosion Followed by Alkaline Delignification." *Bioresource Technology* 111 (May): 447–52. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.005.
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454, pp.841–845.

- Ruegg, Thomas L, Eun-Mi Kim, Blake a Simmons, Jay D Keasling, Steven W Singer, Taek Soon Lee, and Michael P Thelen. 2014. "An Auto-Inducible Mechanism for Ionic Liquid Resistance in Microbial Biofuel Production." *Nature Communications* 5 (January): 3490. doi:10.1038/ncomms4490.
- Ruiz, Héctor a., Rosa M. Rodríguez-Jasso, Bruno D. Fernandes, António a. Vicente, and José a. Teixeira. 2013. "Hydrothermal Processing, as an Alternative for Upgrading Agriculture Residues and Marine Biomass according to the Biorefinery Concept: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (May): 35–51. doi:10.1016/j.rser.2012.11.069.
- Saddler, Jack, and Linoj Kumar. 2013. "Special Issue from the NSERC Bioconversion Network Workshop: Pretreatment and Fractionation of Biomass for Biorefinery/biofuels." *Biotechnology for Biofuels* 6 (1) (January): 17. doi:10.1186/1754-6834-6-17.
- Shi, Jian, John M. Gladden, Noppadon Sathitsuksanoh, Pavan Kambam, Lucas Sandoval, Debjani Mitra, Sonny Zhang, et al. 2013. "One-Pot Ionic Liquid Pretreatment and Saccharification of Switchgrass." *Green Chemistry* 15 (9): 2579. doi:10.1039/c3gc40545a.
- Singh, Renu, Ashish Shukla, Sapna Tiwari, and Monika Srivastava. 2014. "A Review on Delignification of Lignocellulosic Biomass for Enhancement of Ethanol Production Potential." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 32 (April): 713–728. doi:10.1016/j.rser.2014.01.051.
- Sluiter, A, B Hames, R Ruiz, C Scarlata, J Sluiter, D Templeton, and D Crocker Nrel. 2012. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass." *Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42618*. (April 2008).
- Soares, I.B., J.a. Travassos, H.M. Baudel, M. Benachour, and C.a.M. Abreu. 2011. "Effects of Washing, Milling and Loading Enzymes on the Enzymatic Hydrolysis of a Steam Pretreated Sugarcane Bagasse." *Industrial Crops and Products* 33 (3) (May): 670–675. doi:10.1016/j.indcrop.2011.01.003.
- Söderström, Johanna, Linda Pilcher, Mats Galbe, and Guido Zacchi. 2002. "Two-Step Steam Pretreatment of Softwood with SO₂ Impregnation for Ethanol Production." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100 (January): 5–21.
- Sun, Ning, Hanbin Liu, Noppadon Sathitsuksanoh, Vitalie Stavila, Manali Sawant, Anaise Bonito, Kim Tran, et al. 2013. "Production and Extraction of Sugars from Switchgrass Hydrolyzed in Ionic Liquids." *Biotechnology for Biofuels* 6 (1) (January): 39. doi:10.1186/1754-6834-6-39.

- Talebna, Farid, Dimitar Karakashev, and Irini Angelidaki. 2010. "Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation." *Bioresource Technology* 101 (13) (July): 4744–53. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.080.
- Tew, T. L. & Cobill, R. M. (2008). Genetic improvement of suagarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop, In: Genetic Improvement of Bioenergy Crops, W. Vermerris (Ed.), pp. 249-272, Springer, ISBN 978-0-387-70804-1, New York, USA.
- Thomas Splettstoesser 2014, <http://portfolio.scistyle.com/Lignocellulose>, acessado em 05/03/2014.
- Toquero, Cristina, and Silvia Bolado. 2014. "Effect of Four Pretreatments on Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation of Wheat Straw. Influence of Inhibitors and Washing." *Bioresource Technology* 157C (January 29): 68–76. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.090.
- Wanderley, Maria Carolina De Albuquerque, Carlos Martín, George Jackson De Moraes Rocha, and Ester Ribeiro Gouveia. 2013. "Increase in Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Based on Combined Pretreatments and Fed-Batch Enzymatic Hydrolysis." *Bioresource Technology* 128 (January): 448–53. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.131.
- Zhang, Hongdan, and Shubin Wu. 2013. "Subcritical CO₂ Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Its Enzymatic Hydrolysis for Sugar Production." *Bioresource Technology* 149 (December): 546–550. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.159.
- Zhang, Wei, Zili Yi, Jiangfeng Huang, Fengcheng Li, Bo Hao, Ming Li, Shufen Hong, et al. 2013. "Three Lignocellulose Features That Distinctively Affect Biomass Enzymatic Digestibility under NaOH and H₂SO₄ Pretreatments in Miscanthus." *Bioresource Technology* 130 (February): 30–7. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.029.
- Zhang, Yuzhen, Xiaoguo Fu, and Hongzhang Chen. 2012. "Pretreatment Based on Two-Step Steam Explosion Combined with an Intermediate Separation of Fiber Cells--Optimization of Fermentation of Corn Straw Hydrolysates." *Bioresource Technology* 121 (October): 100–4. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.006.
- Zhu, Zhisheng, Mingjun Zhu, and Zhenqiang Wu. 2012. "Pretreatment of Sugarcane Bagasse with NH₄OH-H₂O₂ and Ionic Liquid for Efficient Hydrolysis and Bioethanol Production." *Bioresource Technology* 119 (September): 199–207. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.111.

APÊNDICE A

Balanço de massa do processo para todas as condições investigadas na ETAPA I do planejamento.

Tabela 18: Condições de processo e dados da matéria-prima (Etapa I).

Ensaio Nº	Condições de Processo				Dados da Matéria-Prima: Palha de cana-de-açúcar "in natura"												
					Dados da Palha na Entrada do STEX 65L					Análise Composicional							
	Pressão (kgf/cm²)	Tempo (min)	Umidade (%)	Catalisador (%)	Massa Úmida (Kg)	ST (%)	Massa Seca (Kg)	Umidade (%)	Massa de Água (Kg)	Celulose		Hemiceluloses		Lignina		Outros	
										%	Kg	%	Kg	%	Kg	%	Kg
1	12	4	10	0	3,0	87%	2,6	13%	0,38	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
2	18	4	10	4	3,0	87%	2,6	13%	0,38	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
3	12	8	10	4	3,0	87%	2,6	13%	0,38	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
4	18	8	10	0	3,0	87%	2,6	13%	0,38	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
5	12	4	50	4	5,3	50%	2,6	50%	2,63	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
6	18	4	50	0	5,3	50%	2,6	50%	2,63	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
7	12	8	50	0	5,3	50%	2,6	50%	2,63	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
8	18	8	50	4	5,3	50%	2,6	50%	2,63	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
9	15	6	30	2	3,8	70%	2,6	30%	1,13	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
10	15	6	30	2	3,8	70%	2,6	30%	1,13	35,2	0,92	26,1	0,68	21,0	0,55	17,7	0,5
11	15	6	30	2	3,8	70%	2,6	30%	1,13	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5
12	15	6	30	2	3,8	70%	2,6	30%	1,13	35,2	0,9	26,1	0,68	21,0	0,6	17,7	0,5

Tabela 19: Dados do produto (palha pré-tratada) e Balanço de massa (Etapa I).

Ensaio Nº	Biomassa Pré-Tratada (BPT)					Balanço de Massa	
	Dados na saída do reator						
	Massa Úmida (Kg)	ST (%)	Massa Seca (Kg)	Umidade (%)	Massa de Água (Kg)	Recuperação de Sólidos (%)	Perdas Voláteis (%)
1	4,36	50,2%	2,19	49,8%	2,17	83	17
2	4,30	49,7%	2,14	50,3%	2,16	81	19
3	4,64	51,1%	2,37	48,9%	2,27	90	10
4	4,58	46,3%	2,12	53,7%	2,46	81	19
5	5,82	40,5%	2,35	59,5%	3,47	90	10
6	6,48	37,2%	2,41	62,8%	4,07	92	8
7	5,12	41,9%	2,15	58,1%	2,97	82	18
8	6,52	31,4%	2,05	68,6%	4,47	78	22
9	4,84	46,9%	2,27	53,1%	2,57	87	13
10	5,16	48,5%	2,50	51,5%	2,66	95	5
11	5,06	46,4%	2,35	53,6%	2,71	89	11
12	5,32	46,0%	2,45	54,0%	2,87	93	7

Tabela 20: Composição das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento (Etapa I).

Ensaio Nº	Análise Composicional (Percentagem)												
	Sólidos Solúveis							Sólidos Insolúveis (Fibra)					
	SS Totais (%BPT)	Glicose (%SS)			Hemiceluloses (%SS)			Fibra (%BPT)	Composição da Fibra				
		Mono	Oligo	Total	Mono	Oligo	Total		Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Outros (%)
1	15,2	0,7	12,6	13,3	13,9	26,5	40,4	85	47,2	19,6	23,4	8,4	1,4
2	20,1	5,3	6,7	12,0	17,2	24,0	41,2	80	46,3	7,5	32,9	12,4	0,9
3	23,8	5,5	5,7	11,2	16,7	22,4	39,1	76	44,2	10,8	32,7	12,2	0,1
4	13,9	1,2	8,1	9,3	10,5	18,6	29,1	86	48,6	6,4	38,6	8,3	0,0
5	34,4	2,6	7,6	10,2	12,8	20,4	33,2	66	51,6	12,9	26,6	9,1	0,0
6	27,2	1,1	7,5	8,6	9,7	17,2	26,8	73	48,1	7,1	29,8	15,7	0,0
7	22,7	0,6	6,5	7,1	7,7	14,2	21,9	77	51,2	17,9	27,1	5,3	0,0
8	25,8	10,0	8,3	18,3	28,3	36,6	64,9	74	47,0	6,1	36,7	9,9	0,4
9	27,1	4,1	7,8	12,0	16,1	24,0	40,1	73	50,6	6,7	31,7	11,3	0,0
10	28,0	4,5	6,9	11,5	16,0	22,9	39,0	72	49,6	6,7	30,3	11,4	2,0
11	29,0	8,4	5,8	14,3	22,7	28,5	51,2	71	48,8	5,7	31,3	11,5	2,8
12	28,3	5,2	7,6	12,7	17,9	25,5	43,4	72	49,7	5,9	29,9	11,0	3,4

Tabela 21: Composição (em massa) das frações solúveis e insolúveis após o pré-tratamento (Etapa I).

Ensaio Nº	Análise Composicional (Massa)												
	Sólidos Solúveis (SS)								Sólidos Insolúveis (Fibra)				
	SS Totais (kg)	Glicose (kg)			Hemiceluloses (kg)			Outros (kg)	Fibra (kg)	Composição da Fibra			
		Mono	Oligo	Total	Mono	Oligo	Total			Celulose (kg)	Hemiceluloses (kg)	Lignina (kg)	Cinzas (kg)
1	0,33	0,00	0,04	0,04	0,05	0,09	0,13	0,15	1,85	0,88	0,36	0,43	0,16
2	0,43	0,02	0,03	0,05	0,07	0,10	0,18	0,20	1,71	0,79	0,13	0,56	0,21
3	0,56	0,03	0,03	0,06	0,09	0,13	0,22	0,28	1,81	0,80	0,19	0,59	0,22
4	0,29	0,00	0,02	0,03	0,03	0,05	0,09	0,18	1,82	0,89	0,12	0,70	0,15
5	0,81	0,02	0,06	0,08	0,10	0,17	0,27	0,46	1,54	0,80	0,20	0,41	0,14
6	0,66	0,01	0,05	0,06	0,06	0,11	0,18	0,42	1,75	0,84	0,13	0,52	0,27
7	0,49	0,00	0,03	0,03	0,04	0,07	0,11	0,35	1,66	0,85	0,30	0,45	0,09
8	0,53	0,05	0,04	0,10	0,15	0,19	0,34	0,09	1,52	0,71	0,09	0,56	0,15
9	0,61	0,03	0,05	0,07	0,10	0,15	0,25	0,29	1,65	0,84	0,11	0,52	0,19
10	0,70	0,03	0,05	0,08	0,11	0,16	0,27	0,35	1,80	0,89	0,12	0,55	0,21
11	0,68	0,06	0,04	0,10	0,15	0,19	0,35	0,23	1,67	0,81	0,09	0,52	0,19
12	0,69	0,04	0,05	0,09	0,12	0,18	0,30	0,30	1,75	0,87	0,10	0,52	0,19

Tabela 22: Recuperação dos principais componentes após pré-tratamento (Etapa I).

Ensaio Nº	Recuperação do Pré-Tratamento								
	Celulose (%)				Hemiceluloses (%)				Lignina (%)
	SS Mono	SS Oligo	Fibra	Total	SS mono	SS Oligo	Fibra	Total	Fibra
1	0,2	4,1	95	99	5,9	11,3	53	70	79
2	2,2	2,8	86	91	9,5	13,2	19	41	102
3	3,0	3,2	86	93	12,1	16,3	28	57	107
4	0,3	2,3	96	99	4,0	7,0	17	28	128
5	2,1	6,0	86	94	13,3	21,3	29	64	75
6	0,7	4,8	91	97	8,2	14,5	18	41	95
7	0,3	3,1	92	95	4,8	8,9	43	57	82
8	5,1	4,3	77	87	19,2	24,9	13	58	101
9	2,5	4,7	91	98	12,7	18,9	16	48	95
10	3,1	4,7	92	100	14,4	20,7	18	53	99
11	5,6	3,9	88	98	19,8	24,9	14	59	95
12	3,5	5,1	91	100	16,0	22,7	15	54	95

Tabela 23: Dados da hidrólise enzimática e recuperação global de glicose (Etapa I).

Ensaio Nº	Hidrólise Enzimática (CC2, 2 FPU/g-TS , 8% ST)							Recuperação Global de Glicose	
	Glicose (g/L)			g-Glicose/g- BPT		Conversão (%)			
	0h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	0,13	13,6	14,8	0,17	0,18	36,2	39,3	36,304	39,381
2	0,66	16,7	20,4	0,21	0,26	46,9	57,9	43,362	53,127
3	0,81	14,3	16,6	0,18	0,21	43,3	50,8	41,268	48,010
4	0,20	11,6	16,8	0,15	0,21	29,9	43,5	30,016	43,374
5	0,69	18,8	25,6	0,23	0,32	55,8	76,7	53,905	73,377
6	0,20	16,7	20,8	0,21	0,26	50,0	62,5	48,909	61,038
7	0,28	14,2	15,0	0,18	0,19	38,1	40,4	37,043	39,284
8	2,52	20,7	27,3	0,26	0,34	55,3	75,3	51,658	68,103
9	0,77	19,0	22,6	0,24	0,28	52,7	62,9	52,609	62,392
10	0,85	19,0	27,2	0,24	0,34	54,3	78,9	57,954	83,075
11	1,58	20,6	25,5	0,26	0,32	58,9	74,0	58,925	72,844
12	0,99	17,374	23,917	0,22	0,30	48,8	68,3	51,810	71,322

APÊNDICE B

Balanço de massa do processo para todas as condições investigadas na ETAPA II do planejamento.

Tabela 24: Condições de processo e dados da matéria-prima (Etapa II).

Ensaio Nº	Variáveis de Processo			Dados da Matéria-Prima: Palha de cana-de-açúcar "in natura"												
				Dados da Palha na Entrada do Reator					Análise Composicional							
	Pressão (kgf/cm²)	Tempo (min)	Catalisador (% Base seca)	Massa Úmida (Kg)	ST (%)	Massa Seca (Kg)	Umidade (%)	Massa de Água (Kg)	Celulose		Hemiceluloses		Lignina		Outros	
									%	Kg	%	Kg	%	Kg	%	Kg
1	12	4	0,9	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
2	16	4	0,9	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
3	12	8	0,9	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
4	16	8	0,9	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
5	12	4	2,1	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
6	16	4	2,1	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
7	12	8	2,1	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
8	16	8	2,1	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
9	10	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
10	17	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
11	14	2	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
12	14	10	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
13	14	6	0,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
14	14	6	2,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
15	14	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
16	14	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
17	14	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4
18	14	6	1,5	5,68	70%	3,98	30%	1,70	38,4	1,5	27,8	1,1	23,0	0,9	10,8	0,4

Tabela 25: Dados do produto (palha pré-tratada) e balanço de massa (Etapa II).

Ensaio Nº	Biomassa Pré-Tratada (BPT)					Balanço de Massa	
	Dados na saída do reator						
	Massa Úmida (Kg)	ST (%)	Massa Seca (Kg)	Umidade (%)	Massa de Água (Kg)	Recuperação de Sólidos (%)	Perdas Voláteis (%)
1	6,32	58,1%	3,7	41,9%	2,6	92,3	8
2	6,58	58,4%	3,8	41,6%	2,7	96,6	3
3	7,06	51,2%	3,6	48,8%	3,4	90,9	9
4	6,62	52,8%	3,5	47,2%	3,1	87,8	12
5	6,24	56,4%	3,5	43,6%	2,7	88,5	11
6	6,24	53,8%	3,4	46,2%	2,9	84,4	16
7	6,62	54,8%	3,6	45,2%	3,0	91,2	9
8	6,60	56,2%	3,7	43,8%	2,9	93,3	7
9	6,30	58,9%	3,7	41,1%	2,6	93,3	7
10	7,22	49,8%	3,6	50,2%	3,6	90,5	10
11	7,02	49,7%	3,5	50,3%	3,5	87,8	12
12	8,12	40,1%	3,3	59,9%	4,9	81,8	18
13	6,60	54,2%	3,6	45,8%	3,0	89,9	10
14	7,46	49,1%	3,7	50,9%	3,8	92,0	8
15	8,24	43,1%	3,6	56,9%	4,7	89,4	11
16	7,02	50,7%	3,6	49,3%	3,5	89,5	10
17	6,54	53,1%	3,5	46,9%	3,1	87,3	13
18	6,65	52,7%	3,5	47,3%	3,1	88,1	12

Tabela 26: Composição das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento (Etapa II).

Ensaio Nº	Análise Composicional (Porcentagem)												
	Sólidos Solúveis							Sólidos Insolúveis (Fibra)					
	SS Totais (%BPT)	Glicose (%SS)			Hemicelulose (%SS)			Fibra (%BPT)	Composição da Fibra				
		Mono	Oligo	Total	Mono	Oligo	Total		Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Outros (%)
1	24,03	0,4	6,5	6,9	9,1	28,9	38,0	76,0	45,3	15,8	21,6	10,9	6,39
2	25,25	0,8	9,2	9,9	12,7	37,6	50,2	74,7	47,5	5,4	31,0	15,5	0,60
3	25,91	0,3	7,7	8,1	11,8	42,2	54,0	74,1	47,3	9,2	30,9	7,7	4,87
4	20,13	0,7	8,0	8,6	10,4	12,9	23,3	79,9	42,9	2,9	31,4	24,4	-1,72
5	19,04	0,3	7,5	7,8	9,6	38,9	48,5	81,0	49,9	17,9	23,4	3,1	5,65
6	27,31	1,2	8,3	9,4	14,5	37,2	51,6	72,7	52,3	6,5	27,4	9,3	4,46
7	22,63	0,7	8,2	8,9	14,4	42,1	56,5	77,4	51,4	9,2	31,0	8,0	0,45
8	18,93	4,0	5,9	9,9	15,0	15,2	30,2	81,1	46,9	2,9	35,3	10,0	4,75
9	19,15	0,5	7,0	7,5	10,5	32,0	42,6	80,9	48,2	15,1	24,9	10,6	1,29
10	18,76	1,8	7,9	9,6	13,9	14,1	28,0	81,2	49,9	3,1	35,7	9,5	1,67
11	22,91	0,3	8,7	9,0	10,3	46,9	57,2	77,1	48,6	9,2	26,6	12,2	3,49
12	22,27	0,6	8,9	9,4	13,9	29,1	43,0	77,7	51,8	4,7	33,7	8,2	1,57
13	17,08	0,2	8,1	8,3	12,7	39,8	52,6	82,9	48,4	14,5	22,8	8,4	5,96
14	25,55	0,6	8,7	9,3	15,5	38,6	54,1	74,4	48,6	6,7	27,4	13,4	4,01
15	22,80	0,3	8,5	8,8	10,6	44,3	54,8	77,2	49,4	8,0	27,5	10,7	4,38
16	26,57	0,4	8,4	8,8	13,0	39,7	52,7	73,4	50,5	7,1	28,0	9,9	4,58
17	25,43	0,6	8,7	9,3	14,3	37,9	52,2	74,6	50,7	7,1	27,1	10,7	4,40
18	28,37	0,9	7,2	8,1	14,6	31,8	46,4	71,6	47,2	6,7	26,2	16,3	3,61

Tabela 27: Composição (em massa) das frações solúveis e insolúveis após pré-tratamento (Etapa II).

Ensaio Nº	Análise Composicional (Massa)											
	Sólidos Solúveis (SS)							Sólidos Insolúveis (Fibra)				
	SS Totais (kg)	Glicose(kg)			Xilose (Kg)			Fibra (kg)	Composição da Fibra			
		Mono	Oligo	Total	Mono	Oligo	Total		Celulose (kg)	Hemiceluloses (Kg)	Lignina (kg)	Cinzas (kg)
1	0,88	0,00	0,06	0,06	0,08	0,26	0,34	2,79	1,26	0,44	0,60	0,30
2	0,97	0,01	0,09	0,10	0,12	0,36	0,49	2,87	1,36	0,16	0,89	0,45
3	0,94	0,00	0,07	0,08	0,11	0,39	0,51	2,68	1,27	0,25	0,83	0,21
4	0,70	0,00	0,06	0,06	0,07	0,09	0,16	2,79	1,20	0,08	0,88	0,68
5	0,67	0,00	0,05	0,05	0,06	0,26	0,33	2,85	1,42	0,51	0,67	0,09
6	0,92	0,01	0,08	0,09	0,13	0,34	0,47	2,44	1,28	0,16	0,67	0,23
7	0,82	0,01	0,07	0,07	0,12	0,35	0,46	2,81	1,44	0,26	0,87	0,22
8	0,70	0,03	0,04	0,07	0,11	0,11	0,21	3,01	1,41	0,09	1,06	0,30
9	0,71	0,00	0,05	0,05	0,07	0,23	0,30	3,00	1,45	0,45	0,75	0,32
10	0,68	0,01	0,05	0,06	0,09	0,10	0,19	2,92	1,46	0,09	1,04	0,28
11	0,80	0,00	0,07	0,07	0,08	0,38	0,46	2,69	1,31	0,25	0,72	0,33
12	0,72	0,00	0,06	0,07	0,10	0,21	0,31	2,53	1,31	0,12	0,85	0,21
13	0,61	0,00	0,05	0,05	0,08	0,24	0,32	2,96	1,43	0,43	0,68	0,25
14	0,94	0,01	0,08	0,09	0,14	0,36	0,51	2,73	1,32	0,18	0,75	0,36
15	0,81	0,00	0,07	0,07	0,09	0,36	0,44	2,74	1,36	0,22	0,75	0,29
16	0,95	0,00	0,08	0,08	0,12	0,38	0,50	2,61	1,32	0,18	0,73	0,26
17	0,88	0,01	0,08	0,08	0,13	0,33	0,46	2,59	1,31	0,18	0,70	0,28
18	0,99	0,01	0,07	0,08	0,14	0,32	0,46	2,51	1,19	0,17	0,66	0,41

Tabela 28: Recuperação dos principais componentes após pré-tratamento (Etapa II).

Ensaio Nº	Recuperação do Pré-Tratamento								
	Celulose (%)				Hemiceluloses (%)				Lignina (%)
	SS Mono	SS Oligo	Fibra	Total	SS Mono	SS Oligo	Fibra	Total	Fibra
1	0,2	3,4	82,7	86	6,4	20,3	40	67	66
2	0,4	5,2	89,3	95	9,8	29,0	14	53	97
3	0,2	4,3	83,0	87	8,8	31,4	22	63	90
4	0,3	3,3	78,4	82	5,8	7,2	7	20	96
5	0,1	3,0	93,2	96	5,1	20,8	46	72	73
6	0,6	4,5	83,6	89	10,6	27,1	14	52	73
7	0,3	4,0	94,4	99	9,4	27,5	23	60	95
8	1,7	2,4	92,5	97	8,4	8,5	8	25	116
9	0,2	2,9	94,6	98	6,0	18,1	41	65	82
10	0,7	3,1	95,6	99	7,5	7,6	8	23	114
11	0,2	4,1	85,6	90	6,6	29,9	22	59	78
12	0,2	3,8	85,8	90	8,0	16,8	11	36	93
13	0,1	2,9	93,9	97	6,2	19,4	39	64	74
14	0,3	4,8	86,7	92	11,5	28,8	16	57	82
15	0,2	4,1	88,8	93	6,8	28,6	20	55	82
16	0,2	4,7	86,4	91	9,8	29,9	17	56	80
17	0,3	4,5	86,0	91	10,0	26,7	17	53	77
18	0,5	4,2	77,6	82	11,5	25,1	15	52	72

Tabela 29: Dados da hidrólise enzimática e recuperação global de glicose (Etapa II).

Ensaio Nº	Hidrólise Enzimática (CC2, 2 FPU/g-TS , 8% ST)							Recuperação Global de Glicose	
	Glicose (g/L)			g-Glicose/g-BPT		Conversão (%)			
	0h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	0,66	16,53	18,47	0,21	0,23	49,6	55,7	44,7	50,0
2	1,00	20,87	24,71	0,26	0,31	59,1	70,6	59,1	70,0
3	0,83	19,30	23,76	0,24	0,30	56,0	69,6	51,4	63,3
4	0,70	23,02	26,82	0,29	0,34	70,0	81,9	59,2	69,0
5	0,60	15,12	18,12	0,19	0,23	39,1	47,1	39,2	47,0
6	1,03	20,16	25,34	0,25	0,32	53,4	67,9	49,8	62,6
7	0,81	19,69	23,96	0,25	0,30	51,0	62,6	52,6	64,0
8	0,75	21,94	28,35	0,27	0,35	60,9	79,3	60,0	77,5
9	0,58	11,24	13,77	0,14	0,17	29,8	36,8	30,7	37,6
10	0,72	19,12	25,92	0,24	0,32	49,2	67,4	50,7	68,7
11	0,83	17,12	22,03	0,21	0,28	46,5	60,5	44,0	56,7
12	0,84	22,54	27,60	0,28	0,35	57,8	71,2	54,0	66,1
13	0,57	14,66	16,02	0,18	0,20	38,2	41,9	38,6	42,2
14	0,95	20,07	24,75	0,25	0,31	56,0	69,7	54,1	66,8
15	0,81	18,30	22,42	0,23	0,28	49,1	60,7	47,9	58,7
16	0,94	19,35	24,09	0,24	0,30	52,7	66,2	50,7	63,2
17	0,95	19,75	24,32	0,25	0,30	52,9	65,7	50,5	62,2
18	0,92	20,65	25,47	0,26	0,32	61,9	77,0	53,3	65,7