



ANDRÉ LUIS LOVIZOTTO CESÁRIO

**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA PARTÍCULA NAS ETAPAS DE
PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

André Luis Lovizotto Cesário

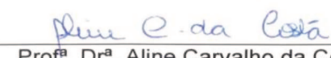
**INFLUÊNCIA DO TAMANHO DA PARTÍCULA NAS ETAPAS DE
PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-orientadora: Dra. Sarita Cândida Rabelo

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas, como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia
Química defendida por André Luis Lovizotto Cesário.


Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa - Orientadora

CAMPINAS

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE
ENGENHARIA E ARQUITETURA – BAE - UNICAMP

Cesário, André Luis Lovizotto, 1988-

C337i Influência do tamanho da partícula nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar / André Luis Lovizotto Cesário. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.

Coorientador: Sarita Cândida Rabelo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Pré-tratamento. 3. Partículas. 4. Hidrólise enzimática. I. Costa, Aline Carvalho. II. Rabelo, Sarita Cândida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Influence of particle size on the steps of pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

Palavras-chave em Inglês:

Sugarcane bagasse

Pretreatment

Particles

Enzymatic hydrolysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

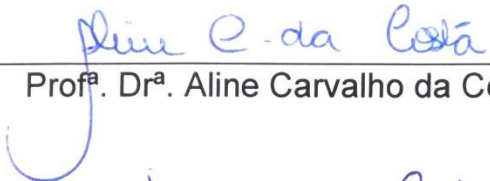
José Geraldo da Cruz Pradella

Elenise Bannwart de Moraes Torres

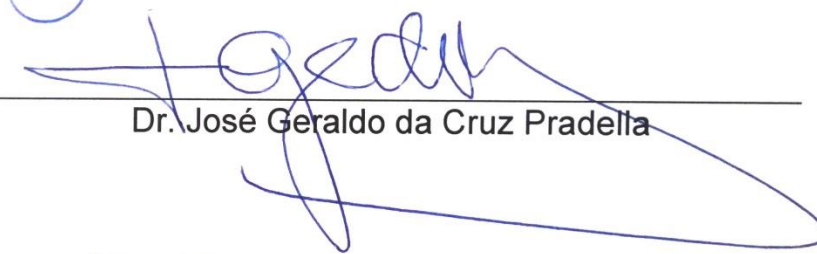
Data de defesa: 08-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por André Luis Lovizotto Cesário e aprovada em 08 de Julho de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa - Orientadora



Dr. José Geraldo da Cruz Pradella



Dr^a. Elenise Bannwart de Moraes Torres

AGRADECIMENTOS

À toda minha família e amigos, principalmente aos meus pais, João e Elza, por todo amor, carinho e apoio nas minhas escolhas. Sem eles ficaria impossível enfrentar mais essa etapa da vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, e co-orientadora, Dra. Sarita Cândida Rabelo, pela orientação, confiança, entusiasmo durante todo o trabalho e imensa colaboração na elaboração dessa dissertação.

Aos meus amigos do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), Luiza, João, Daniele, Paula, Rafael, Laura e todos os outros companheiros que me ajudaram sempre que podiam tanto no aspecto profissional e acadêmico como nas relações de amizade.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) por ter cedido a estrutura e materiais para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

RESUMO

O grande desafio para a produção de etanol de segunda geração está em produzir, eficientemente, um hidrolisado rico em açúcares que possa ser fermentado para produção de etanol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tamanho de partícula nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana. Também foram estudadas diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído com o objetivo de avaliar a solubilização dos componentes da biomassa e a recuperação dos açúcares no licor. A eficiência de cada condição de pré-tratamento foi avaliada através da liberação de açúcares na hidrólise enzimática. Foi observado que a temperatura teve grande influência na solubilização das hemiceluloses no pré-tratamento, alcançando o máximo de 87% a 140°C por 30 minutos. Nesta mesma condição, também foi observado o rendimento máximo de pentoses no licor, sendo de 77%. Não foi observada influência do tamanho de partícula no pré-tratamento, uma vez que os valores obtidos de solubilização e rendimentos foram semelhantes para as diferentes granulometrias, avaliadas em uma mesma condição. A avaliação da eficiência do pré-tratamento na hidrólise enzimática mostrou que as condições de pré-tratamento mais severas (as que removeram maiores quantidades de hemiceluloses) resultaram em maiores conversões à glicose, sendo o máximo alcançado de conversão de celulose de 55% e um rendimento global de 44% para o material pré-tratado a 140°C, 30 minutos com concentração de sólidos de 10% (m/v) na hidrólise. Também não foi observada influência do tamanho de partícula nesta etapa, uma vez que os rendimentos obtidos foram semelhantes para as diferentes granulometrias. Sendo assim, foi determinado que o tamanho de partícula, na faixa avaliada no presente trabalho, não exerceu influência no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e hidrólise enzimática, o que não demonstra a necessidade de reduzir o tamanho de partícula do bagaço. A melhor condição de pré-tratamento apresentou eficiente remoção das hemiceluloses e consequente recuperação de xilose no licor, porém a conversão da celulose na hidrólise enzimática não apresentou grande efetividade.

Palavras-chave: pré-tratamento, tamanho de partícula, bagaço de cana, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The main challenge for second generation ethanol production is to produce, effectively, a hydrolyzate rich in sugars that can be fermented to produce ethanol. This study aimed to evaluate the influence of particle size on pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. Different conditions of dilute acid pretreatment were studied to evaluate biomass solubilization and sugars recovery in the liquor. The efficiency of each pretreatment condition was evaluated by the release of sugars after enzymatic hydrolysis. It was observed that the temperature had a great influence on the hemicelluloses solubilization in the pretreatment, reaching a maximum of 87% at 140°C for 30 minutes. The maximum xylose yield was observed on the same condition (77 %). No influence of particle size in the pretreatment was observed, since the values of solubilization and yields were similar for the different particle sizes evaluated in the same condition. The most severe conditions of pretreatment (highest hemicelluloses solubilization) resulted in higher conversion to glucose, in which the maximum cellulose conversion was 55% and overall yield of 44 % for the material pretreated at 140°C for 30 minutes when the solids concentration in hydrolysis was 10% (w/v). No influence of particle size was observed at this step, since the yields were similar for the different particle sizes. Thus, it was determined that the particle size in the range evaluated in this study did not influence the dilute sulfuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis, which shows that there is no need for the particle size reduce of bagasse. The best pretreatment condition showed efficient removal of hemicelluloses and subsequent recovery of xylose in the liquor, but the conversion of cellulose in the enzymatic hydrolysis did not show great effectiveness.

Keywords: pretreatment, particle size, sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xxi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo Geral	4
1.1.1. Objetivos Específicos	4
1.2. Organização do Trabalho.....	5
CAPÍTULO 2	6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Biomassa lignocelulósica	6
2.1.1. Celulose	9
2.1.2. Hemiceluloses.....	10
2.1.3. Lignina.....	12
2.2. Pré-tratamento	14
2.2.1. Pré-tratamento físico.....	19
2.2.1.1. Moagem	19
2.2.2. Pré-tratamento químico	20
2.2.2.1. Pré-tratamento com ácido diluído	21
2.3. Hidrólise	23
2.3.1. Hidrólise enzimática	24
2.3.1.1. As enzimas celulasas	25
2.3.1.2. Estrutura e propriedade das celulasas	26
2.4. Conclusões.....	28
CAPÍTULO 3	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Matéria-prima	29
3.2. Materiais	29

3.2.1. Enzimas	29
3.2.2. Equipamentos	29
3.2.3. Reagentes e padrões cromatográficos.....	30
3.3. Procedimentos experimentais	31
3.3.1. Moagem do bagaço.....	31
3.3.2. Distribuição de tamanho de partículas das amostras de bagaço	31
3.3.3. Determinação da composição química da biomassa	32
3.3.3.1. Teor de umidade	32
3.3.3.2. Determinação de extrativos	33
3.3.3.3. Determinação do teor de cinzas.....	34
3.3.3.4. Determinação do teor de carboidratos, lignina, grupos acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	35
3.3.3.4.1. Hidrólise com H ₂ SO ₄ 72% (m/m).....	35
3.3.3.4.2. Determinação de Lignina Klason (insolúvel).....	36
3.3.3.4.3. Determinação de lignina solúvel	36
3.3.3.4.4. Determinação dos carboidratos e produtos de decomposição por HPLC	38
3.3.3.4.4.1. Análise dos carboidratos.....	39
3.3.3.4.4.2. Análise de grupos acetil.....	40
3.3.3.4.4.3. Análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural	41
3.3.4. Quantificação da fração líquida de pré-tratamento.....	42
3.5. Ensaio de pré-tratamento	43
3.5.1. Rampa de aquecimento do reator	43
3.5.2. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído	44
3.5.3. Fator de severidade.....	45
3.6. Hidrólise enzimática.....	46
3.6.1. Determinação da atividade enzimática	46
3.6.1.1. Determinação da atividade enzimática para celulase	46
3.6.1.2. Determinação da atividade enzimática para β-glicosidase	47
3.6.2. Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado	48
CAPÍTULO 4	50
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50

4.1. Composição do bagaço integral.....	50
4.2. Distribuição de partículas do bagaço	51
4.3. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em diferentes condições de temperatura e tempo.....	52
4.3.1. Fator de severidade do pré-tratamento	52
4.3.2. Massa solubilizada no pré-tratamento	53
4.3.3. Composição química do bagaço pré-tratado	54
4.3.4. Solubilização das hemiceluloses e celulose no pré-tratamento	57
4.4. Análise do licor de pré-tratamento	59
4.4.1. Carboidratos (monômeros e oligômeros) no licor de pré-tratamento.....	59
4.4.2. Carboidratos, ácido acético e produtos de degradação no licor de pré-tratamento	62
4.4.3. Rendimento de pentoses no licor de pré-tratamento	65
4.4.4. Rendimento de glicose no licor pré-tratamento.....	66
4.4.5. Ácido acético e produtos de degradação dos açúcares no licor de pré-tratamento	68
4.4.6. Recuperação de pentoses provenientes das hemiceluloses baseado na porcentagem de hemiceluloses solubilizada no pré-tratamento	69
4.5. Hidrólise enzimática	71
4.5.1. Perfis dos carboidratos liberados durante a hidrólise enzimática.....	71
4.5.2. Conversão dos carboidratos na hidrólise enzimática.....	76
4.5.2.1. Conversão da celulose	76
4.5.2.2. Conversão das hemiceluloses	79
4.5.3. Rendimento global.....	80
4.5.3.1. Rendimento global da celulose	80
4.6. Avaliação do pré-tratamento, hidrólise enzimática e formação de inibidores	82
4.7. Balanço de massa.....	84
CAPÍTULO 5	85
CONCLUSÕES	85
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE I	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol a partir da matéria-prima lignocelulósica (MOREIRA NETO, 2011).	3
Figura 2.1: Composição química dos materiais lignocelulósicos e seus principais produtos de hidrólise (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).	8
Figura 2.2: Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica (modificada de MENON e RAO, 2012).	9
Figura 2.3: Estrutura polimérica da celulose, com destaque para os monômeros de glicose e os dímeros de celobiose (FENGEL e WEGENER, 1989).	10
Figura 2.4: Estrutura dos principais monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).	11
Figura 2.5: Principais produtos de hidrólise das hemiceluloses (PENG <i>et al.</i> , 2012).....	12
Figura 2.6: Ilustração esquemática da estrutura da lignina (adaptado de SUN <i>et al.</i> , 2009).	13
Figura 2.7: Estrutura dos álcoois precursores da lignina (adaptado de WONG, 2009)	14
Figura 2.8: Representação esquemática simplificada do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de CHANDRA <i>et al.</i> , 2012).	16
Figura 2.9: Visão geral das principais vias cinéticas e interações em relação à inibição de produtos: principais reações (1,2), inibição pela glicose (3,4), inibição pela celobiose (5), inibição pelo substrato (6,7) (ANDRIC <i>et al.</i> (2010).....	26
Figura 2.10: (A) Estrutura da endoglucanase de <i>T. aurantiacus</i> (335 aminoácidos); (B) estrutura da exoglucanase de <i>P.chrysosporium</i> (431 aminoácidos); (C) estrutura da β -glicosidase de <i>B. polymyxa</i> (713 aminoácidos) (JURURU e WU, 2014).	27
Figura 3.1: Amostras de bagaço em diferentes granulometrias.....	31
Figura 4.1: Distribuição de partículas das diferentes amostras de bagaço.	52
Figura 4.2: Massa solubilizada (% de massa seca) das amostras submetidas aos diferentes ensaios de pré-tratamento. As barras indicadas pela mesma letra indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$).	54
Figura 4.3: Solubilização de hemiceluloses e celulose nos diferentes ensaios de pré-tratamento	58

Figura 4.4: Rendimento de pentoses no licor de pré-tratamento.....	66
Figura 4.5: Rendimento de glicose no licor de pré-tratamento.	67
Figura 4.6: Concentração de 5-hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético no licor de pré-tratamento.....	68
Figura 4.7: Recuperação de pentoses no licor provenientes das hemiceluloses solubilizadas no pré-tratamento	70
Figura 4.8: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 4 min.	71
Figura 4.9: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 20 min.	71
Figura 4.10: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 40 min.....	72
Figura 4.11: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 60 min.....	72
Figura 4.12: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 2,4 min.....	73
Figura 4.13: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 10 min. Equipamentos.....	73
Figura 4.14: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 20 min.....	74
Figura 4.15: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 30 min.....	74
Figura 4.16: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras não pré-tratadas.	75
Figura 4.17: Conversão de celulose na hidrólise enzimática. As barras com mesma letra indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$).	76
Figura 4.18: Conversão das hemiceluloses em xilose na hidrólise enzimática.	79
Figura 4.19: Rendimento global da celulose. Barras indicadas pela mesma letra indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$).	81
Figura 4.20: Massa solubilizada no pré-tratamento, rendimento de pentoses no licor, conversão de celulose na hidrólise, rendimento global de celulose, e formação de	

inibidores (HMF e furfural) no licor de pré-tratamento para a amostra de bagaço não moído.	83
Figura 4.21: Balanço de massa	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição química de resíduos agroindustriais (% massa seca).....	7
Tabela 2.2: Composição química (% massa seca) de amostras de bagaço de cana anteriormente reportadas na literatura.....	7
Tabela 2.3: Principais métodos de pré-tratamento (CONDE-MEJÍA et al., 2012).....	17
Tabela 2.4: Efeito da redução do tamanho de partícula na conversão de açúcares na hidrólise enzimática para diferentes materiais lignocelulósicos (adaptado de VIDAL-Jr. et al. (2011)).....	20
Tabela 2.5: Trabalhos da literatura em que foi empregado o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.	22
Tabela 2.6: Massa molecular do sistema celulolítico de <i>T. reesei</i> (OLSSON et al. 2005) ..	28
Tabela 3.1: Faixa de concentração das curvas analíticas.....	38
Tabela 4.1: Composição do bagaço integral (% de massa seca) para as diferentes amostras.. ..	51
Tabela 4.2: Fator de severidade (FS) e fator de severidade combinado (FSC) das diferentes condições de pré-tratamento..	53
Tabela 4.3: Composição química das amostras de bagaço pré-tratadas a 120° C.....	55
Tabela 4.4: Composição química das amostras de bagaço pré-tratadas a 140° C.....	56
Tabela 4.5: Concentração dos carboidratos presente no licor de pré-tratamento a 120° C..	60
Tabela 4.6: Concentração dos carboidratos presente no licor de pré-tratamento a 140° C..	61
Tabela 4.7: Concentração de carboidratos, ácido acético e inibidores no licor de pré-tratamento no ensaio a 120°C.	63
Tabela 4.8: Concentração de carboidratos, ácido acético e inibidores no licor de pré-tratamento no ensaio a 140°C..	64

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o interesse em pesquisas que buscam por fontes alternativas de energia para os combustíveis fósseis tem crescido consideravelmente (DIAS *et al.*, 2012). A crescente demanda por energia resulta em um significativo aumento do preço do combustível, principalmente do petróleo, além de acelerar seu inevitável esgotamento (PENG e WU, 2010; LU *et al.*, 2009). Mais de 60% da produção de combustíveis provenientes do petróleo são destinados ao setor de transporte, tornando-o o principal consumidor. Como agravante, a combustão desses derivados contribuem para emissão de gases do efeito estufa (QI *et al.*, 2010). BALAT (2011) aponta que aproximadamente 70% das emissões de monóxido de carbono (CO) e 19% de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera são decorrentes da combustão desses combustíveis.

Dessa forma, fontes alternativas de energia, principalmente as que utilizam matéria-prima renovável, têm sido amplamente investigadas. Há grande interesse político e econômico no desenvolvimento de novas tecnologias que minimizem a dependência do petróleo, além de garantir a sustentabilidade e redução na emissão de gases poluentes (BOTELLA *et al.*, 2009).

A biomassa lignocelulósica, tais como resíduos agroindustriais, tem atraído interesse devido ao seu baixo custo e abundância (MESA *et al.*, 2010), podendo ser utilizada para uma produção sustentável e economicamente viável de etanol de segunda geração (MOOD *et al.*, 2013).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo alcançado uma produção de 719,1 milhões de toneladas em 2010, correspondendo a 43% de toda produção mundial (HOLFSETZ e SILVA, 2012). A indústria de cana tem um importante papel no contexto econômico do país devido à sua eficiente produção de etanol de primeira geração e açúcar (PALACIOS-BERECHE *et al.*, 2013). Para cada tonelada de cana-de-açúcar, 0,3 toneladas de bagaço são produzidas, o qual é queimado para produção de vapor e energia elétrica com objetivo de suprir a demanda energética requerida pela usina (HOLFSETZ e SILVA, 2012). Dessa forma, a produção de etanol de segunda geração é parcialmente

limitada, pelo fato da maior parte do bagaço ser usado na cogeração para produção de energia. No entanto, com a proibição das queimadas em campo (para permitir a colheita manual) e aumento da colheita mecanizada, tornou-se possível a utilização da palha e ponteiro que podem ser usadas na geração de energia. Além disso, os resíduos do processo de produção do etanol de segunda geração (principalmente a lignina) também podem ser usados como combustível para a produção de vapor e energia elétrica, tornando, assim, o bagaço mais disponível para a produção de etanol (DIAS *et al.*, 2013).

Além dessa alternativa de utilização da biomassa, o bagaço apresenta uma série de vantagens que o coloca como uma das principais matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração. Entre elas, se destaca a abundância de material já disponível nas usinas sucroalcooleiras, que podem utilizar sua própria infraestrutura para a produção desse combustível e, assim, reduzir os custos com transporte, e principalmente por ser um material rico em carboidratos (GOTTSCALK *et al.*, 2010; GIESE, 2013).

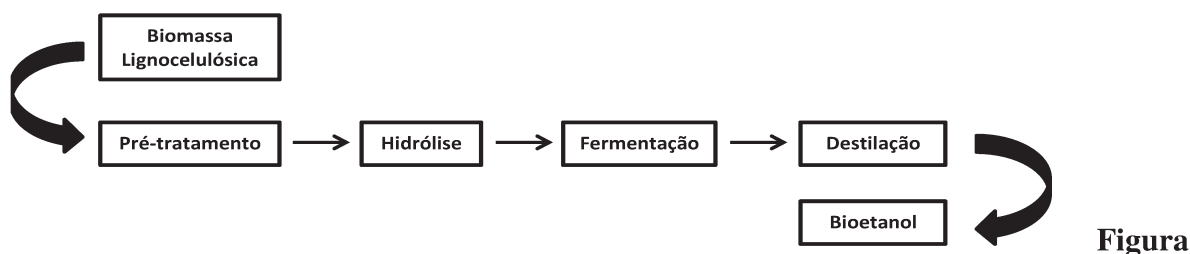
A obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica consiste na hidrólise dos polissacarídeos que a compõem, e posterior fermentação dos açúcares a etanol (KRISTENSEN, 2009). Porém, a intensa estrutura formada pelos três principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lignina) dificulta a conversão em açúcares fermentescíveis (DIAS *et al.*, 2013). Devido a essa complexidade na sua estrutura, se faz necessário um pré-tratamento para diminuir a recalcitrância do material e, consequentemente, melhorar a eficiência da sacarificação dos polissacarídeos (MENON e RAO, 2012). O objetivo é facilitar o acesso das enzimas aos carboidratos presentes na biomassa, sem que ocorra degradação dos mesmos e, assim, evitar a formação de co-produtos (HARRISON *et al.*, 2013).

O pré-tratamento está entre as etapas mais caras na produção de etanol de segunda geração, e por isso tem chamado a atenção de vários grupos de pesquisa que buscam melhorar a eficiência deste processo (MOSIER *et al.*, 2003).

As principais etapas do processo de produção do etanol de segunda geração são apresentadas na Figura 1.1, onde a etapa de pré-tratamento prepara o material para hidrólise e, em seguida, os açúcares liberados são fermentados a etanol.

Os principais tipos de pré-tratamentos encontrados na literatura são classificados em: biológico, físico, químico e físico-químico. A escolha deste depende do tipo da

matéria-prima utilizada, bem como os problemas ambientais que este possa causar devido à utilização de agentes contaminantes (MENON e RAO, 2012).



1.1: Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol a partir da matéria-prima lignocelulósica (MOREIRA NETO, 2011).

Na etapa hidrolítica, a conversão dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis pode ser condicionada por ácidos ou enzimas (NEUREITER *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2002).

Segundo KLINKE *et al.* (2003), a hidrólise ácida é um processo relativamente eficiente, porém gera inibidores de fermentação, havendo possibilidade também de degradação da glicose formada. O processo de sacarificação pode ser condicionado por soluções concentradas de ácidos fortes a baixas temperaturas, ou com soluções ácidas diluídas, em temperaturas elevadas. No entanto, apesar de ser um método rápido e bastante conhecido, há necessidade da utilização de materiais de custo elevado que sejam resistentes à corrosão, a altas pressões e temperaturas (MARTÍN *et al.*, 2007).

Devido a isso, a hidrólise enzimática se torna vantajosa, em relação à hidrólise ácida, por ser realizada em condições mais brandas (pH 4-5 e temperatura entre 45-50°C), não havendo necessidade da utilização de materiais resistentes à corrosão e também por ser possível obter altos rendimentos no processo, uma vez que não há degradação do produto formado, devido à alta especificidade da enzima em relação ao substrato (SUN e CHENG, 2002; HAMELINK *et al.*, 2005; GOTTSCHALK *et al.*, 2010).

O maior problema da sacarificação enzimática são os elevados custos das enzimas e, por isso, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de aumentar a produtividade e minimizar os custos (KNAUF e MONIRUZZAMAN e MONIRUZZAMAN, 2004; GARCIA, 2009). Com a evolução das pesquisas, os

especialistas acreditam que a utilização de enzimas para hidrólise da biomassa lignocelulósica seja a chave para a produção de etanol de segunda geração a um custo competitivo (LYND *et al.*, 1996; DISPARDO, 2000).

Há muitos trabalhos na literatura que avaliam a influência do tamanho de partícula do material na conversão da biomassa lignocelulósica (VIDA-Jr. *et al.*, 2011). A moagem é a forma mais utilizada para reduzir a granulometria da biomassa. Alguns autores reportam que este processo provoca alterações na estrutura do material, através do aumento da superfície de contato e por reduzir a cristalinidade da biomassa (FAN *et al.*, 1980; MAIS *et al.*, 2002; TAHERZADEH e KARIMI, 2007; ZENG *et al.*, 2007) e, dessa forma, torna o material menos recalcitrante (ZHU *et al.*, 2010). Além disso, partículas menores podem melhorar a eficiência da transferência de calor e massa no processo (LIU *et al.*, 2013). Porém, observa-se bastante divergência nos resultados. Alguns trabalhos reportam melhoras nos rendimentos de conversão (LAVARACK *et al.*, 2002; MONAVARI *et al.*, 2009) quando são utilizadas partículas menores. Já outros não observam diferença significativa quando é utilizada biomassa mais particulada (LIU *et al.*, 2009; JONGLERTJUNYA *et al.*, 2014) . Dessa forma, no presente trabalho serão avaliadas diferentes granulometrias do bagaço de cana para avaliar a influência nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do tamanho de partícula do bagaço de cana-de-açúcar nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a produção de etanol de segunda geração.

1.1.1. Objetivos Específicos

Para atingir o objetivo geral, as seguintes etapas foram seguidas:

1. Avaliação da influência do tamanho de partícula do bagaço no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em diferentes condições de tempo e temperatura;
2. Avaliação da cinética de solubilização dos componentes do bagaço em diferentes temperaturas de pré-tratamento;

3. Quantificação dos açúcares e produtos de degradação no licor e para cada condição de pré-tratamento e granulometria avaliada;
4. Avaliação das diferentes condições de pré-tratamento nos rendimentos de hidrólise enzimática.

1.2. Organização do Trabalho

Esta dissertação de mestrado foi dividida em capítulos nos quais foram abordados os seguintes temas:

O Capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, apresenta os principais temas que serão abordados neste trabalho, como a estrutura e a composição química da biomassa, os tipos de pré-tratamento, dando ênfase ao pré-tratamento físico (moagem) e o com ácido sulfúrico diluído. Também foram apresentados os principais conceitos sobre a hidrólise enzimática, abordando sobre as principais enzimas responsáveis pela reação e seus mecanismos de ação.

No Capítulo 3, “Metodologia Experimental”, é apresentada as metodologias para cada etapa que foram realizadas no trabalho, que incluem a moagem da biomassa, separação dos diferentes tamanhos de partículas, análise de composição química, construção da rampa de aquecimento dos reatores utilizados no pré-tratamento, ensaios de pré-tratamento com ácido sulfúrico. Também, foram apresentadas as metodologias para determinação da atividade enzimática, assim como os procedimentos realizados na hidrólise enzimática.

No Capítulo 4, “Resultados e Discussões”, foi mostrada a distribuição dos diferentes tamanhos de partículas nas amostras de bagaço, os fatores de severidade calculados para cada condição de pré-tratamento avaliada, os resultados de pré-tratamento, os quais incluem a solubilização de massa, rendimentos dos açúcares no licor e formação de inibidores. Também foram apresentadas as composições químicas de cada amostra, para condição de pré-tratamento avaliada. Em relação à hidrólise enzimática, foram apresentados os perfis dos açúcares liberados na reação, as porcentagens de conversão dos polissacarídeos e os rendimentos globais após pré-tratamento e hidrólise enzimática.

E por fim, o Capítulo 5, “Conclusões”, apresenta um resumo dos resultados mais relevantes do trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aumento da demanda energética, decorrente da melhoria da qualidade de vida e do aumento populacional, exige, continuamente, a busca por soluções que minimizem os problemas relacionados à escassez energética. A utilização da biomassa lignocelulósica é apontada como alternativa para suprir essa demanda, principalmente por ser uma fonte renovável. O bagaço e palha de cana estão disponíveis em abundância no Brasil, produzidos como subproduto de usinas sucroalcooleiras, os quais podem ser utilizados para uma produção economicamente viável de combustíveis.

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é a mais abundante da natureza, o que a torna bastante atrativa para ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (CASTRO e PEREIRA, 2010; BARROS, 2013). Em geral, esses materiais são classificados em seis grupos: resíduos agroindustriais (bagaço de cana, palha de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo e caroços de azeitona), madeira dura, madeira mole (coníferas), resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas), e resíduos municipais sólidos (SANCHEZ e CARDONA, 2008; LIMAYEN, 2012). Os principais componentes que constituem a biomassa lignocelulósica são a celulose, hemiceluloses e lignina (DEHKHODA, 2008; CARRIER *et al.*, 2011) e em menor parte, alguns teores de pectina, proteínas, compostos extraíveis (materiais solúveis não estruturais, tais como: açúcares não estruturais, materiais nitrogenados, clorofila e ceras) e cinzas (compostos inorgânicos) (KUMAR *et al.*, 2009).

As composições químicas de alguns resíduos agroindustriais são apresentadas nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1. Composição química de resíduos agroindustriais (% massa seca).

Material	Celulose	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Extrativos	Referência
Palha de cana	34-40	23-26	24-25	5-9	4-7	AYALA (2012); BARROS <i>et al.</i> (2013)
Palha de trigo	35-36	22-28	15-22	7-8	6	QI <i>et al.</i> (2010); TOQUERO e BOLADO (2014)
Palha de arroz	33-34	20-25	15-19	12-14	6-12	HARUN <i>et al.</i> (2013); GU <i>et al.</i> (2013)
Palha de milho	39-41	23-28	8-11	-	-	ZHONG <i>et al.</i> (2011); GUO <i>et al.</i> (2013)

A cana de açúcar é matéria-prima utilizada na indústria brasileira de etanol, a qual gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos (palha e bagaço) como subproduto (DIAS *et al.*, 2012). A Tabela 2.2 apresenta a composição química do bagaço de cana-de-açúcar reportado por diversos autores.

Tabela 2.2: Composição química (% massa seca) de amostras de bagaço de cana anteriormente reportadas na literatura.

	ZHAO <i>et al.</i> (2009)	MARTIN <i>et al.</i> (2007)	FUENTES (2009)	NEUREITER <i>et al.</i> (2002)	AGUILAR <i>et al.</i> (2002)	RABELO (2010)
Celulose	45,0	43,1	37,3	40,2	38,9	40,5
Hemiceluloses	31,8	31,1	23,6	26,4	26,2	24,5
Lignina	20,3	11,4	25	25,2	23,9	26,4
Outros	2,9	14,4	13,9	8,2	11,0	2,2

A composição química do material lignocelulósico é um fator importante que influencia diretamente na eficiência do processo de conversão da biomassa em etanol, sendo que a diferença de estrutura e composição entre os materiais está ligada principalmente ao conteúdo genético e à interação com o meio ambiente (LEE *et al.*, 2007). Por esse motivo, a composição exata da biomassa deve ser cuidadosamente avaliada para que seja possível obter uma melhor eficácia nos cálculos de conversão (BOBLETER, 1994; ANDO *et al.*, 2000; YANIK *et al.*, 2007).

TAHERZADEH e KARIMI (2007) mostram a composição química dos materiais lignocelulósicos e seus principais produtos de degradação.

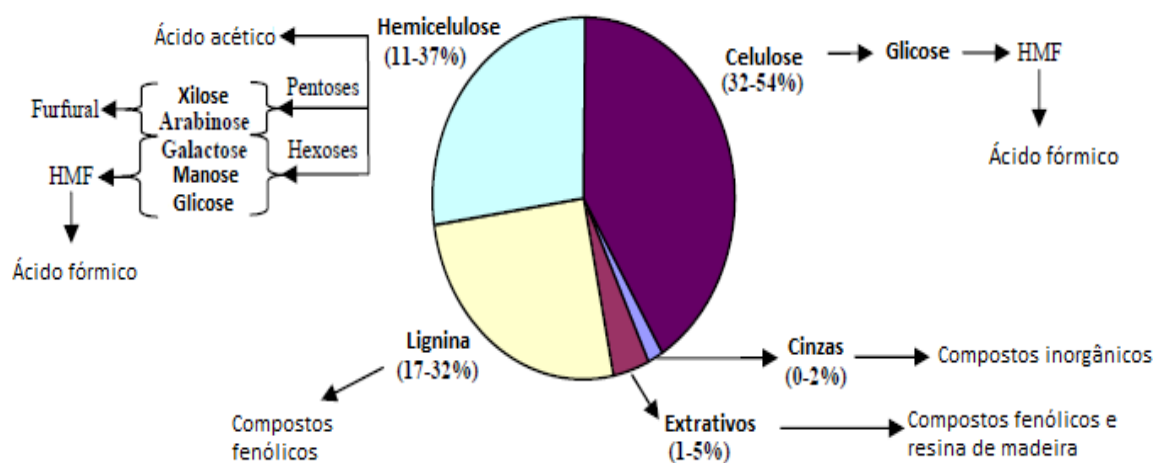


Figura 2.1: Composição química dos materiais lignocelulósicos e seus principais produtos de degradação (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Os três principais componentes da biomassa lignocelulósica (celulose, hemiceluloses e lignina) estão fortemente conectados por ligações químicas não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (PÉREZ *et al.*, 2002; SANCHEZ, 2009). A celulose e as hemiceluloses são os principais alvos para produção de etanol, uma vez que esses componentes são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis (KARUNANITHY *et al.*, 2008).

A Figura 2.2 ilustra a estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica.

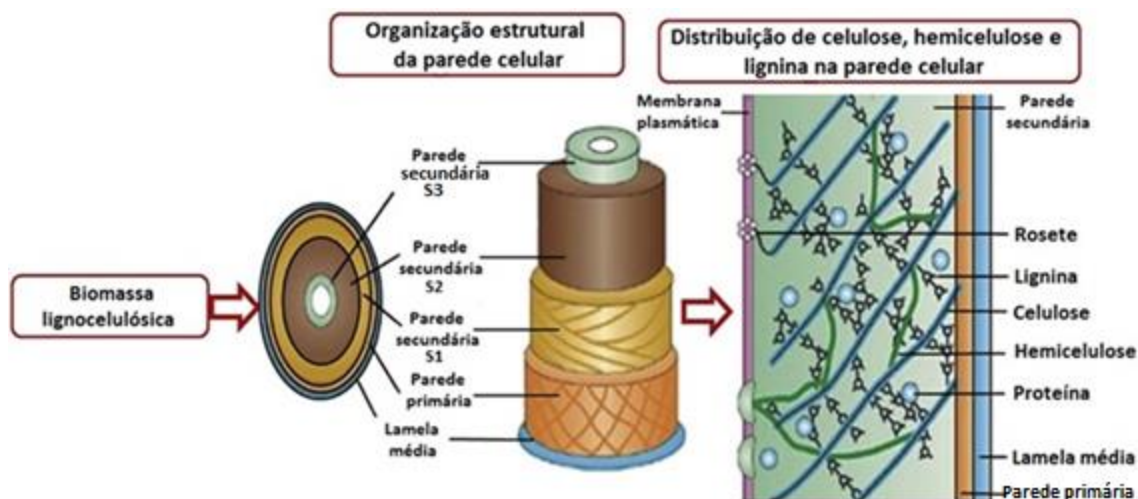


Figura 2.2: Estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica (modificada de MENON e RAO, 2012).

A estrutura da parede celular nas plantas é subdividida em parede primária (P) e parede secundária (S1, S2, S3), as quais são separadas por uma fina camada, chamada lamela média (LM). As frações de celulose, hemiceluloses e lignina variam de uma camada para outra, sendo que as paredes celulares são compostas principalmente de celulose e hemiceluloses. A camada S2 da parede secundária é geralmente mais grossa do que as outras e contém a maior parte de celulose. Já a lamela média é quase totalmente composta por lignina (FENGEL e WEGENER, 1989; MENON e RAO, 2012).

A celulose e hemiceluloses são polissacarídeos constituídos de diferentes açúcares, enquanto que a lignina é uma macromolécula aromática tridimensional formada por unidades de fenilpropano. A forma com que esses componentes estão organizados na biomassa torna sua estrutura bastante recalcitrante devido à elevada presença de regiões cristalinas e lignificadas (SOCCOL *et al.*, 2010).

2.1.1. Celulose

A celulose é o polímero químico natural mais abundante encontrado na natureza, o que a torna uma fonte valiosa de matéria-prima (BOBLETER, 1994; MAHA, 2002). Sua

longa cadeia linear, também chamada de fibrilas elementares, compõe a parede celular das plantas. A cadeia é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, sendo os dímeros de glicose chamados de celobiose (PÉREZ *et al.*, 2002), como mostrado na Figura 2.3.

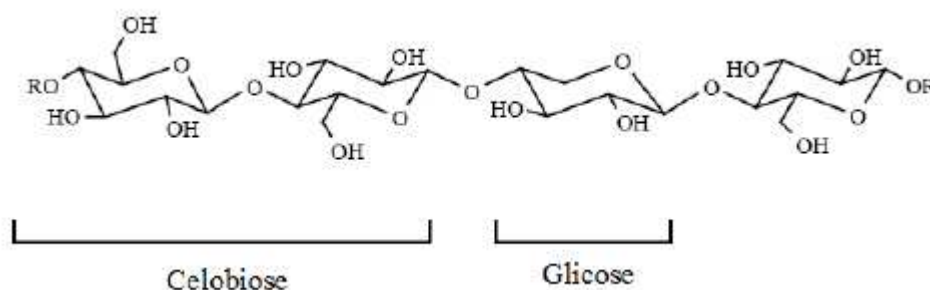


Figura 2.3: Estrutura polimérica da celulose, com destaque para os monômeros de glicose e os dímeros de celobiose (FENGEL e WEGENER, 1989).

O polímero apresenta ligações de hidrogênio, inter e intra-moleculares, que formam as microfibrilas, responsáveis pela rigidez da molécula (ZHBANKOV, 1992; EBRINGEROVA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). As microfibrilas que possuem alto grau de organização formam estruturas compactas na cadeia de celulose, chamadas regiões cristalinas, características por serem mais resistentes à biodegradação. Por outro lado, as microfibrilas menos organizadas formam regiões amorfas, que são mais susceptíveis aos agentes hidrolíticos (MENON e RAO, 2012). A fibra cristalina tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação, já a amorfa apresenta maior flexibilidade (FENGEL e WEGENER, 1989). No entanto, a proporção destas duas formas de fibras difere entre as diferentes biomassas lignocelulósicas, sendo a região amorfa mais propensa à bioconversão por enzimas (MENON e RAO, 2012).

2.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são o segundo polissacarídeo mais abundante presente nas plantas e apresenta um menor peso molecular comparado à celulose. Sua estrutura é amorfa

e ramificada, constituída principalmente de pentoses (D-xilose e D-arabinose) e algumas hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose). Além desses, sua estrutura também pode conter açúcares ácidos (ácidos urônicos), tais como ácido D-glucurônico, D-galacturônico, ácidos metilgalacturônico e 4-O-metilglucurônico (McMILLAN, 1993; EBRINGEROVA e HEINZE, 2000; SAHA, 2003; SOCCOL, 2010) e grupos acetil que podem ser liberados durante a hidrólise das hemiceluloses (RITTER, 2008).

A Figura 2.4 apresenta a estrutura dos principais monossacarídeos que formam as hemiceluloses.

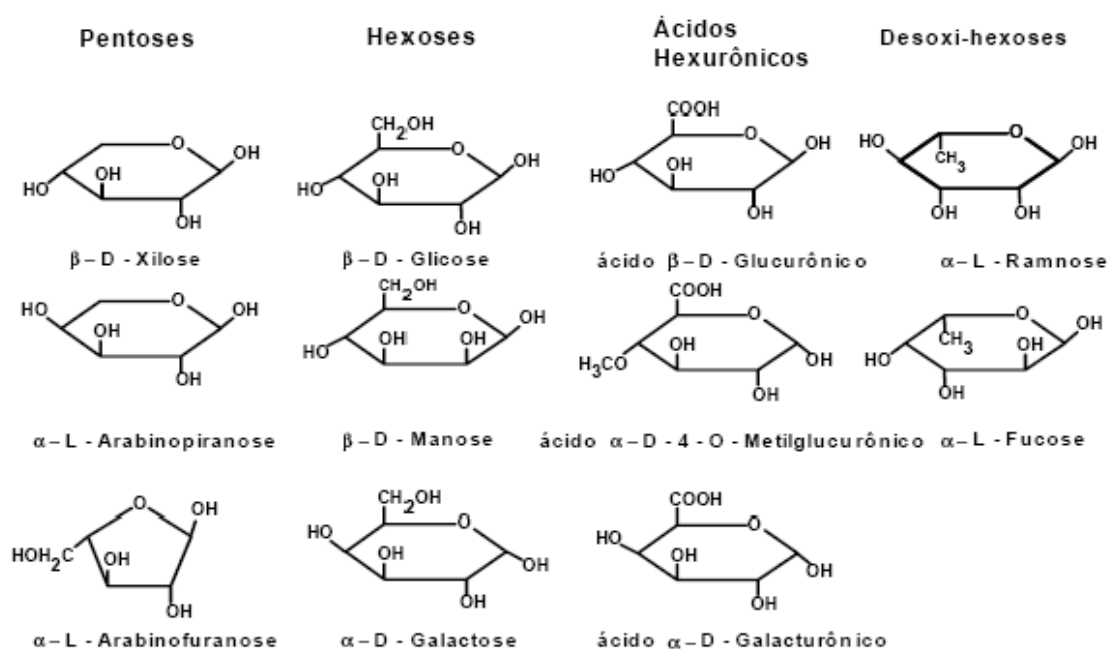


Figura 2.4: Estrutura dos principais monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

De acordo com SCHELLER e ULVSKOV (2010), as hemiceluloses são constituintes da parede celular das plantas e sua cadeia principal é composta de xilana, formada por aproximadamente 90% D-xilose e 10% L-arabinose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas.

Entre as diferentes biomassas, existem variações na proporção dos açúcares que compõe as hemiceluloses, assim como no grau de ramificações do polissacarídeo

(McMILLAN, 1993; GLASSER *et al.*, 2000). O seu grau médio de polimerização (GP) está entre 80-200, e seus carboidratos estão normalmente associados com vários outros componentes de parede celular, como a celulose, proteínas, lignina e compostos fenólicos. A ligação entre esses componentes geralmente ocorre através de ligações covalentes e de hidrogênio, assim como por interações iônicas e hidrofóbicas (SUN *et al.*, 2000).

As hemiceluloses possuem diversos segmentos nos quais podem ser aplicadas. Quando hidrolisadas, as pentoses (xilose e arabinose) e as hexoses (glicose, galactose e manose) podem ser utilizadas para a produção de etanol ou de produtos químicos com maior valor agregado, tais como 5-hidroximetilfurfural, furfural, ácido levulínico e xilitol (CANILHA *et al.*, 2003). A Figura 2.5 apresenta os principais produtos de degradação das hemiceluloses.

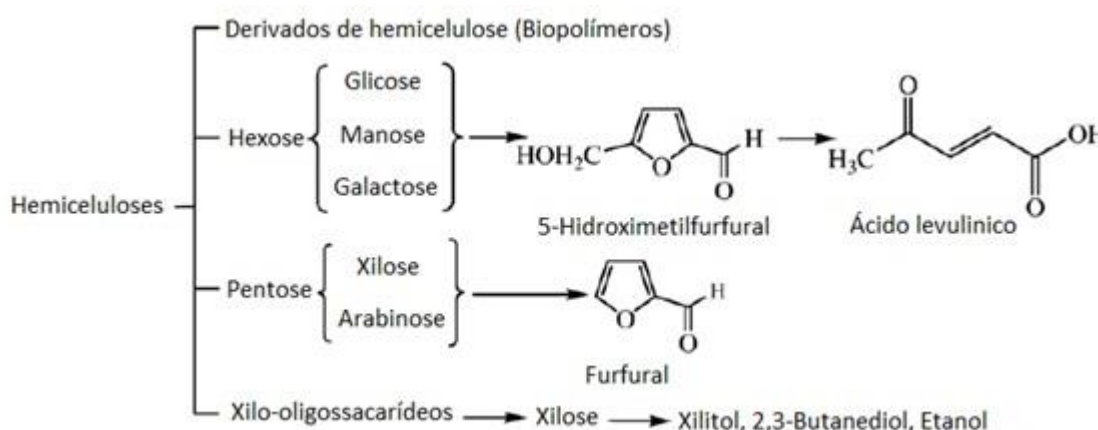


Figura 2.5: Principais produtos de degradação das hemiceluloses (PENG *et al.*, 2012).

2.1.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula rígida e aromática que, diferentemente da celulose, exibe uma estrutura amorfa. Ela está presente na parede celular vegetal e sua estrutura funciona como uma barreira física contra a ação de microrganismos e água, além de dar suporte, rigidez e impermeabilidade à parede celular da planta (MIELENZ, 2001; SANCHEZ *et al.*, 2009; MÄKI-ARVELA *et al.*, 2010). A Figura 2.6 mostra uma representação ilustrativa da estrutura da lignina.

Essa macromolécula é formada por unidades de fenilpropano que dão origem a uma estrutura tridimensional muito complexa. Sua síntese ocorre pela formação de radicais

livres que são liberados na desidrogenação, mediada por peroxidase, de três álcoois fenilpropanóicos, sendo eles: álcool coniferílico (guaiacilpropanol), álcool p-cumarílico (p-hidroxifenilpropanol) e álcool sinapílico (siringilpropanol) (SANCHEZ *et al.*, 2009).

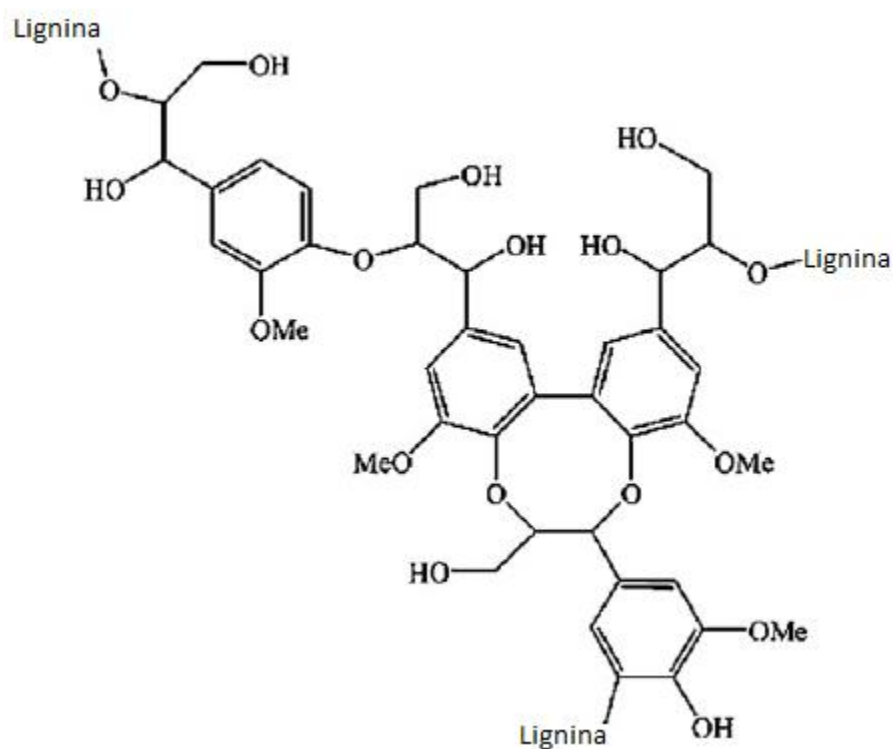


Figura 2.6: Ilustração esquemática da estrutura da lignina (adaptado de SUN *et al.*, 2009).

A Figura 2.7 mostra a estrutura dos três principais álcoois precursores da formação da lignina.

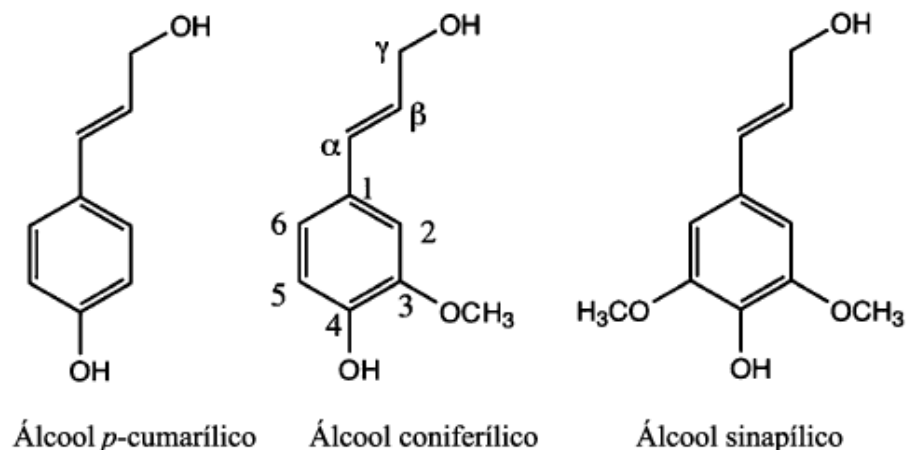


Figura 2.7: Estrutura dos álcoois precursores da lignina (adaptado de WONG, 2009).

Em madeiras de plantas decíduas, a lignina é composta por quantidades equivalentes de guaiacilpropanol, *p*-hidroxifenilpropanol e siringilpropanol, sendo essas unidades ligadas por ligações éter de arilo, formando uma rede tridimensional. Já em coníferas, o principal constituinte da lignina é o guaiacilpropanol, com pequenas quantidades de *p*-hidroxifenilpropanol e siringilpropanol (BOBLETER, 1994; SANCHEZ *et al.*, 2009).

2.2. Pré-tratamento

Os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica devem ser convertidos em açúcares simples, basicamente monômeros, para que possam ser fermentados a etanol. No entanto, a celulose nativa é bastante protegida por uma matriz de lignina e hemiceluloses, dificultando a ação das enzimas sobre a celulose. Desta forma, se faz necessário um pré-tratamento do material para remover/desestruturar as frações de lignina e hemiceluloses, de modo que as fibras de celulose se tornem mais acessíveis e mais abundantes no material quando submetido à ação enzimática.

A biomassa nativa é muito recalcitrante à ação das enzimas devido a fatores físico-químicos, estruturais e da sua composição (MOSIER, 2005). Por esse motivo, o pré-tratamento é crucial para que seja possível obter efetividade na hidrólise enzimática, uma vez que a hidrólise do material não pré-tratado produz menos de 20% de glicose da fração

de celulose inicial (ZHANG e LYND, 2004). Ele permite alterar a estrutura da biomassa, sendo responsável pelo aumento da área de superfície e porosidade do material, modificar e remover a lignina, remover parcialmente as hemiceluloses, e reduzir a cristalinidade da celulose (BEHERA *et al.*, 2014).

O pré-tratamento é uma das etapas mais custosas do processo de conversão da biomassa lignocelulósica, sendo responsável por até 20% dos custos totais da produção. (HSU *et al.*, 1980; LEE *et al.*, 1994; LYND *et al.*, 1996; WHEALS *et al.*, 1999; MOSIER *et al.*, 2003). Além disso, influencia diretamente nas outras etapas do processo, desde a redução de partícula dependendo da matéria-prima utilizada, como na hidrólise enzimática e na fermentação (BARROS, 2013).

De acordo com TAHERZADEH e KARIMI (2008), um pré-tratamento efetivo e econômico deve estar de acordo com os seguintes itens:

- Tornar as fibras de celulose susceptíveis ao ataque enzimático;
- Evitar a degradação da celulose;
- Evitar a formação de possíveis inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação por microrganismos;
- Minimizar o consumo de energia;
- Evitar os custos com redução de tamanho das partículas da matéria-prima;
- Reduzir os custos de materiais para a construção de reatores de pré-tratamento;
- Produzir baixas quantidades de resíduos;
- Consumir pouco ou nenhum produto químico.

A Figura 2.8 apresenta uma representação ilustrativa simplificada da estrutura de um material lignocelulósico antes e após o pré-tratamento.

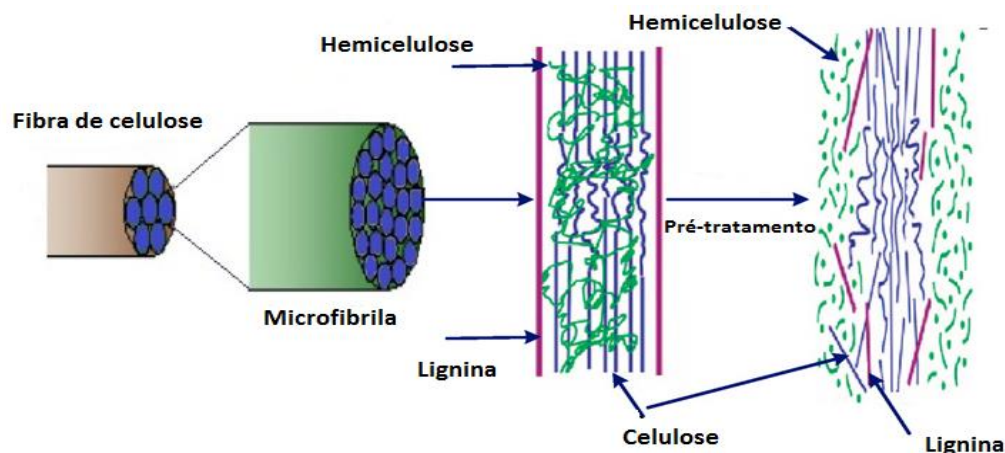


Figura 2.8: Representação esquemática simplificada do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado de CHANDRA *et al.*, 2012).

O pré-tratamento deve ser forte o suficiente para desestruturar o complexo lignocelulósico e possibilitar a separação dos seus principais componentes (celulose, hemiceluloses e lignina) sem que ocorra degradação química (ROCHA *et al.*, 2011). Diversos métodos de pré-tratamento são descritos na literatura. Atualmente, os mais estudados são o físico, químico e físico-químico (KHULLAR *et al.*, 2013).

Os principais métodos de pré-tratamento, seus efeitos, as vantagens e desvantagens são apresentados na Tabela 2.3 (CONDE-MEJÍA *et al.*, 2012).

Tabela 2.3: Principais métodos de pré-tratamento (CONDE-MEJÍA *et al.*, 2012).

Pré-tratamento	Processo	Efeito	Vantagens e desvantagens
Biológico	Microrganismo (fungo, actinomiceto)	Remove lignina	Baixo consumo de energia, taxa muito lenta de hidrólise, desperdício de material pela degradação.
	Fragmentação (bola, martelo, compressão)	Decréscimo do tamanho de partícula e da cristalinidade da celulose	Alto consumo de energia
Físico	Irradiação (feixe de elétrons, raios gama, microondas)	Aumento da área de superfície e do tamanho dos poros. Parcial despolimerização da lignina	Pouca investigação nesse assunto
	Hidrotérmico	Hidrólise parcial das hemiceluloses	Baixa pressão e menor destruição de xilana que a explosão a vapor
Físico-químico	Explosão a vapor		Destruição de uma parte da xilana, desestruturação incompleta da lignina.

Pré-tratamento	Processo	Efeito	Vantagens e desvantagens
Químico	Hidrólise ácida (carbônico, clorídrico, fluorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico)		Tempos de residência curtos, altas conversões de hemiceluloses. Corrosão de equipamentos.
	Extração alcalina (hidróxido de cálcio, sódio e amoníaco)		Em baixa temperatura e pressão é necessário longo tempo de residência. Parte dos sais formados são irre recuperáveis.
	Explosão com dióxido de carbono	Diminuição da cristalinidade da celulose, hidrólise parcial ou completa de hemiceluloses, deslignificação.	Não produz inibidores. Não modifica as hemiceluloses e lignina.
	Explosão fibra amônia (AFEX)		Não produz inibidores. Não é efetivo com alto conteúdo e de lignina na biomassa.
	Organossolve (etanol-água, água-benzeno, etileno-glicol, butanol-água)		Alta deslignificação, reciclagem de solventes. Alguns solventes são explosivos e inflamáveis.

2.2.1. Pré-tratamento físico

Os tipos de pré-tratamentos físicos são geralmente classificados em dois grandes grupos: mecânicos (diferentes formas de moagem) e não mecânicos (radiação), que tem como objetivo melhorar a hidrólise enzimática ou a biodegradabilidade da biomassa lignocelulósica (FAN *et al.*, 1982).

2.2.1.1. Moagem

Numerosos estudos que investigam a influência do tamanho de partícula na conversão de biomassa são encontrados na literatura (GOEL e RAMACHANDRAN 1983; ZHENG *et al.* 2007; LIU *et al.* 2009; VIDAL-Jr *et al.*, 2011; KHULLAR *et al.* 2013).

Há uma grande divergência nos resultados obtidos, sendo que alguns apontam uma melhor eficácia na conversão quando são utilizadas partículas menores de biomassa, enquanto que outras apontam pouca ou nenhuma diferença de conversão quando são utilizadas partículas reduzidas. VIDAL-Jr. *et al.* (2011) faz um levantamento de diversos trabalhos que reportam que o tamanho de partícula não exerce efeito significativo na conversão da biomassa (RIVERS e EMERT, 1987; RIVERS e EMERT, 1988; MONAVARI *et al.*, 2009; JONGLERTJUNYA *et al.*, 2014), e de trabalhos que apontam que o tamanho de partícula influenciou na conversão (DÜSTERHÖFT *et al.*, 1995; PORDESIMO *et al.*, 2005; DASARI e BERSON, 2007).

A redução do tamanho de partícula da biomassa é um processo que necessita de uma grande quantidade de energia, tornando-o bastante custoso (LIU *et al.*, 2013). TAHERZADEH e KARIMI (2008) apontam diferentes formas de moagem a que o material lignocelulósico pode ser submetido, como moinho de bolas, moinho de facas, moinho de martelo e moagem coloidal. O principal objetivo é reduzir o tamanho das partículas, tornando maior sua superfície de contato e melhorar a transferência de calor e massa no processo. Além disso, a moagem provoca alterações na estrutura que podem reduzir a cristalinidade das fibras de celulose, de modo a alcançar melhores conversões (FAN *et al.*, 1980; MAIS *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009).

A Tabela 2.4 apresenta avaliação da moagem de diferentes materiais lignocelulósicos na conversão de açúcares na hidrólise enzimática (VIDAL-Jr. *et al.*, 2011).

Tabela 2.4: Efeito da redução do tamanho de partícula na conversão de açúcares na hidrólise enzimática para diferentes materiais lignocelulósicos (adaptado de VIDAL-Jr. *et al.* (2011)).

Material	Faixa granulométrica	Efeito na conversão	Referência
Bagaço de cana	0,443-0,224 mm	Nenhuma diferença	RIVERS e EMERT (1988)
Palha de arroz	0,465-0,107 mm	Nenhuma diferença	RIVERS e EMERT (1988)
Palha de milho	0,152-0,075 / 2,0-1,68 mm	Aumenta de 15% rendimento de glicose	ELSHAFEI <i>et al.</i> (1991)
Palha de trigo	Não reportado	Aumento de 4x em açúcares redutores	GHARPURAY <i>et al.</i> (1983)

Os trabalhos apontados na Tabela 2.4 utilizam a moagem como única forma de pré-tratamento. Foi observado que a redução do tamanho de partícula influenciou em alguns trabalhos, e em outros foi reportado que não houve influência na conversão da biomassa.

VIDAL-Jr. *et al.* (2011) afirmam que somente a diminuição das partículas do material é insuficiente para obtenção de efeitos expressivos na conversão durante a etapa de sacarificação. Além disso, apontam também que não é possível avaliar o efeito do tamanho de partícula na conversão da biomassa sem levar em consideração o pré-tratamento termoquímico utilizado.

Há diversos trabalhos na literatura que avaliam o efeito do tamanho de partícula em diferentes pré-tratamentos e biomassas (BALLESTEROS *et al.*, 2002; MAIS *et al.*, 2002; MONAVARI *et al.*, 2009; KHULLAR *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013).

2.2.2. Pré-tratamento químico

Os pré-tratamentos químicos modificam a estrutura do material lignocelulósico utilizando agentes químicos, tais como bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, e solventes orgânicos. São característicos por remover as frações de lignina e/ou

hemiceluloses de forma que as fibras de celulose se tornem mais acessíveis à hidrólise enzimática (HSU, 1996; MOISER *et al.*, 2005).

Por outro lado, a reação dos componentes da biomassa com agentes químicos, geralmente levam à formação de inibidores do tipo ácidos carboxílicos, furfurais e compostos fenólicos. Esses componentes não só podem prejudicar a hidrólise enzimática, como também inibir o crescimento de microrganismos utilizados na fermentação (TAHERZADEH, 1999; TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

2.2.2.1. Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento com ácido diluído é um dos métodos mais maduros utilizados (CHHEDA *et al.*, 2007). Embora diversos ácidos tenham sido estudados, o ácido sulfúrico se destaca como o mais utilizado, por apresentar uma grande efetividade no processo e pelo baixo custo (SUN e CHENG, 2005). O pré-tratamento envolve a mistura da biomassa com soluções ácidas, com concentrações variando de 2 a 0,5% (m/v), associadas a temperaturas que variam de 120 a 220°C (VIDAL-Jr *et al.*, 2011).

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído costuma ser bastante efetivo na solubilização das hemiceluloses, deixando o material sólido poroso e com maior conteúdo de celulose e lignina. A remoção das hemiceluloses enfraquece a estrutura da matriz lignocelulósica, aumentando assim a acessibilidade da celulose. No entanto, em condições severas, as pentoses e hexoses livres podem ser degradadas em inibidores de hidrólise enzimática e fermentação. Portanto, a otimização das condições de pré-tratamento é importante para uma conversão eficiente da biomassa (BENJAMIN *et al.*, 2014). Parte da celulose também pode ser convertida em monômeros ou oligômeros, o que é vantajoso, pois podem ser facilmente fermentados por leveduras (MANZOOR *et al.*, 2012), porém a maior parte da celulose permanece no material pré-tratado, podendo ser convertida a açúcares monoméricos na hidrólise enzimática (CHEN *et al.*, 2010). Infelizmente, a dificuldade para descristalizar a celulose dificulta a obtenção de altos rendimentos de açúcares (JIANG *et al.*, 2013). A lignina pode sofrer alteração na sua estrutura, porém sua maior parte permanece na fração sólida pré-tratada (CHUNG *et al.*, 2012).

Diferentes tipos de reatores podem ser utilizados para esse pré-tratamento, como reatores de percolação, fluxo empistonado e contracorrente (TAHERZADEH e KARIMI,

2008). A temperatura de reação é um importante parâmetro a ser estudado no pré-tratamento com ácido diluído (CHIARAMONTI *et al.*, 2012) e por ser um método amplamente estudado, diversos tipos de resíduos agroindustriais são avaliados em associação a esse pré-tratamento (BENJAMIN *et al.*, 2014).

A Tabela 2.4 apresenta alguns trabalhos da literatura em que são utilizadas diferentes biomassas lignocelulósicas (resíduos agroindustriais) no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. As condições do pré-tratamento (temperatura, tempo e concentração de ácido) também são mostradas.

Pode-se observar uma grande variação nas condições de pré-tratamento. Dessa forma, a otimização das condições torna-se importante para que seja possível obter grande eficiência na remoção de hemiceluloses e recuperação de monômeros no licor, além de grande efetividade na hidrólise enzimática, com baixa formação de inibidores.

Tabela 2.5: Trabalhos da literatura em que foi empregado o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Material	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de ácido	Referência
Bagaço de cana	150-180	15 min	0,07-0,96% (m/m)	BENJAMIN <i>et al.</i> (2013)
Bagaço de cana	112,5-157,5	5-35	0-3% (m/v)	CANILHA <i>et al.</i> (2011)
Bagaço de cana	170	15	3% (m/m)	HARRISON <i>et al.</i> (2013)
Palha de trigo	121	60	3% (m/m)	HONG <i>et al.</i> (2014)
Palha de trigo	121	90	0-3% (m/v)	QI <i>et al.</i> (2010)
Palha de trigo	160-200	1-35	0-2,5% (m/m)	KABEL <i>et al.</i> (2007)
Palha de canola	180	5-20	0,5-2% (m/v)	LU <i>et al.</i> (2009)
Bagaço de caju	121	15-45	0-1 mol/L	ROCHA <i>et al.</i> (2014)

2.3. Hidrólise

Os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica podem ser hidrolisados a açúcares monoméricos para posterior fermentação. Vários métodos são descritos na literatura para a hidrólise desse material, sendo que os mais comumente utilizados são a hidrólise química (com ácidos diluídos e concentrados) e a hidrólise enzimática (BALAT, 2011).

Também há outros agentes hidrolíticos que são menos utilizados, como a irradiação com raios gama, feixes de elétrons e micro-ondas; porém, são processos que estão longe de serem aplicados comercialmente (TAHERZADEH, 1999).

A hidrólise ácida é dividida em dois grupos: a condicionada com ácidos concentrados e outra com ácidos diluídos. O método com ácidos concentrados é um processo relativamente antigo, descoberto por Braconnot em 1819 (SHERRARD e KRESSMAN, 1945). Geralmente, utilizam-se soluções aquosas de ácidos fortes como o ácido sulfúrico e o clorídrico, em concentrações que variam de 30 a 70%. A recuperação de açúcar pode chegar a até 90%, além de ser operado a baixas temperaturas (aproximadamente 40°C), tornando-o mais vantajoso em relação ao processo com ácido diluído. Em contraste a essas vantagens, esse método requer equipamentos de alto custo, necessários para resistirem à corrosão; requer também grande gasto energético para recuperação dos ácidos, assim como necessidade de neutralização devido a problemas ambientais (JONES e SEMRAU, 1984; KATZEN *et al.*, 1995; WYMAN, 1996).

Dentre os métodos químicos, o com ácidos diluídos é o mais comumente usado em processos de hidrólise. Além disso, também é empregado para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para posterior hidrólise enzimática (QURESHI e MANDERSON, 1995). Cerca de 80% das hemiceluloses podem ser hidrolisadas a temperaturas de no máximo 200°C, porém o rendimento máximo de recuperação de glicose só é possível a temperaturas superiores a 220°C, devido à grande recalcitrância da celulose à hidrólise (CLARK e MACKEL, 1984; LARSSON *et al.*, 1998; WYMAN, 1994).

Outro problema em utilizar a hidrólise ácida para a sacarificação dos polissacarídeos presentes na biomassa é a formação de produtos inibidores de fermentação, devido à degradação dos açúcares produzidos pelas condições drásticas de temperatura

utilizadas no processo. Os principais inibidores são o furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Por outro lado, a hidrólise enzimática é considerada a tecnologia mais importante para a conversão dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica. A conversão é realizada através de enzimas que agem sinergicamente para converter os carboidratos em açúcares monoméricos, os quais possam ser posteriormente fermentados (DYK e PLETSCHE, 2012). Contudo, a biomassa nativa deve ser submetida primeiramente a um processo de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da celulose e torná-la mais acessível ao ataque enzimático (RABELO, 2010). Diferente da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é realizada em condições amenas (pH 4,8 e temperatura 50° C) (SUN e CHENG, 2002), além de tornar possível alcançar altos rendimentos de glicose, devido ao fato das enzimas apresentarem grande especificidade ao substrato, impedindo a formação de co-produtos indesejáveis (WYMAN, 1999; RILLEY, 2002; LEATHERS, 2003).

No entanto, para que sejam atingidas altas conversões de açúcar, altas concentrações de enzima devem ser utilizadas, aumentando o custo do processo e, consequentemente, do produto final (EKLUND *et al.*, 1990).

2.3.1. Hidrólise enzimática

Depois de pré-tratada, a matéria-prima lignocelulósica é submetida à hidrólise enzimática, levando à formação de glicose. As condições utilizadas, tais como: pH, temperatura e concentração das enzimas na reação devem ser bem estabelecidas de acordo com o material usado para que altas conversões de glicose sejam obtidas.

A geração eficaz de hidrolisado de glicose fermentescível é um dos principais requisitos para produção de etanol de segunda geração a um custo competitivo. Para que isso seja possível, muitos esforços estão sendo realizados, principalmente na melhoria das tecnologias de pré-tratamento da biomassa e de enzimas celulolíticas que catalisam a conversão da celulose em glicose e pentoses (ANDRIC *et al.*, 2010). ALVIRA *et al.* (2010), apontam alguns fatores que podem ser limitantes para a hidrólise enzimática, sendo eles: a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, a área de superfície disponível do substrato (volume do poro), barreira de lignina (conteúdo e sua distribuição no

substrato), conteúdo de hemiceluloses, tamanho de partícula do material, espessura da parede celular, mudança na acessibilidade com a conversão.

2.3.1.1. As enzimas celulasas

As enzimas celulasas, que condicionam a hidrólise enzimática da celulose da biomassa, podem ser produzidas por bactérias ou fungos, aeróbios ou anaeróbios, termofílicos ou mesofílicos. As principais bactérias usadas para produção dessas enzimas são: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* (RABINOVICH *et al.*, 2002). Os fungos filamentosos são amplamente estudados por produzirem um complexo enzimático extracelular que facilita a extração (CLAEYSSSEN & TOMME, 1989), sendo os mais citados: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, and *Sclerotium*, *Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus thermophile var. coprophile*, *Chaetomium thermophile*, *Coniochaeta ligniaria* (BHALLA *et al.*, 2013).

Três principais celulasas são responsáveis pela despolimerização da celulose em glicose, sendo elas: endoglucanase (EG) (EC 3.2.1.4), exo-glucanases/celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), e β -glicosidase ou celobiase (β G) (EC 3.2.1.21), pertencentes à família das glicosídeo hidrolases (GH), as quais catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas, despolimerizando a celulose em açúcares fermentescíveis (JUTURU e WU, 2014). A reação heterogênea ocorre em vários passos, no qual a celulose insolúvel é inicialmente hidrolisada na interface sólido-líquido através da ação sinérgica de endoglucanases e exo-glucanases/celobiohidrolases. Posteriormente, a β -glicosidase hidrolisa os produtos intermediários solúveis (ANDRIC *et al.*, 2010). As endoglucanases são responsáveis por iniciarem a hidrólise. Elas hidrolisam regiões amorfas das cadeias internas do polímero de celulose, resultando na diminuição do grau de polimerização e formando extremidades redutoras e não redutoras. Em seguida, as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH I e CBH II) hidrolisam as extremidades redutoras (CBH I) e não redutoras (CBH II) em celobiose e celooligosacarídeos. Finalmente, a celobiose será clivada em duas moléculas de glicose pela ação da β -glicosidase, que exerce um efeito crucial na velocidade de reação de degradação da celulose e previne o acúmulo de celobiose (ALVES DO PRADO *et al.*, 2011). Os produtos finais da hidrólise enzimática

funcionam como inibidores da atividade enzimática, sendo que a exoglucanase é inibida pela celobiose e a β -glicosidase é inibida pela glicose (DEKKER, 1989).

A Figura 2.9 é uma adaptação de ANDRIC *et al.* (2010), na qual são mostradas as principais vias cinéticas das celulases e interações em relação às inibições.

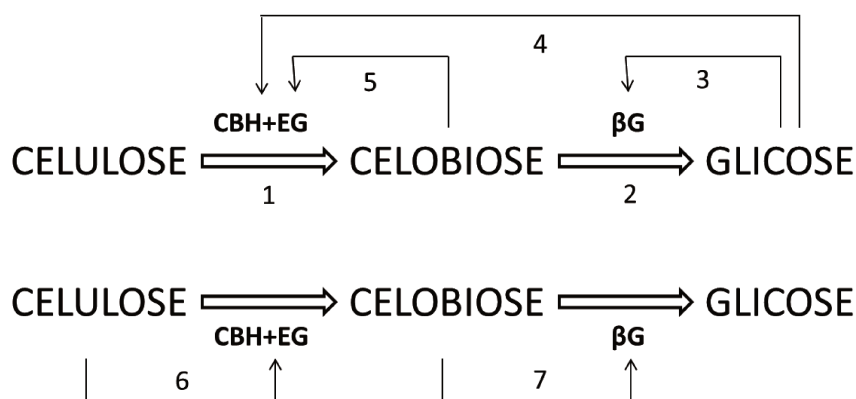


Figura 2.9: Visão geral das principais vias cinéticas e interações em relação à inibição de produtos: principais reações (1,2), inibição pela glicose (3,4), inibição pela celobiose (5), inibição pelo substrato (6,7) (ANDRIC *et al.*, 2010).

2.3.1.1. Estrutura e propriedade das celulases

Celulases fúngicas têm uma estrutura simples contendo um domínio catalítico (CD) e um domínio de ligação à celulose (CBD). CD está ligado à CBD por meio de um peptídeo ligante. O CBD se liga ao substrato de celulose permitindo que o CD execute sua função catalítica. O CBD não está envolvido na hidrólise, mas a sua remoção reduz significativamente a atividade da enzima. A estrutura da endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase são mostradas na Figura 2.10 (JURURU e WU, 2014).

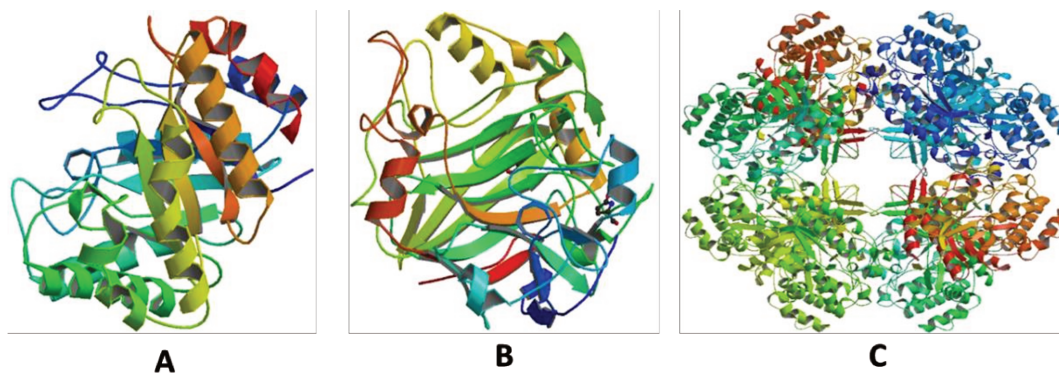


Figura 2.10: (A) Estrutura da endoglucanase de *T. aurantiacus* (335 aminoácidos); (B) estrutura da exoglucanase de *P. chrysosporium* (431 aminoácidos); (C) estrutura da β -glicosidase de *B. polymyxa* (713 aminoácidos) (JURURU e WU, 2014).

Funcionalmente, as exo e endoglucanases executam a mesma função, sendo a de hidrolisar as ligações glicosídicas. Estruturalmente, diferem no local de ligação à celulose. As exoglucanases são geralmente mais longas e formam um túnel que engloba os resíduos catalíticos. O substrato geralmente chega ao sítio ativo a partir da extremidade do túnel. Por outro lado, as endoglucanases têm laços mais curtos que formam uma fenda de ligação mais aberta e permitem um acesso mais direto às cadeias de celulose (JURURU e WU, 2014).

Entre os fungos celulolíticos, o *Trichoderma reesei* tem umas das melhores atividades de degradação de celulose. O seu componente da celulase mais altamente produzido é a CBH I, que representa cerca de 60% da proteína total segregada. A CBH II e EGs (sendo a maioria EG1) correspondem a cerca de 20 % e 10 % da proteína total segregada, respectivamente. As β Gs representam apenas 1 % do total de proteína total. A alta produção de CBHs pode estar relacionada com a alta atividade de degradação de celulose (TAKASHIMA *et al.*, 1998).

A massa molecular dos principais componentes do sistema celulolítico de *T. reesei* são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.6: Massa molecular do sistema celulolítico de *T. reesei* (OLSSON *et al.*, 2005)

Enzima	Massa molecular (kDa)
CBH I	54,1
CBH II	49,7
EG I	48,2
EG II	44,2
EG III	25,2
EG IV	35,5
EG V	24,4
BG I	78,4
BG II	52,2

O fungo excreta principalmente exoglucanase, sendo aproximadamente 60% de CBHI e 20% de CBH II, responsáveis pela alta atividade de degradação da celulose.

2.4. Conclusões

Embora haja vários estudos em relação à influência do tamanho de partícula no pré-tratamento e hidrólise enzimática, os resultados divergem bastante em relação à melhoria na conversão da biomassa. O tipo de material lignocelulósico utilizado, a faixa granulométrica avaliada e o tipo de pré-tratamento a qual a biomassa é submetida, podem esfluenciar diretamente nos resultados. Dessa forma, diferentes granulometrias do bagaço de cana foram avaliadas no pré-tratamento ácido sulfúrico diluído e, posteriormente, na hidrólise enzimática, para avaliar a influência do tamanho de partícula na conversão da biomassa.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e as metodologias desenvolvidas no trabalho. Entre elas incluem a preparação das amostras de bagaço, os procedimentos de análises de composição química, de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

3.1. Matéria-Prima

3.1.1. Matéria-prima para o estudo

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi proveniente de uma mesma safra e fornecido pela Usina Tarumã do Grupo Raízen, localizada na cidade de Tarumã, Estado de São Paulo. O material foi proveniente da safra de 2011/12, obtido por colheita manual da cana queimada e resultante da última moenda após a extração do caldo.

3.2. Materiais

3.2.1. Enzimas

As enzimas utilizadas foram a celulase comercial de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, ATCC 26 921) e β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozyme-188, Sigma-Aldrich).

3.2.2. Equipamentos

Os equipamentos usados para execução dos experimentos foram:

- Aparato soxhlet modelo MA – 188 da marca Marconi;
- Autoclave vertical modelo A V 50 da marca Phoenix;
- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança de umidade modelo IV2000 da marca Gehaka com analisador infra-vermelho;
- Banho termostaticado modelo MA – 184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$;
- Bomba a vácuo, marca Marconi, modelo MA 057/3;

- Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5810 R;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), modelo 1260 da marca Infinity HPLC Agilent Technologies com detector de índice de refração IR e DAD UV-vis;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Fracionador de biomassa da marca Fritsch, modelo Analysette 3;
- Incubadora refrigerada com agitação orbital, marca Marconi, modelo MA 832;
- Medidor de pH industrial DM-22 da marca Digimed;
- Micro moinho de faca modelo MA – 630/1/E da marca Marconi;
- Moinho de facas modelo Pulverisette 19 da marca Fritsch;
- Mufla modelo Q-318D24 da marca Quimis;
- Reator de aço inox, capacidade de 500 mL, pressão máxima de 25 Kg/cm².

3.2.3. Reagentes e padrões cromatográficos

- 5-hidroximetilfurfural – Chem Service
- Acetonitrila - Vetec
- Ácido acético – Chemco
- Ácido cítrico – Synth
- Ácido dinitro-3,5-salicílico - Vetec
- Ácido sulfúrico – Synth
- Álcool etílico - Synth
- Azida sódica - Synth
- D-celobiose – Fluka
- D-arabinose – Sigma-Aldrich
- D-glicose – Merck
- D-manose – Chem servisse
- D-xilose – Fluka
- Glicerina - Synth
- Fenol - Vetec
- Furfural – Chem servisse
- Hidróxido de sódio – Synth

- Kit Glicose GOD-PAP – Laborlab
- Papel de filtro nº1 – Whatman
- Tartarato de sódio e potássio – Ecibra

3.3. Procedimentos Experimentais

3.3.1. Moagem do bagaço

O bagaço foi moído em três diferentes granulometrias: $\leq 0,5$; $\leq 1,0$ e $\leq 2,0$ mm. A moagem foi realizada no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE – Campinas, SP) através de um moinho de facas da marca Fritsch, modelo Pulverisette 19, o qual utiliza peneiras para obter o material com a granulometria desejada. Além desses três materiais moídos, também foi utilizado o bagaço integral nas análises realizadas no presente trabalho. A Figura 3.1 apresenta o bagaço não moído (bagaço integral) e os moídos nas diferentes granulometrias.



Figura 3.1: Amostras de bagaço em diferentes granulometrias.

3.3.2. Distribuição de tamanho de partículas das amostras de bagaço

Foi realizada a distribuição dos tamanhos de partículas das amostras de bagaço (não moído e moído). O equipamento utilizado foi o fracionador (Fritsch – Analysette 3), no qual foram utilizadas peneiras com diferentes tamanhos de abertura (6,7; 4; 0,85; 0,5; 0,3 e 0,15 mm). As peneiras foram previamente pesadas e colocadas no equipamento de forma que a peneira com maior abertura ficasse no topo. Foram utilizados 300 g de bagaço no fracionamento, durante 30 min. Após o término, cada peneira foi retirada do equipamento e

pesada para determinar a massa de bagaço que ficou retida. O cálculo para determinar a porcentagem de bagaço retido em cada peneira é mostrado na equação 3.1.

$$\% \text{ massa} = \frac{(M1-M2)}{300} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde:

M1: massa da peneira + massa do bagaço retido após o fracionamento, em g

M2: massa da peneira, em g

3.3.3. Determinação da composição química da biomassa

Para determinar a composição química das diferentes amostras (moídas e não moída), foram analisados o teor de cinzas, extrativos, lignina total (lignina insolúvel + solúvel), celulose, hemiceluloses e grupos acetil.

3.3.3.1. Teor de umidade

O teor de umidade do bagaço de cana foi determinado em balança da marca GEHAKA modelo IV2000 que analisa a umidade do material por infravermelho. A balança é pré-aquecida a 105°C durante 30 minutos. Após o pré-aquecimento, aproximadamente 2 g de bagaço são colocados na balança previamente tarada. A balança medirá a porcentagem de perda de massa, relativa ao teor de umidade do bagaço, até peso constante do material.

O cálculo para determinação do teor de umidade é dado pela Equação 3.2.

$$U\% = \frac{\text{massa bagaço úmido} - \text{massa bagaço a.s.}}{\text{massa bagaço úmido}} \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo que U representa o teor de umidade do material e *a.s.* representa a massa absolutamente seca do material.

3.3.3.2. Determinação de extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na metodologia NREL “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005). A determinação dos extrativos tem como finalidades quantificar os extrativos para a análise compositiva e remover o material não estrutural da biomassa antes da quantificação da lignina e dos carboidratos para que não haja interferência nestas etapas analíticas.

Este procedimento utiliza um processo de extração em duas etapas: remoção dos compostos solúveis em etanol e na água. Os componentes solúveis em etanol incluem clorofila, ceras ou outros componentes menores. Os solúveis em água podem incluir material inorgânico, açúcares não estruturais, entre outros.

A remoção dos extrativos do bagaço foi feita em soxhlet (Aparato soxhlet modelo MA – 188 da marca Marconi). Primeiramente, as amostras foram moídas para que ficassem com o aspecto similar ao do material de menor granulometria ($< 0,5$ mm). Posteriormente, foi determinado o teor de umidade de cada amostra de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.3.1. Foram adicionados 3,00 g do material (M_1) (descontando o teor de umidade) em cartuchos de extração feitos com papel de filtro. Os cartuchos com o bagaço foram colocados no tubo de extração do soxhlet. Foram adicionados 190 mL de álcool etílico 99% de pureza em cada balão do extrator juntamente com uma quantidade de pérolas de vidro. O aquecimento foi ligado e a extração se deu até que o solvente em torno do cartucho de extração ficasse incolor. Após o término da extração com etanol, os cartuchos foram lavados com água destilada para remoção do álcool etílico.

Em seguida, foi realizada a extração com água. Foram adicionados 190 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com uma quantidade de pérolas de vidro. A água em cada balão do extrator foi trocada à medida que esta apresentava coloração. A extração foi conduzida até que a água no balão ficasse incolor.

Ao término da extração, foram transferidas para cadinhos com placa filtrante de filtro sinterizado (No. 2) (devidamente tarados) (M_2) e filtradas a vácuo. Ao término da filtração, as amostras foram colocadas na estufa a 105°C para secagem até atingirem massa constante. Após a secagem, foram transferidas ao dessecador para resfriamento por 40 minutos e em seguida, pesadas em balança analítica (M_3). As análises foram realizadas em

duplicata para cada amostra e o material foi armazenado em frascos com tampa para posterior análise de composição química.

A Equação 3.2 apresenta o cálculo para determinação do teor de extrativos.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{M_1 - (M_2 - M_3)}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

M_1 : massa de bagaço descontado o teor de umidade, em g

M_2 : massa do cadinho, em g

M_3 : massa do cadinho + bagaço livre de extrativos, em g

3.3.3.3. Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi baseada no procedimento de BIANCHI (1995). A finalidade é quantificar o material inorgânico presente na biomassa.

Primeiramente, cadinhos de porcelana foram levados à mufla a 800°C por 2 horas. Após o resfriamento da mufla, os cadinhos foram transferidos para a estufa por 1h. Em seguida, foram levados a um dessecador para resfriamento e, posteriormente, efetuada a pesagem em uma balança analítica, tendo suas massas devidamente anotadas (M_{cadinho}).

Para esta análise, as amostras foram secas a 105°C até ficarem totalmente sem umidade. Foram pesadas 2 g de cada amostra nos cadinhos. Posteriormente, as amostras foram levadas a mufla para serem carbonizadas a 800°C por 2 horas. Decorrido este tempo, a mufla foi desligada e após o resfriamento, o material foi transferido à estufa a 105° C por 1 hora. Em seguida, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e efetuada a pesagem do material (M_{cinza}). As análises foram realizadas em duplicata para cada amostra.

O cálculo do teor de cinzas da biomassa é dado pela Equação 3.4.

$$\% \text{ teor de cinzas} = \left(\frac{M_{\text{cinza}} - M_{\text{cadinho}}}{M_{\text{C+B}} - M_{\text{cadinho}}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

$M_{\text{C+B}}$ = massa do cadinho + massa do bagaço descontando o teor de umidade, em g

M_{cadinho} = massa do cadinho calcinado vazio, em g

M_{cinzas} = massa do cadinho com cinzas, em g

3.3.3.4. Determinação do teor de carboidratos, lignina, grupos acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As análises foram realizadas com base nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy” (HYMAN *et al.*, 2007), “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2008a) e “Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar” (GOUVEIA *et al.*, 2009). O objetivo foi quantificar os teores dos carboidratos (celobiose, glicose, xilose e arabinose), lignina total (solúvel e insolúvel), ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Para esta análise, é necessário que o bagaço esteja livre de extrativos.

3.3.3.4.1. Hidrólise com H_2SO_4 72% (m/m)

Inicialmente, o bagaço livre de extrativos (como descrito no item 3.3.3.2) foi moído até obter o aspecto de pó. Posteriormente, o bagaço foi transferido à estufa a 105°C e mantido até peso constante, para remoção de toda umidade.

Foram pesadas 0,3 g de cada amostra de bagaço (M_1) em tubos de ensaios. Após a pesagem, 3 mL de H_2SO_4 72% (m/m) foram adicionados em cada tubo. Os tubos foram encubados em um banho termostático a 30°C por 1 h. A cada 10 minutos, o conteúdo nos tubos foram homogeneizados com a ajuda de um bastão de vidro, sem remover os tubos do banho, a fim de garantir uma hidrólise homogênea.

O conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para frascos tipo Schott de 250 mL e adicionados 84 mL de água destilada, obtendo uma concentração ácida do meio para 4%.

Os frascos devidamente tampados foram levados à autoclave a 121°C e 1,1 bar por 1 hora para a total hidrólise dos oligômeros formados. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados em banho de gelo fundente.

3.3.3.4.2. Determinação de Lignina Klason (insolúvel)

Inicialmente, papéis de filtro foram mantidos em estufa a 105°C até peso constante e pesados em balança analítica, tendo suas massas devidamente anotadas (M_2).

Em seguida, o hidrolisado foi filtrado nos papéis de filtro para posteriores análises de lignina solúvel, carboidratos, conteúdo acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Os sólidos retidos nos papéis foram lavados até pH neutro e levados à estufa a 105°C para secagem até peso constante. Em seguida, foram transferidos ao dessecador para resfriamento e, posteriormente, pesados em balança analítica, tendo suas massas devidamente anotadas (M_3).

Uma fração desse material insolúvel é constituída de cinzas. Assim, para que não haja uma superestimação dos dados de lignina insolúvel, foi realizada a análise do teor de cinzas, segundo a metodologia descrita no item 3.3.3.3, para que seja descontada do valor de lignina insolúvel obtida.

O cálculo do teor de lignina insolúvel no bagaço in natura e no bagaço pré-tratado são mostrados nas equações 3.5 e 3.6, respectivamente.

$$\text{lignina Insolúvel (\%)} = \left(\frac{(M_3 - M_2) - m_{\text{cinzas}}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{lignina Insolúvel (\%)} = \left(\frac{(M_3 - M_2) - m_{\text{cinzas}}}{M_1} \right) \quad (3.6)$$

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise, em g

M_2 : massa do papel de filtro tarado, em g

M_3 : massa do papel de filtro + lignina insolúvel seca, em g

3.3.3.4.3. Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV-Visível. Foi transferido 1 mL de cada hidrolisado ácido em balões volumétricos de 25 mL e adicionados 0,5 mL de solução de NaOH 6,5 N para atingir

pH 12, sendo o balão completado com água destilada. Em seguida, foi realizada a leitura da solução a 280 nm utilizando cubetas de quartzo. As leituras foram realizadas antes de completar 6 horas de hidrólise. O branco foi preparado partindo de uma solução de ácido sulfúrico 4% (m/m), tendo o pH ajustado com NaOH 6,5 N até pH 12. O cálculo da concentração da lignina solúvel é mostrado pela Equação 3.7.

$$C_{\text{lignina solúvel}} = 4,187 \times 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (3.7)$$

$$A_{pd} = c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2 \quad (3.8)$$

$C_{\text{lignina solúvel}}$ - concentração de lignina solúvel, em g/L;

A_T - absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;

A_{pd} = absorbância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), calculado através da Equação 3.8, cujas concentrações c_1 e c_2 serão determinadas previamente por HPLC e ε_1 e ε_2 são as absorvidades de furfural e HMF (146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹), determinadas experimentalmente (HYMAN *et al.*, 2007).

As equações 3.9 e 3.10 apresentam o cálculo para lignina solúvel do bagaço in natura e do bagaço pré-tratado, respectivamente.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{C_{\text{lignina solúvel}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot \text{FD}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{ extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.9)$$

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{C_{\text{lignina solúvel}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot \text{FD}}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.10)$$

$C_{\text{lignina solúvel}}$: concentração da lignina solúvel obtido através da Equação 3.7, em g/L

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

FD: fator de diluição do hidrolisado

M_1 : massa do bagaço utilizando na hidrólise, em g

Lignina total:

$$\% \text{ lignina total} = \% \text{ lignina insolúvel} + \% \text{ lignina solúvel}$$

3.3.3.4.4. Determinação dos carboidratos e produtos de decomposição por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

A quantificação dos açúcares: celobiose, glicose, xilose, arabinose; do ácido acético e dos produtos de decomposição: furfural e 5-hidroximetilfurfural; presentes no hidrolisado ácido (descrito no item 3.3.3.4.1) foram analisados em cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity HPLC Agilent Technologies com detector de índice de refração (IR) e DAD (detector de arranjo de diodos) UV-Vis. Também foram quantificados os teores de açúcares após a hidrólise enzimática, descrita no item 3.6.2.

Foram determinadas curvas analíticas utilizando soluções de concentrações conhecidas para cada um dos componentes: arabinose, celobiose, xilose, glicose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural. As faixas de concentrações de cada componente são apresentadas nas Tabelas 3.1.

Tabela 3.1: Faixa de concentração das curvas analíticas.

Componentes	Faixas de concentração (g/L)
arabinose	0,05 – 20
celobiose	0,05 – 20
xilose	0,05 – 20
glicose	0,05 – 20
ácido acético	0,1 - 10
furfural	0,0005 – 0,01
hidroximetilfurfural	0,0005 – 0,01

Os hidrolisados foram filtrados diretamente em *vials*, utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore), para posterior análise em HPLC.

3.3.3.4.1. Análise dos carboidratos

As curvas analíticas (arabinose, celobiose, xilose e glicose) e as amostras foram injetadas no cromatógrafo, sendo utilizada para análise a coluna ácida Biorad Aminex HPX-87H equipada com uma pré-coluna. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,01N com pH 2,6, preparada com água ultra-pura (Milli-Q). Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em filtros com poros de 0,45 µm e posteriormente, degaseificada.

As concentrações de cada componente foram determinadas das através áreas dos cromatogramas e das curvas analíticas (determinada na Tabela 3.1 do item 3.3.3.4.4).

As massas de celobiose e glicose foram convertidas em celulose, utilizando os fatores de conversão de 0,95 e 0,90, respectivamente. Da mesma forma, as massas de xilose e arabinose foram convertidas em hemiceluloses, empregando o fator de conversão de 0,88. Os fatores são calculados baseados na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise ácida (KAAR *et al.*, 1991 a,b), mostrados no apêndice I.

As condições de análise no cromatógrafo foram:

- Volume de injeção: 15 µL
- Taxa de fluxo: 0,6 mL/min
- Temperatura da coluna: 35°C
- Temperatura do detector: 30°C
- Detector: índice de refração
- Tempo de análise: 18 minutos

O cálculo do teor de carboidratos para o bagaço integral e para o bagaço pré-tratado é mostrado nas equações 3.11 e 3.12, respectivamente.

$$\% \text{ celulose ou hemiceluloses} = \left(\frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{ extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.11)$$

$$\% \text{ celulose ou hemiceluloses} = \left(\frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.12)$$

C_{HPLC} : concentração do açúcar quantificado por HPLC, em g/L;

FC: fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose: 0,95; glicose: 0,9; xilose: 0,88 e arabinose: 0,88);

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M_1 : massa do bagaço utilizado na hidrólise, em g.

3.3.3.4.4.2. Análise de grupos acetil

O ácido acético foi quantificado através da coluna ácida Biorad Aminex HPX-87H equipada com uma pré-coluna. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,01 N com pH 2,6, preparada água ultra-pura (Milli-Q). Após o preparo, a fase móvel foi filtrada em filtros com poros de 0,45 μm e, posteriormente, degaseificada.

As áreas obtidas pelo cromatograma correspondentes ao ácido acético foram utilizadas para calcular a concentração dos grupos acetil. Para isso, um fator de conversão de 0,72 foi utilizado para transformar o teor de ácido acético em acetato (KAAR *et al.*, 1991 a,b).

As condições de análise no cromatógrafo foram:

- Volume de injeção: 15 μL
- Taxa de fluxo: 0,60 mL/min
- Temperatura da coluna: 35°C
- Temperatura do detector: 30°C
- Detector: índice de refração
- Tempo de análise: 18 minutos

Os cálculos dos teores de acetato para o bagaço bruto e para o bagaço pré-tratado são mostrados nas equações 3.13 e 3.14, respectivamente.

$$\% \text{ acetato} = \left(\frac{C_{\text{A HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{ extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.13)$$

$$\% \text{ acetato} = \left(\frac{C_{A \text{ HPLC}} \cdot FC \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.14)$$

$C_{A \text{ HPLC}}$: concentração de ácido acético quantificado por HPLC, em g/L

FC: fator de conversão do ácido acético em acetato, 0,72

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizado na hidrólise, em g

3.3.1.4.4.3. Análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural

Para análise de furfural e 5-hidroximetilfurfural foi utilizada a coluna Nova-Pak C18 (Waters Co., Milford, MA) e, como fase móvel, uma solução de acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético), previamente filtrada e degaseificada. As áreas dos picos correspondentes ao furfural e 5-hidroximetilfurfural foram utilizadas para calcular suas concentrações na amostra. Os fatores de conversão utilizados para o furfural e o 5-hidroximetilfurfural foram 1,37 e 1,29, respectivamente.

As condições de análise no cromatógrafo foram:

- Volume de injeção: 15 µL
- Taxa de fluxo: 0,8 mL/min
- Temperatura da coluna: 30°C
- Comprimento de onda: 280 nm
- Temperatura do detector: temperatura ambiente
- Detector: UV-VIS
- Tempo de análise: 8 minutos

Os cálculos dos teores de hemiceluloses proveniente da quantificação do furfural, para o bagaço bruto e para o pré-tratado são mostrados pelas equações 3.15 e 3.16, respectivamente;

$$\% \text{ hemiceluloses}_{\text{furfural}} = \left(\frac{C_{\text{F HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.15)$$

$$\% \text{ hemiceluloses}_{\text{furfural}} = \left(\frac{C_{\text{F HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.16)$$

$C_{\text{F HPLC}}$: concentração de furfural quantificado por HPLC, em g/L

FC: fator de conversão do furfural, 1,37

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizado na hidrólise, em g

O cálculo do teor celulose proveniente da quantificação do 5-hidroximetilfurfural, para o bagaço bruto e para o pré-tratado são mostrados pelas equações 3.17 e 3.18, respectivamente.

$$\% \text{ celulose}_{\text{hidroximetilfurfural}} = \left(\frac{C_{\text{H HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times \left[1 - \left(\frac{\% \text{extrativos}}{100} \right) \right] \times 100 \quad (3.17)$$

$$\% \text{ celulose}_{\text{hidroximetilfurfural}} = \left(\frac{C_{\text{H HPLC}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.18)$$

$C_{\text{H HPLC}}$: concentração de ácido acético quantificado por HPLC, em g/L

FC: fator de conversão do 5-hidroximetilfurfural, 1,29

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa do bagaço utilizado na hidrólise, em g

3.3.4. Quantificação da fração líquida de pré-tratamento

O objetivo foi quantificar os açúcares presentes no licor (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. As análises foram realizadas antes e após uma etapa de hidrólise ácida para que os possíveis oligômeros presentes no licor sejam hidrolisados a açúcares monoméricos. A hidrólise ácida do licor foi realizada

com base nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples” (SLUITER *et al.*, 2008b). Primeiramente, 5 mL de cada amostra de licor foram adicionados em tubos de ensaios com tampa de rosca. A hidrólise ácida deve ser realizada com uma concentração de ácido de 4% (m/m). Sendo assim, o pH de cada amostra foi obtido e foi adicionada uma quantidade específica de H₂SO₄ 72% (m/m) para que a concentração de ácido do licor atingisse 4% (m/m). Os valores de pH e a equivalente quantidade de ácido a ser adicionado são apresentados por SLUITER *et al.* (2008b).

Após serem devidamente fechados, os tubos foram autoclavados a 121° C e 1,1 bar por 1 h. Decorrido o tempo de reação, os tubos foram retirados e resfriados. Os hidrolisados foram filtrados diretamente em *vials*, utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore), para posterior análise em HPLC. O licor bruto (sem hidrólise ácida) foi filtrado em papel de filtro e, em seguida, novamente filtrado diretamente em vials, utilizando os filtros de membrana GS em éster de celulose poros de 0,22 µm (Milipore). As amostras foram preparadas em duplicatas e analisadas por cromatografia líquida, conforme descrito no item 3.3.3.4.4.

3.5. Ensaios de pré-tratamento

3.5.1. Rampa de aquecimento do reator

Objetivando-se o conhecimento do tempo exato no qual o reator atingiu a temperatura desejada, realizou-se em uma etapa anterior ao pré-tratamento (separadamente para cada temperatura de reação estabelecida), o monitoramento da temperatura no interior do reator em função do tempo.

A literatura especializada reporta que a partir da temperatura de 100°C a reação de remoção dos componentes da biomassa lignocelulósica inicia-se (RABELO *et al.*, 2012). Portanto, para evitar que o tempo de reação fosse considerado erroneamente, realizou-se, para cada temperatura, o cálculo do Fator H, que relaciona a dissolução dos componentes da biomassa com as variáveis tempo e temperatura em um único fator. Este fator é característico do tipo de pré-tratamento e do tipo de reator utilizados, e varia de acordo com o sistema de aquecimento utilizado e com a temperatura de trabalho estabelecida. O Fator

H foi obtido a partir da área sob a curva de aquecimento de 100°C até a temperatura estabelecida, e a partir da razão entre este valor e a diferença entre estas duas temperaturas foi obtido o tempo H. O tempo total (t_{Total}) de aquecimento no qual o reator foi submetido pôde, então, ser calculado a partir da Equação 3.19:

$$t_{\text{Total}} = t_T + t_{\text{real}} - (t_T - H) \quad (3.19)$$

onde:

t_T é o tempo necessário para que a temperatura desejada seja alcançada no interior do reator,

t_{real} é o tempo de reação real no qual a biomassa é submetida,

H é o tempo calculado a partir do fator H.

3.5.2. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído

As amostras descritas no item 3.3.1 foram submetidas ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Os ensaios foram realizados em reatores de aço inox, com capacidade 500 mL, imersos em banho de aquecimento com glicerina. A massa utilizada no pré-tratamento foi de 30 g de bagaço (descontando o teor de umidade, de acordo com o item 3.3.3.1) e com uma concentração do catalisador ácido sulfúrico de 1% (m/v), na razão 1:5 sólido-líquido. Antes de o reator ser alimentado, o líquido foi misturado ao bagaço e homogeneizado com a ajuda de um bastão de vidro.

Um banho termostático (Marconi – MA 184) com glicerina foi utilizado para imergir os reatores para que atingissem a temperatura de pré-tratamento desejada. Foram avaliadas duas temperaturas e diferentes tempos de reação. Os ensaios foram realizados a 120°C em tempos de 20, 40 e 60 minutos, e a 140°C a 10, 20 e 30 minutos. O tempo inicial (t_T) foi fixado como o tempo em que a temperatura no interior do reator atinge a temperatura de operação. Para isso, a rampa de aquecimento do reator foi determinada, conforme mostrada no item 3.5.1.

Decorrido o tempo, os reatores foram retirados do banho de glicerina e submergidos em um banho de gelo fundente para interromper a reação. Após o resfriamento, os reatores foram abertos e o bagaço pré-tratado foi prensado manualmente para obtenção do licor de

pré-tratamento. O licor foi armazenado em frasco com tampa e refrigerado para posterior análise. A fração sólida foi lavada com água, para remoção dos componentes solúveis e do conteúdo ácido, até que o pH da água utilizada na lavagem atingisse a neutralidade.

Os ensaios foram realizados em duplicata. O material pré-tratado produzido foi homogeneizado e parte dele foi seco a 105°C para análise de composição química (descrita no item 3.3.3.4.1) e a outra parte foi seca a temperatura ambiente para ser utilizada na hidrólise enzimática.

Foram determinados o rendimento e a massa solubilizada para cada ensaio. O cálculo é mostrado na equação 3.20.

$$\text{Rendimento P. T. (\%)} = \frac{\text{massa obtida após P. T. (g)}}{\text{massa bruta inicial (g)}} \times 100 \quad (3.20)$$

$$\text{Massa solubilizada P. T. (\%)} = 100 - \text{Rendimento P. T.}$$

3.5.3. Fator de severidade

Foi determinado o fator de severidade (FS) para cada condição de pré-tratamento avaliada, o qual é muitas vezes usado para descrever a remoção de lignina e xilana durante a etapa de pré-tratamento (RABELO *et al.*, 2012). A equação 3.21 descreve o FS do pré-tratamento.

$$\log(R_0) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{T - T_{ref}}{14,75} \right) \right] \quad (3.21)$$

Onde t é o tempo de residência do pré-tratamento (min), T é a temperatura de pré-tratamento (°C), T_{ref} é a temperatura de referência (100°C). O valor 14,75 da constante arbitrária ω , é baseado na energia de ativação quando assumida a cinética de pseudo-primeira ordem.

O fator de severidade combinado (FSC) é calculado baseado no FS ($\log(R_0)$) (equação 3.21) e o pH do licor de pré-tratamento, mostrado pela equação 3.22.

$$\log(R'_0) = \log R_0 - pH \quad (3.22)$$

3.6. Hidrólise enzimática

3.6.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática das enzimas celulase e β -glicosidase foram determinadas de acordo com a metodologia de GHOSE (1987) e WOOD e BHAT (1988), conforme recomendado pela IUPAC.

3.6.1.1. Determinação da atividade enzimática para celulase

Para essa análise, foi preparada uma solução de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 e uma solução do reagente DNS, descrita por RABELO (2010), para determinação dos açúcares redutores totais (ART) após realizada a hidrólise.

Também foi construída uma curva analítica de glicose, com concentrações de 0,00 até 2,50 mg/mL de glicose. Foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro a 540 nm após a aplicação do método DNS (MILLER, 1959), para que seja possível obter um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância.

De acordo com GHOSE (1987), a atividade da celulase é determinada como unidade de papel de filtro (Filter Paper Unit – FPU). A reação foi realizada em tubos de ensaio em que foram adicionados 1,0 mL do tampão citrato, 50 mg de papel de filtro e 0,5 mL da enzima em diferentes diluições. Os tubos foram incubados em banho termostático a 50°C por 60 minutos. Após o final da reação, foi aplicado o método DNS em cada amostra e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma vez obtidas as leituras de absorbância, foi possível determinar a concentração de ART liberado pela enzima, calculado através da curva analítica de glicose, previamente obtida.

A Equação 3.23 foi usada para o cálculo da atividade de celulase (GHOSE, 1987).

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1} \quad (3.23)$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,037}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

Sendo assim, uma unidade de atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de 2 mg de açúcar reduzido como glicose equivalente, ou seja, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de enzima diluída em uma reação com duração de 60 minutos.

3.6.1.2. Determinação da atividade enzimática para β -glicosidase

Primeiramente, foi preparada uma solução de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 e uma solução de celobiose 15 mmol/L.

Também foi construída uma curva analítica de glicose com concentrações variando entre 0,00 até 4,00 mg/mL de glicose. Após preparação das amostras, foi aplicado o método Glicose GOD-PAP (HENRY, 1974) e, em seguida, realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

De acordo com WOOD e BHAT (1988), a atividade da β -glicosidase é medida utilizando uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU). A reação foi realizada em tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 1 mL da enzima em diferentes diluições, 1 mL da solução de celobiose 15 mmol/L. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho termostático a 50°C por 30 minutos.

Após o término da reação, foi aplicado o método Glicose GOD-PAP para determinar a glicose liberada pela enzima. Foram adicionados, em tubos de ensaio, 20 μL de cada amostra, juntamente com 2,0 mL do reagente GOD-PAP. Os tubos foram incubados em banho termostático a 37°C por 10 minutos e, ao término da reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Obtidas as leituras de absorbância, foi possível determinar a concentração de glicose liberada pela enzima, calculada através da curva analítica de glicose, previamente determinada.

A Equação 3.24 foi usada para o cálculo da atividade de β -glicosidase (WOOD e BHAT, 1988).

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,5}{(0,18016 \times 1,0 \times 30 [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mL}^{-1} \quad (3.24)$$

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,0926}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

Sendo assim, a atividade de β -glicosidase (CBU) consiste na liberação de, exatamente, 1 mg de glicose, ou seja, 0,5/0,1816 μmol de celobiose convertida por 1 mL de enzima diluída em uma reação com duração de 30 minutos.

3.6.2. Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado

Todas as amostras obtidas dos pré-tratamentos (conforme descrito no item 3.5.2) foram submetidas à hidrólise enzimática, a fim de avaliar a influência das condições de pré-tratamento e do tamanho de partícula.

Primeiramente, uma solução tampão de citrato de sódio pH 4,8 a 0,05 mol/L, e 7g/L de azida de sódio foi preparada.

A reação foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, nos quais foram adicionados 7 g de bagaço (massa seca), 70 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 a 0,05 mol/L, de modo que a carga de sólido fosse de 10% (m/v). Os erlenmeyers foram tampados e mantidos a 4° C por 24h antes do início da reação.

Decorrido o tempo, os erlenmeyers foram transferidos à incubadora com agitação orbital (Marconi – MA 830) a 50°C e 100 rpm por 15 minutos para que o sistema ficasse condicionado. Em seguida, os erlenmeyers foram retirados da incubadora e adicionado a eles a carga enzimática, sendo de 15 FPU/g de bagaço para celulase e 25 CBU/g bagaço para β -glicosidase. Após adição das enzimas, os erlenmeyers foram novamente transferidos à incubadora e iniciada a contagem do tempo de reação. Foram coletadas amostras de 2 mL

do líquido reacional de hidrólise nos tempos 0, 2, 6, 12, 24 e 48, a fim de obter o perfil dos açúcares liberados durante a reação.

Após a coleta das amostras, estas foram transferidas para tubos tipo eppendorf e levadas a um banho termostático a 100°C por 15 minutos para inativação das enzimas. Decorrido o tempo, as amostras foram resfriadas e centrifugadas (centrífuga Eppendorf, modelo 5810 R) a 4000 g por 15 minutos. Ao término, o sobrenadante foi filtrado diretamente em *vials*, utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore), para posterior análise em HPLC, conforme descrito no item (3.3.3.4.4). O resíduo sólido de hidrólise foi lavado com água para remoção do conteúdo solúvel e armazenado para posterior análise de composição.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são apresentados e discutidos os resultados das análises que foram realizadas no trabalho. São mostradas as composições químicas dos bagaços antes e após cada condição de pré-tratamento, os efeitos do tamanho de partícula, do tempo e da temperatura nas etapas de pré-tratamento e, posteriormente, hidrólise enzimática.

4.1. Composição do bagaço integral

A Tabela 4.1 apresenta a composição do bagaço integral para as amostras com diferentes tamanhos de partícula, expressa em porcentagem de massa seca.

Nota-se que a amostra mais particulada ($\leq 0,5$ mm) apresenta uma porcentagem levemente inferior de celulose e hemiceluloses em relação às outras amostras. Também foi observado que a composição das amostras no presente trabalho está dentro da faixa dos valores obtidos por diferentes autores na literatura, como mostrado na Tabela 2.2 do item 2.1.

Tabela 4.1: Composição do bagaço integral (% de massa seca) para as diferentes amostras.

Material	Celulose	Grupos acetil	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Extrativos	Balanço
Não moído	40,35 ± 0,21	3,16 ± 0,07	24,95 ± 0,00	25,79 ± 0,26	2,35 ± 0,18	2,98 ± 0,11	99,58
≤ 2,0mm	39,63 ± 0,08	3,29 ± 0,00	24,60 ± 0,09	26,44 ± 0,19	2,54 ± 0,48	3,30 ± 0,01	99,80
≤ 1,0mm	40,02 ± 0,11	2,99 ± 0,03	24,77 ± 0,07	25,66 ± 0,35	2,37 ± 0,12	3,67 ± 0,01	99,48
≤ 0,5mm	38,12 ± 0,11	3,05 ± 0,17	23,87 ± 0,26	26,70 ± 0,15	4,10 ± 0,22	4,12 ± 0,04	99,96

4.2. Distribuição de partículas do bagaço

A Figura 4.1 apresenta a distribuição de partículas das amostras de bagaço, conforme descrito no item 3.3.2.

Observa-se, a partir da Figura 3.1, que a amostra de bagaço não moído possui a maior quantidade (acima a 40%) de partículas superiores a 6,7 mm. As amostras moídas em partículas de 2,0 e 1,0 mm tiveram sua maior parcela retida na peneira com abertura de 0,85 mm (50% e 40%, respectivamente). Já o bagaço moído em 0,5 mm teve a maior porcentagem de massa retida na peneira com abertura de 0,5 mm (aproximadamente 50%). Nota-se que aproximadamente 2,5% de massa do bagaço moído em partículas 0,5 mm ficou retida na peneira de 0,85 mm. Essa porcentagem pode estar relacionada a fibras de maior tamanho, que passaram pela peneira durante a moagem, sem terem atingido a granulometria desejada. Porém, o baixo valor obtido torna essa porcentagem de fibras maiores insignificante.

Portanto, o bagaço não moído apresentou sua maior porcentagem de partículas superiores aos tamanhos encontrados nas amostras moídas.

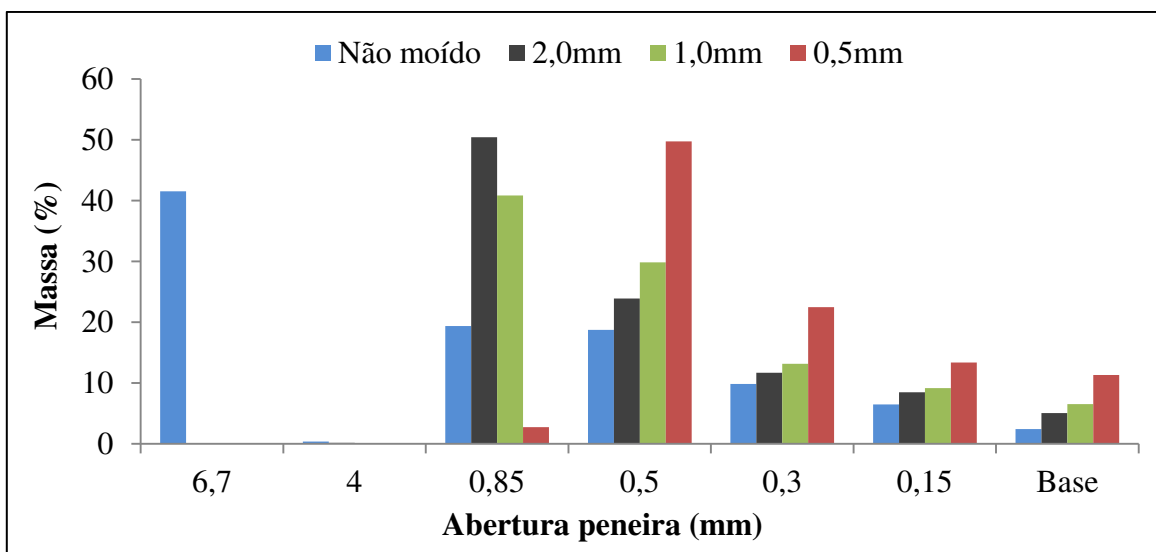


Figura 4.1: Distribuição de partículas das diferentes amostras de bagaço.

4.3. Pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em diferentes condições de temperatura e tempo

4.3.1. Fator de severidade do pré-tratamento

A Tabela 4.2 apresenta os valores do fator de severidade (FS) e fator de severidade combinado (FSC), calculados para cada condição de pré-tratamento avaliada (mostrados no item 3.5.3). Os valores de pH das diferentes amostras de licor, obtidos em uma mesma condição de pré-tratamento, não apresentaram variação. Dessa forma, foi utilizado no cálculo o pH médio entre as amostras com diferentes granulometrias.

A partir da Tabela 4.2, observa-se nas duas temperaturas de pré-tratamento avaliadas, que o FS e o FSC aumentaram conforme é aumentado o tempo de reação. A condição mais severa a 120°C foi obtida com 60 min de reação, sendo valor do FS de 2,37 e FSC de 1,29. Já a 140°C, o valor máximo obtido foi a 30 min de reação, sendo o FS de 2,65 e o FSC de 1,55. Dessa forma, a condição mais severa avaliada no estudo foi a 140°C por 30 min.

Tabela 4.2: Fator de severidade (FS) e fator de severidade combinado (FSC) das diferentes condições de pré-tratamento.

Condição pré-tratamento		pH	FS	FSC
Temperatura (°C)	Tempo (min)	licor		
120	4	1,01	1,19	0,18
120	20	1,06	1,89	0,83
120	40	1,06	2,19	1,13
120	60	1,08	2,37	1,29
140	2,4	1,03	1,56	0,53
140	10	1,03	2,18	1,15
140	20	1,04	2,48	1,44
140	30	1,1	2,65	1,55

4.3.2. Massa solubilizada no pré-tratamento

A Figura 4.2 mostra a solubilização de massa (% massa seca) de cada amostra submetida às diferentes condições de pré-tratamento. O cálculo é mostrado na equação 3.15 do item 3.5.2.

Analizando a Figura 4.2, nota-se que houve uma solubilização de 17 a 39% do bagaço nas diferentes condições de pré-tratamento avaliadas. É possível observar que o aumento da temperatura e do tempo de pré-tratamento resultam em uma maior solubilização da biomassa. Em geral, o aumento da temperatura e a diminuição do pH, são conhecidos por aumentar a eficiência do pré-tratamento (KOOSTRA *et al.*, 2009).

Em todos os ensaios, o material mais particulado ($\leq 0,5$ mm) apresentou uma solubilização levemente maior em relação às outras amostras. Foi realizado o Teste Tukey HSD para avaliar se houve diferença estatística na solubilização entre as diferentes amostras em uma mesma condição de pré-tratamento. O software utilizado foi o STATISTICA 7.0 e os resultados, a 95% de confiança, mostraram que não houve diferença significativa na solubilização entre as amostras com diferentes granulometrias (indicado pelas barras com mesma letra), em uma mesma condição de pré-tratamento.

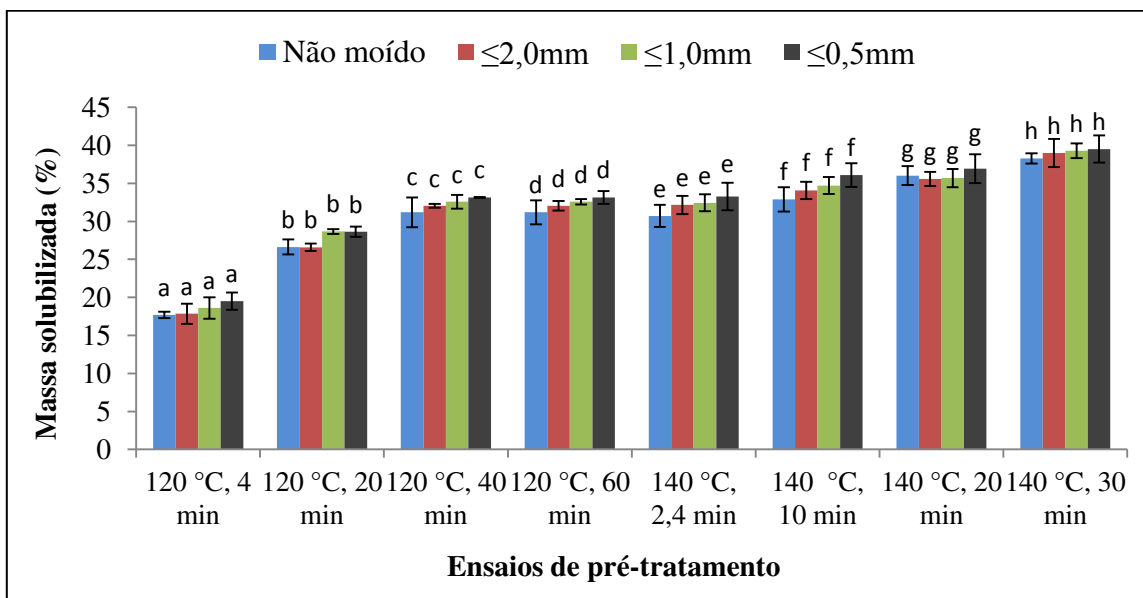


Figura 4.2: Massa solubilizada (% de massa seca) das amostras submetidas aos diferentes ensaios de pré-tratamento. As barras com pela mesma letra indicam que não houve diferença significativa estatisticamente ($p=0,05$).

Nota-se, também, que a porcentagem de massa solubilizada nos ensaios 120°C, 60 min e 140°C, 2,4 min foram semelhantes. Foi realizado o Teste Tukey e este indicou que também não houve diferença significativa, a 95% de confiança ($p=0,05$), na solubilização entre os materiais submetidos a essas duas condições de pré-tratamento. Dessa forma, notou-se que o aumento da temperatura (140°C) implicou em uma solubilização mais rápida da biomassa comparada ao maior tempo de reação na temperatura de 120°C.

CHUNG *et al.* (2012) aponta que a perda de massa em pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído está relacionada principalmente à solubilização das hemiceluloses da biomassa.

4.3.3. Composição química do bagaço pré-tratado

As Tabelas 4.3 e 4.4 apresentam a composição química das amostras pré-tratadas a 120 e a 140°C, respectivamente. Os componentes foram expressos em porcentagem de massa seca (% MS).

Tabela 4.3: Composição química das amostras de bagaço pré-tratadas a 120°C.

Condição P.T.		Composição bagaço pré-tratado (% MS)						
Temperatura (°C)	Tempo (min)	Material	Celulose	Grupos acetil	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Balanço
120	4	Integral	44,59±0,12	2,30±0,02	20,55±0,23	29,55±0,37	1,63±0,04	98,62
		≤2,0mm	44,12±0,34	2,50±0,06	20,46±0,12	29,93±0,24	1,13±0,11	98,14
		≤1,0mm	44,91±0,20	2,38±0,07	20,47±0,02	29,49±0,45	1,25±0,31	98,50
		≤0,5mm	43,35±0,41	2,49±0,10	20,08±0,07	30,19±1,14	3,56±0,14	99,67
120	20	Integral	49,16±0,32	1,69±0,05	15,26±0,13	31,12±1,02	2,51±0,08	99,74
		≤2,0mm	48,66±0,20	1,76±0,04	14,30±0,03	30,33±0,21	3,46±0,06	98,51
		≤1,0mm	49,01±0,08	1,59±0,03	14,22±0,07	30,87±0,34	3,57±0,05	99,26
		≤0,5mm	47,22±0,42	1,57±0,02	14,05±0,21	30,80±0,56	6,04±0,05	99,68
120	40	Integral	52,05±0,12	1,00±0,01	11,30±0,11	31,66±0,39	3,20±0,04	99,21
		≤2,0mm	50,72±0,22	1,14±0,00	11,35±0,06	32,23±0,42	3,75±0,09	99,19
		≤1,0mm	50,86±0,10	1,07±0,00	11,12±0,02	31,71±0,28	3,94±0,08	98,70
		≤0,5mm	51,90±0,18	1,04±0,02	11,40±0,08	32,00±0,25	4,43±0,09	100,77
120	60	Integral	53,91±0,04	0,88±0,00	10,55±0,04	31,71±0,47	2,80±0,14	99,85
		≤2,0mm	53,57±0,01	0,81±0,00	10,11±0,02	31,86±0,26	3,03±0,08	99,38
		≤1,0mm	53,74±0,23	0,80±0,01	10,31±0,08	31,30±0,08	4,45±0,31	100,60
		≤,5mm	52,40±0,56	0,92±0,08	10,32±0,07	32,20±0,09	3,37±0,23	99,21

Tabela 4.4: Composição química das amostras de bagaço pré-tratadas a 140°C.

Condição P.T.		Composição bagaço pré-tratado (% MS)						
Temperatura (°C)	Tempo (min)	Material	Celulose	Grupos acetil	Hemiceluloses	Lignina	Cinzas	Balanco
140	2,4	Integral	52,29±0,31	0,84±0,05	10,49±0,14	34,41±0,54	2,05±0,03	100,08
		≤2,0mm	53,23±0,29	1,13±0,00	10,38±0,02	33,51±0,47	1,86±0,02	99,82
		≤1,0mm	54,42±0,61	0,88±0,03	10,28±0,20	33,54±0,68	1,76±0,06	100,88
		≤0,5mm	52,46±0,53	1,03±0,03	10,17±0,06	34,05±0,28	3,00±0,20	101,04
140	10	Integral	50,22±0,35	1,06±0,02	9,70±0,27	33,10±0,23	4,19±0,06	98,30
		≤2,0mm	52,45±0,31	0,92±0,03	9,33±0,03	32,93±0,50	2,91±0,10	98,57
		≤1,0mm	50,79±0,30	0,84±0,02	9,06±0,07	32,51±0,10	5,88±0,11	99,10
		≤0,5mm	52,01±0,07	1,03±0,03	9,97±0,01	30,95±0,35	5,72±0,04	99,70
140	20	Integral	54,48±0,04	0,65±0,02	7,80±0,05	32,36±0,28	3,69±0,05	99,00
		≤2,0mm	55,94±0,02	0,64±0,02	7,24±0,11	31,67±0,21	3,35±0,07	100,41
		≤1,0mm	56,49±0,43	0,64±0,02	7,53±0,01	33,47±0,51	1,47±0,10	99,62
		≤0,5mm	54,02±0,65	0,83±0,03	8,60±0,02	33,77±0,12	3,64±0,06	99,33
140	30	Integral	54,84±0,22	0,52±0,00	5,63±0,05	33,71±0,42	5,36±0,08	100,09
		≤2,0mm	56,04±0,27	0,43±0,01	5,69±0,11	33,65±0,35	3,64±0,01	99,49
		≤1,0mm	55,20±0,16	0,47±0,00	5,47±0,02	33,50±1,01	4,19±0,05	98,85
		≤0,5mm	55,60±0,57	0,43±0,05	5,65±0,01	34,38±0,42	4,83±0,13	100,91

Analizando as Tabelas 4.3 e 4.4, nota-se que a porcentagem de hemiceluloses no bagaço pré-tratado variou de 20% (120°C, 4 min), até aproximadamente 5% na condição mais severa (140°C, 30 min). Sendo assim, observou-se uma diminuição da porcentagem de hemiceluloses no material pré-tratado com o aumento da temperatura e tempo de reação. Por outro lado, foi observado um aumento na porcentagem de celulose com o aumento da severidade do pré-tratamento, tendo o material pré-tratado apresentado aproximadamente 43-44% na condição mais branda (120° C, 4 min) e chegando até 55-56% na condição mais severa (140° C, 30 min).

A remoção das hemiceluloses e o consequente aumento do teor de celulose no material pré-tratado é desejável para etapa de hidrólise enzimática, uma vez que a celulose se torna mais disponível para conversão à glicose e a baixa quantidade de hemiceluloses torna a ação enzimática mais eficiente.

4.3.4. Solubilização das hemiceluloses e celulose no pré-tratamento

A Figura 4.3 mostra a solubilização de hemiceluloses e celulose (% MS) para as amostras submetidas às diferentes condições de pré-tratamento.

Analizando a Figura 4.3, nota-se que a solubilização das hemiceluloses variou entre 30 e 87% nas diferentes condições de pré-tratamento. Como esperado, a menor solubilização ocorreu na condição mais branda (120 °C, 4 min), a qual variou de 30-33% entre as diferentes amostras, e a maior solubilização (aproximadamente 87%) foi obtida na condição mais severa (140° C, 30 min). Em relação à celulose, foi observada uma solubilização que variou de 7 a 17%, sendo esses valores obtidos a 120° C, 4 min e a 140° C, 30 min, respectivamente.

O ensaio a 120°C, 60 min obteve uma solubilização de hemiceluloses semelhante ao ensaio a 140 °C, 4 min (72 a 74%), mesmo o ensaio a 140°C tendo valor de FS e FSC menores comparado ao ensaio a 120°C, como mostrado na Tabela 4.2 do item 4.3.1. Dessa forma, pode-se dizer que na temperatura de 140°C, foi possível solubilizar a mesma quantidade de hemiceluloses num tempo de reação menor quando comparado ao ensaio a 120°C. A conversão das hemiceluloses durante o pré-tratamento é típica de pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído (LU e MOSIER, 2007; KOOSTRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

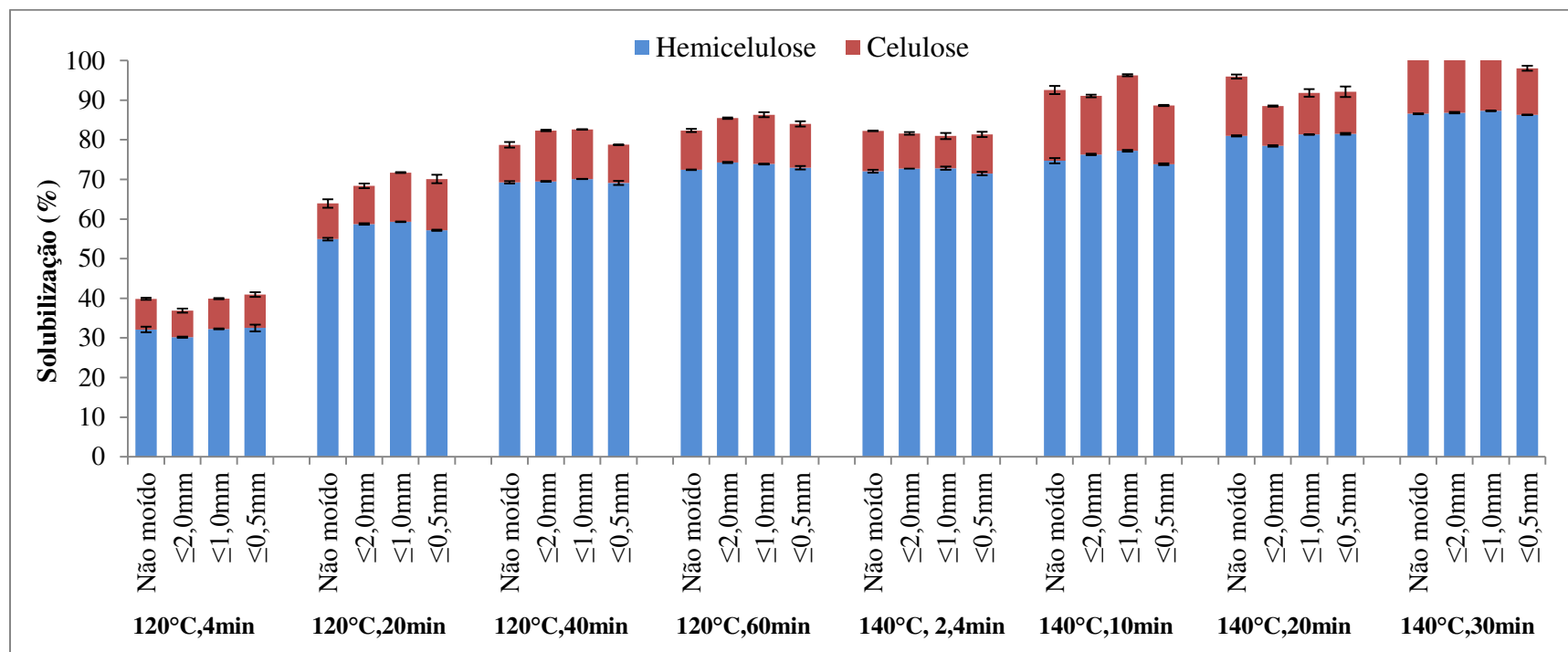


Figura 4.3: Solubilização de hemiceluloses e celulose nos diferentes ensaios de pré-tratamento

Foi observado que as amostras com diferentes tamanhos de partículas não influenciaram na solubilização, visto que as porcentagens solubilizadas entre os diferentes materiais, na mesma condição, foram semelhantes em todos os ensaios.

Conforme obtido, uma alta solubilização de hemiceluloses era esperada, uma vez que no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído a altas temperaturas, as hemiceluloses, compostas principalmente de glucuronoarabinosilana acetilado, podem ser facilmente hidrolisadas. Por outro lado, a celulose é menos solubilizada por ser mais recalcitrante ao pré-tratamento com ácido diluído (CANILHA *et al.*, 2011).

KIM e LEE (2002) propuseram um modelo para avaliar a difusão intrapartícula do ácido sulfúrico em diferentes biomassas e o efeito no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. VIDAL-Jr *et al.* (2011) usou esse modelo para calcular o tamanho de partícula crítico teórico (no qual tamanhos de partícula acima desse tornam a difusão relevante no processo de pré-tratamento) para diferentes biomassas (palha de trigo, palha de milho, bagaço de cana) pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído (0,5% m/m) a 180°C. Os valores obtidos foram na faixa de 1,0 a 3,0 mm (abertura da peneira), sugerindo que tamanhos de partículas menores a esse não aumentam a eficiência do pré-tratamento.

HSU *et al.* (1996) observou um aumento na digestibilidade do *switchgrass* de 60 para 80% quando diminuiu o tamanho das partículas de 10 até 3,0 mm. Porém, não foi observada nenhuma diferença quando os materiais pré-tratados de diferentes tamanhos de partícula foram homogeneizados e submetidos à hidrólise enzimática, mostrando que o tamanho de partícula não tem influência na eficácia do pré-tratamento.

Observando os resultados do presente trabalho, nota-se que até a amostra de bagaço não moído teve um desempenho similar no pré-tratamento quando comparado às amostras que foram moídas. Dessa forma, não há necessidade em reduzir o tamanho das partículas para melhorar a eficiência de extração de hemiceluloses do material.

4.4. Análise do licor de pré-tratamento

4.4.1. Carboidratos (monômeros e oligômeros) no licor de pré-tratamento

As tabelas 4.5 e 4.6 apresentam as concentrações dos principais carboidratos, na forma monomérica e oligomérica obtidos no licor de pré-tratamento. As concentrações são expressas em g/100g de bagaço bruto.

Tabela 4.5: Concentração dos carboidratos presente no licor de pré-tratamento a 120°C.

Condição P.T.		Carboidratos no licor de pré-tratamento (g/100g de bagaço bruto)						
Temp. (°C)	Tempo (min)	Material	Glicose	GO	Xilose	XO	Arabinose	AO
120	4	Integral	0,28±0,02	1,47±0,01	2,31±0,03	4,84±0,05	1,59±0,01	0,06±0,01
		≤2,0mm	0,27±0,02	1,48±0,02	2,37±0,01	4,60±0,10	1,59±0,01	0,07±0,01
		≤1,0mm	0,28±0,01	1,42±0,05	2,38±0,01	4,73±0,01	1,55±0,02	0,12±0,01
		≤0,5mm	0,28±0,01	1,49±0,01	2,19±0,10	4,98±0,05	1,59±0,01	0,14±0,01
120	20	Integral	0,62±0,01	1,39±0,01	8,80±0,05	3,92±0,01	1,81±0,02	0,00
		≤2,0mm	0,56±0,05	1,57±0,05	8,78±0,08	3,78±0,04	1,83±0,01	0,00
		≤1,0mm	0,64±0,01	1,59±0,01	9,01±0,07	3,75±0,02	1,86±0,01	0,00
		≤0,5mm	0,63±0,01	1,61±0,01	8,98±0,05	3,95±0,01	1,78±0,04	0,04±0,01
120	40	Integral	1,03±0,02	1,13±0,07	14,88±0,10	0,53±0,06	1,94±0,01	0,00
		≤2,0mm	1,05±0,02	1,40±0,06	13,55±0,06	1,56±0,02	1,98±0,01	0,00
		≤1,0mm	1,00±0,03	1,29±0,01	13,58±0,04	1,57±0,03	1,93±0,01	0,00
		≤0,5mm	1,01±0,01	1,27±0,01	13,79±0,04	1,19±0,04	1,82±0,05	0,05±0,02
120	60	Integral	1,38±0,04	0,80±0,05	17,42±0,40	0,00	1,98±0,01	0,07±0,02
		≤2,0mm	1,47±0,05	0,89±0,01	16,82±0,32	0,00	2,00±0,02	0,02±0,01
		≤1,0mm	1,41±0,04	0,80±0,01	17,39±0,28	0,00	1,89±0,02	0,06±0,01
		≤,5mm	1,37±0,06	1,02±0,01	16,36±0,15	0,10±0,07	1,97±0,01	0,06±0,01

GO: glicose oligômeros; XO: xilose oligômeros; AO: arabinose oligômeros.

Tabela 4.6: Concentração dos carboidratos presente no licor de pré-tratamento a 140° C.

Condição P.T.		Carboidratos no licor de pré-tratamento (g/100g de bagaço bruto)						
Temp. (°C)	Tempo (min)	Material	Glicose	GO	Xilose	XO	Arabinose	AO
140	2,4	Integral	1,06±0,20	1,21±0,01	12,80±0,20	2,72±0,05	1,86±0,05	0,00
		≤2,0mm	1,24±0,08	1,15±0,01	13,65±0,21	1,74±0,03	1,92±0,06	0,00
		≤1,0mm	1,28±0,07	1,20±0,01	13,17±0,12	1,98±0,03	2,01±0,07	0,00
		≤0,5mm	1,18±0,13	1,17±0,01	12,82±0,30	2,14±0,01	1,82±0,07	0,03±0,01
140	10	Integral	1,60±0,07	0,94±0,01	16,05±0,32	0,74±0,02	1,95±0,05	0,03±0,01
		≤2,0mm	1,77±0,11	0,66±0,01	16,75±0,28	0,00	2,08±0,09	0,00
		≤1,0mm	1,82±0,14	0,76±0,01	16,19±0,09	0,33±0,01	2,01±0,03	0,00
		≤0,5mm	1,56±0,09	0,86±0,02	15,02±0,41	0,86±0,03	1,84±0,11	0,02±0,01
140	20	Integral	2,32±0,21	0,50±0,02	17,90±0,54	0,00	2,07±0,06	0,00
		≤2,0mm	2,37±0,28	0,20±0,01	18,86±0,11	0,00	1,99±0,05	0,00
		≤1,0mm	2,04±0,41	0,50±0,01	17,65±0,65	0,39±0,04	1,98±0,02	0,00
		≤0,5mm	2,51±0,17	0,23±0,01	19,05±0,09	0,00	1,96±0,02	0,00
140	30	Integral	2,67±0,09	0,37±0,01	18,54±0,08	0,00	2,13±0,08	0,00
		≤2,0mm	2,65±0,07	0,34±0,01	18,29±0,14	0,00	2,09±0,07	0,00
		≤1,0mm	2,55±0,12	0,22±0,01	18,65±0,08	0,00	2,02±0,09	0,00
		≤0,5mm	2,59±0,09	0,24±0,01	18,92±0,09	0,00	1,89±0,14	0,00

GO: glicose oligômeros; XO: xilose oligômeros; AO: arabinose oligômeros.

Analizando as Tabelas 4.5 e 4.6, pode-se observar que, para ambas as temperaturas, ocorreu um aumento na concentração dos carboidratos no licor conforme aumento do tempo de pré-tratamento. As maiores concentrações foram observadas nas amostras de licores obtidas da condição mais severa (140° C, 30 min), sendo de aproximadamente 2 g de glicose/100g de bagaço, 18 g de xilose/100g de bagaço e 2 g de arabinose/100g de bagaço.

4.4.2. Carboidratos, ácido acético e produtos de degradação no licor de pré-tratamento

As Tabelas 4.7 e 4.8 apresentam os rendimentos para cada ensaio de pré-tratamento (% MS), a concentração total dos carboidratos (monômero + oligômero) (g/L), do ácido acético e dos produtos de degradação, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (g/L), quantificados nos licores.

A partir das Tabelas 4.7 e 4.8, pode-se observar que as concentrações dos carboidratos nos licores aumentam gradualmente com o aumento da temperatura e do tempo de pré-tratamento. As maiores concentrações foram obtidas na condição mais severa (140°C, 30 min), sendo de 5-6 g/L de glicose, 36-37 g/L de xilose e 3-4 g/L de arabinose. Da mesma forma, foi observado um aumento na concentração dos produtos de degradação dos carboidratos, à medida que aumenta a temperatura e o tempo da reação. As maiores concentrações de inibidores foram observadas nas amostras de licores obtidas também na condição mais severa (140°C, 30 min), sendo 6 g/L de ácido acético, 0,1 g/L de HMF e 0,9 g/L de furfural.

Tabela 4.7: Concentração de carboidratos, ácido acético e inibidores no licor de pré-tratamento no ensaio a 120°C.

Condição P.T.		Material	Rendimento	Composição Açúcares			Produtos de degradação		
Temp. (°C)	Tempo (min)		P.T. (%)	(g/L)			(g/L)		
			100	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
120	4	Integral	83,29	3,50±0,03	14,30±0,10	3,30±0,07	2,16±0,02	0,00	0,00
		≤2,0mm	79,70	3,50±0,04	13,94±0,13	3,31±0,08	2,22±0,04	0,00	0,00
		≤1,0mm	81,39	3,34±0,05	14,22±0,15	3,34±0,07	2,23±0,03	0,00	0,00
		≤0,5mm	82,15	3,54±0,11	14,33±0,52	3,46±0,10	2,16±0,03	0,00	0,00
120	20	Integral	73,36	4,02±0,09	25,43±0,14	3,53±0,05	4,27±0,06	0,02±0,00	0,03±0,00
		≤2,0mm	71,38	4,25±0,10	25,12±0,21	3,63±0,01	4,35±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00
		≤1,0mm	71,34	4,45±0,00	25,52±0,15	3,64±0,03	4,36±0,02	0,02±0,00	0,03±0,00
		≤0,5mm	73,41	4,48±0,02	25,85±0,12	3,65±0,01	4,33±0,04	0,02±0,00	0,02±0,00
120	40	Integral	68,81	4,32±0,02	30,81±0,64	3,75±0,00	5,59±0,22	0,04±0,00	0,10±0,01
		≤2,0mm	66,86	4,89±0,01	30,22±0,16	3,95±0,01	5,14±0,21	0,03±0,00	0,08±0,01
		≤1,0mm	67,42	4,56±0,04	30,29±0,32	3,83±0,04	5,26±0,15	0,03±0,00	0,09±0,01
		≤0,5mm	67,95	4,56±0,01	29,97±0,43	3,74±0,00	5,53±0,18	0,04±0,00	0,09±0,01
120	60	Integral	66,68	4,35±0,10	34,83±0,02	4,10±0,17	6,06±0,11	0,05±0,00	0,18±0,01
		≤2,0mm	64,17	4,73±0,01	33,63±0,32	4,03±0,04	5,97±0,08	0,06±0,01	0,18±0,01
		≤1,0mm	65,47	4,41±0,09	34,78±0,31	3,89±0,03	6,09±0,05	0,06±0,00	0,17±0,01
		≤0,5mm	65,31	4,77±0,05	33,72±0,34	4,06±0,11	5,85±0,12	0,04±0,00	0,17±0,02

Tabela 4.8: Concentração de carboidratos, ácido acético e inibidores no licor de pré-tratamento no ensaio a 140°C.

Condição P.T.		Material	Rendimento (%)	Composição Açúcares (g/L)			Análise de inibidores (g/L)		
Temp. (°C)	Tempo (min)		100	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
140	2,4	Integral	69,29	4,54±0,10	30,02±0,95	3,71±0,05	4,84±0,14	0,04±0,00	0,17±0,01
		≤2,0mm	66,75	4,78±0,13	30,76±0,34	3,83±0,06	5,15±0,19	0,05±0,00	0,17±0,02
		≤1,0mm	67,56	4,96±0,11	30,29±0,34	4,01±0,07	4,98±0,06	0,05±0,01	0,15±0,01
		≤0,5mm	67,85	4,69±0,09	29,92±0,00	3,69±0,00	4,87±0,09	0,05±0,01	0,14±0,02
140	10	Integral	67,11	5,08±0,05	33,58±0,05	3,94±0,01	5,83±0,13	0,07±0,01	0,34±0,01
		≤2,0mm	63,91	4,86±0,02	33,50±0,23	4,16±0,02	6,06±0,20	0,08±0,01	0,35±0,02
		≤1,0mm	65,30	5,51±0,19	33,04±0,28	4,01±0,03	5,81±0,14	0,08±0,00	0,32±0,02
		≤0,5mm	65,93	4,84±0,22	33,45±0,31	3,70±0,42	5,65±0,16	0,07±0,01	0,33±0,02
140	20	Integral	63,98	5,65±0,21	35,80±0,60	4,14±0,06	6,41±0,17	0,10±0,00	0,62±0,02
		≤2,0mm	63,06	5,14±0,05	36,71±0,16	3,98±0,05	6,70±0,11	0,11±0,00	0,75±0,03
		≤1,0mm	64,31	5,07±0,03	36,08±0,02	3,95±0,02	6,36±0,18	0,10±0,00	0,60±0,02
		≤0,5mm	64,41	5,48±0,05	36,36±0,48	3,95±0,08	6,85±0,11	0,11±0,01	0,69±0,02
140	30	Integral	61,72	6,07±0,03	37,08±0,16	4,25±0,08	6,51±0,15	0,13±0,01	0,85±0,04
		≤2,0mm	60,50	5,98±0,05	36,57±0,21	4,17±0,07	6,43±0,15	0,13±0,02	0,90±0,02
		≤1,0mm	60,71	5,55±0,02	37,29±0,17	4,04±0,09	6,69±0,11	0,13±0,01	0,92±0,02
		≤0,5mm	61,01	5,65±0,02	37,83±0,23	3,77±0,14	6,73±0,09	0,13±0,01	0,91±0,03

4.4.3. Rendimento de pentoses no licor de pré-tratamento

A Figura 4.4 apresenta o rendimento das pentoses (xilose e arabinose) (monoméricas e oligoméricas) no licor de pré-tratamento. O cálculo é mostrado no apêndice I.

Observa-se que o rendimento das pentoses no licor variou de aproximadamente 30%, obtido na condição mais branda de pré-tratamento (120° C, 4 min), até 77% (140° C, 30 min). O aumento do rendimento fica evidente conforme ocorre o aumento do tempo e da temperatura de pré-tratamento. Foi observado a presença de oligômeros em alguns ensaios, os quais não foram hidrolisados em açúcares monoméricos devido às condições do pré-tratamento. Nota-se que os açúcares na forma oligomérica diminuem com aumento da severidade do pré-tratamento.

KOOSTRA *et al.* (2009) apontam que nem todas as hemiceluloses podem ser hidrolisadas em monômeros. Parte dela ainda pode permanecer no material, ou até mesmo ser hidrolisada em oligômeros, de acordo com a condição de pré-tratamento empregada. Em seu trabalho, obteve um rendimento de xilose no pré-tratamento de palha de trigo de aproximadamente 50% a 130° C e de 80% a 150° C, com tempo de reação de 30 minutos, 20% (m/v) de carga de sólidos e 5,17% (m/m) de ácido sulfúrico. BENJAMIN *et al.* (2013), trabalhando com diversas variedades de bagaço de cana, obtiveram 73,7% de rendimento de xilose no licor de pré-tratamento a 160° C, 0,96% (m/m) de ácido sulfúrico, em 15 min de reação. LAVARACK *et al.* (2002) não observaram diferenças significativas no rendimento de xilose em materiais com tamanho de partículas diferentes (bagaço e bagacilo) submetidos ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em diferentes condições de tempo, concentração de ácido e temperatura. MONAVARI *et al.* (2009), trabalhando com abeto (*Picea abies*) de diferentes tamanhos de partículas, não observaram diferenças significativas nos rendimentos dos carboidratos solubilizados no licor de pré-tratamento, entre as diferentes amostras submetidas ao pré-tratamento a vapor.

JONGLERTJUNYA *et al.* (2014) avaliaram a influência do tamanho de partícula do bagaço moído (>1,180mm e >0,06mm) e não moído no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (121° C, 1h, 0,5% ácido (v/v), 1:15 sólido-líquido) e não observou diferença significativa na liberação de açúcares entre as amostras moídas, porém a amostra não moída obteve um menor rendimento de açúcares.

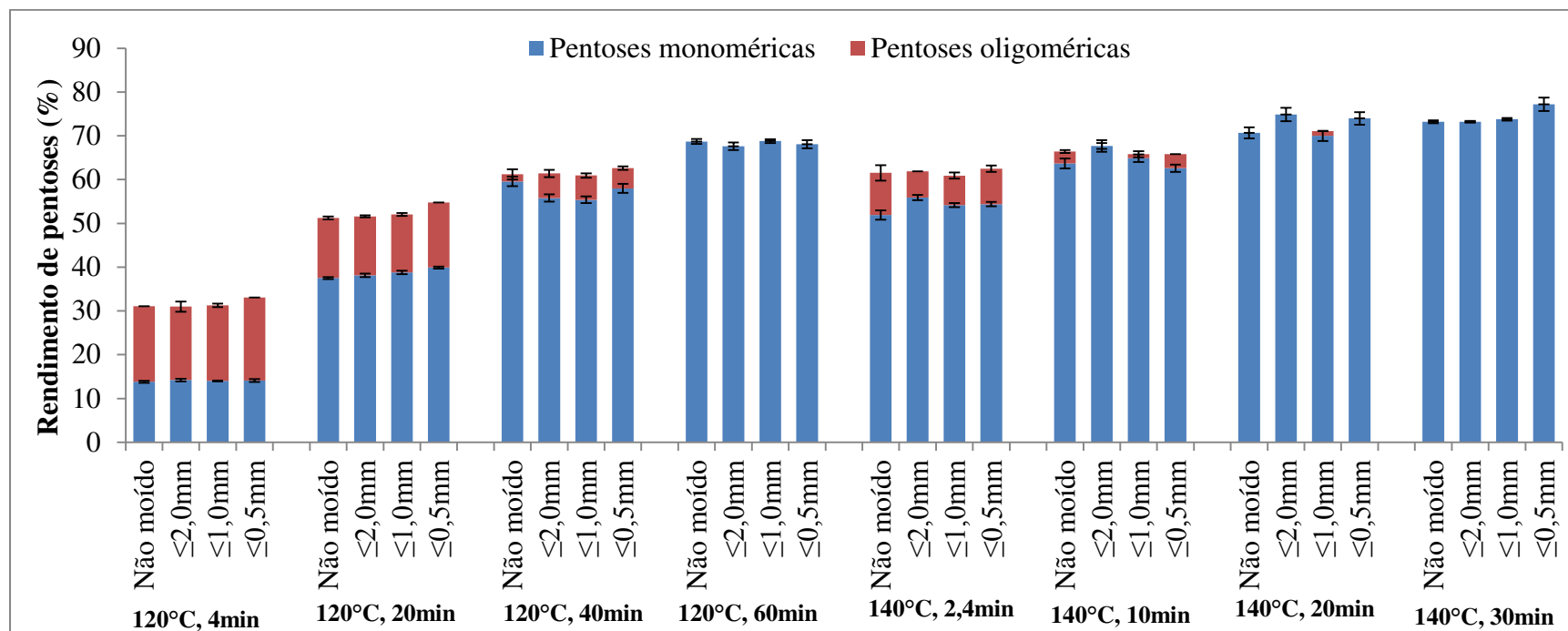


Figura 4.4: Rendimento das pentoses no licor de pré-tratamento.

Avaliando os resultados no presente trabalho, foi observado que o tamanho de partícula não influenciou nos rendimentos de xilose, sendo os valores semelhantes obtidos nos diferentes ensaios.

4.4.4. Rendimento de glicose no licor de pré-tratamento

A Figura 4.5 apresenta o rendimento de glicose (monômero e oligômero) no licor de pré-tratamento, baseada na conversão de celulose presente no bagaço submetido ao pré-tratamento. O cálculo é mostrado no apêndice I.

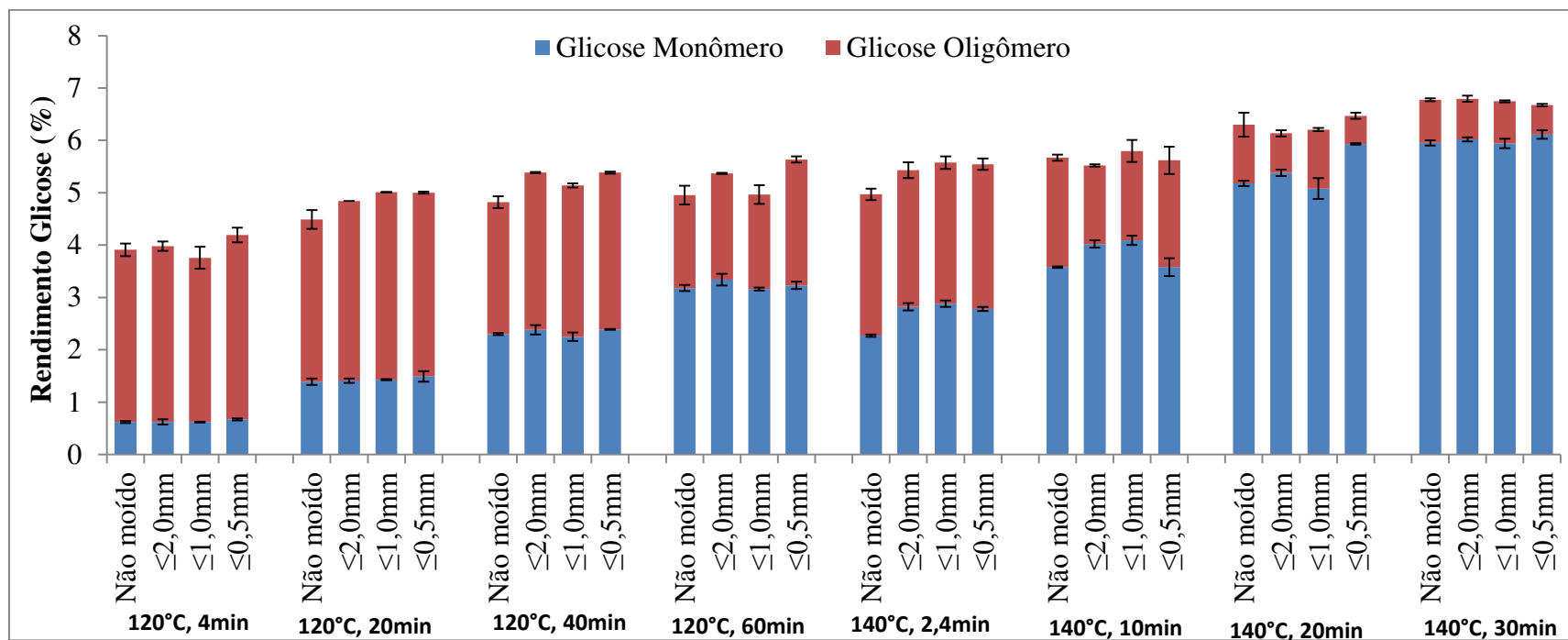


Figura 4.5: Rendimento de glicose no licor de pré-tratamento.

Analisando a Figura 4.5, observa-se que o maior rendimento de glicose (monômero e oligômero) foi obtido no ensaio a 140°C, 30 min, sendo de aproximadamente 7%. Nota-se também uma diminuição dos oligômeros de glicose, à medida que há um aumento na severidade do pré-tratamento, os quais, possivelmente, são convertidos em glicose monomérica. Como observado na Figura 4.3 do item 4.3.3, parte da celulose foi solubilizada no pré-tratamento, o que não é desejável para a hidrólise enzimática do material pré-tratado. Porém, foi observado que parte da celulose solubilizada foi recuperada na forma de glicose no licor, podendo essa ser ainda utilizada e ser diretamente fermentada a etanol juntamente com as pentoses.

Ainda é possível observar que não houve influência do tamanho de partícula, uma vez que rendimentos, para uma mesma condição de pré-tratamento, são semelhantes para as diferentes amostras.

4.4.5. Ácido acético e produtos de degradação dos açúcares no licor de pré-tratamento

A Figura 4.6 apresenta os inibidores 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético formados/liberados no licor de pré-tratamento para cada ensaio. As concentrações são expressas em g/L.

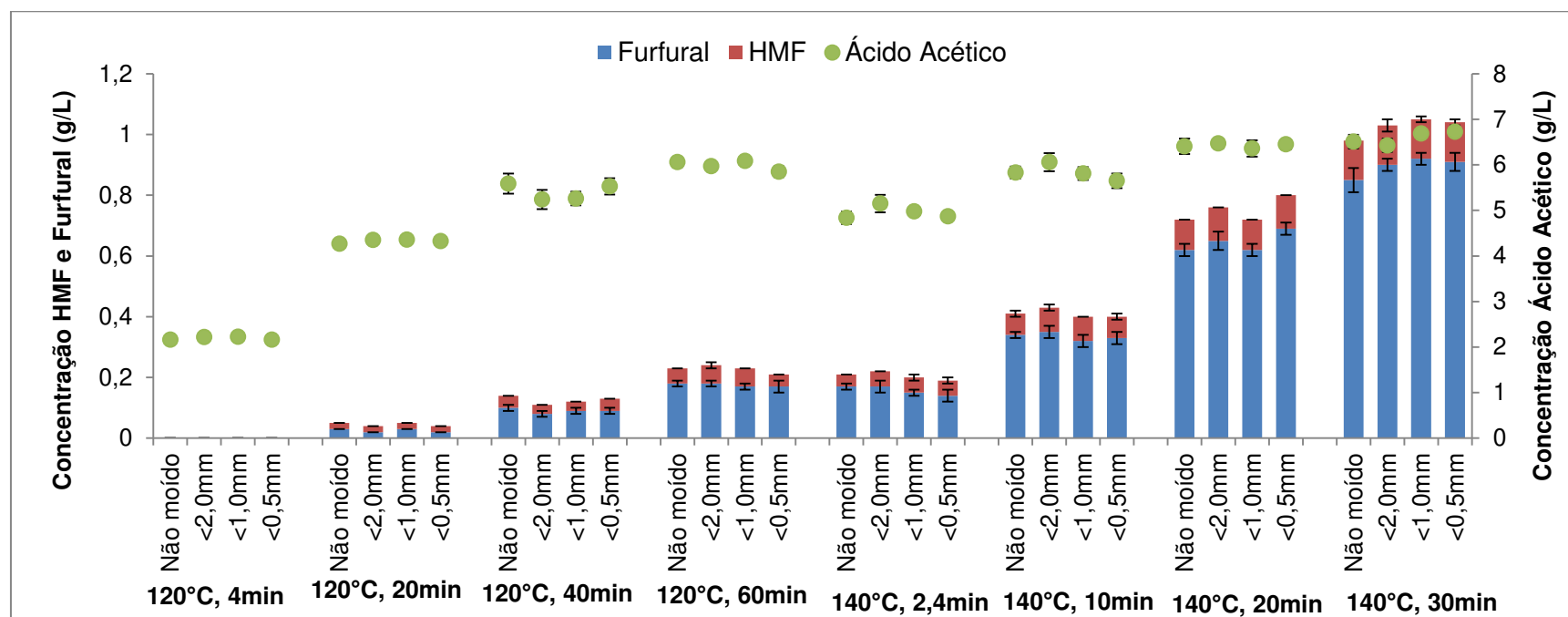


Figura 4.6: Concentração de 5-hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético no licor de pré-tratamento.

A partir da Figura 4.6, pode-se observar um aumento na formação de inibidores juntamente com o aumento da severidade do pré-tratamento. Nos ensaios a 120°C, 60 min, as concentrações chegaram a 0,06 g/L de HMF e 0,18 g/L de furfural. Já nos ensaios realizados a 140°C, pode-se observar um aumento mais acentuado na formação de HMF e furfural, sendo que no ensaio com 2,4 min de reação, já foram produzidos 0,05 g/L de HMF e 0,17 g/L de furfural, chegando no máximo de 0,13 g/L de HMF e 0,9 g/L de furfural no ensaio a 30 minutos. Em relação à liberação de ácido acético, foi observada uma concentração de 6,1 g/L na condição mais severa a 120°C (60 minutos) e de 6,7 g/L a 140°C, 30 minutos.

A degradação de pentoses e hexoses em um meio ácido a elevada temperatura pode levar à formação, principalmente, de furfural e 5-hidroximetilfurfural. A formação desses produtos de degradação dos açúcares é responsável pela inibição de enzimas e microrganismos de fermentação (KOOSTRA *et al.*, 2009; MONAVARI *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados, foi possível observar que a temperatura teve grande influência na degradação da xilose levando à formação de furfural. Este mesmo caso também foi observado por outros autores (AGUILHAR *et al.*, 2002; NEUREITER *et al.*, 2002).

Não foi observada influência do tamanho de partícula na formação de inibidores, uma vez que as concentrações destes, em uma mesma condição de pré-tratamento, foram semelhantes para as diferentes granulometrias avaliadas. LIU *et al.* (2009), avaliando diferentes granulometrias de palha de milho no pré-tratamento, não observaram diferença na concentração de ácido acético no licor de pré-tratamento entre as amostras com diferentes granulometrias. Por outro lado, observou um decréscimo na concentração de furfural e HMF, com o decréscimo do tamanho de partícula avaliado.

4.4.6. Recuperação de pentoses provenientes das hemiceluloses baseado na porcentagem de hemiceluloses solubilizadas no pré-tratamento

A Figura 4.7 mostra a porcentagem de pentoses (xilose e arabinose), provenientes das hemiceluloses, recuperadas no licor na forma monomérica e oligomérica, em relação à quantidade de hemiceluloses solubilizadas durante a etapa de pré-tratamento (Figura 4.3). O cálculo é mostrado no apêndice I.

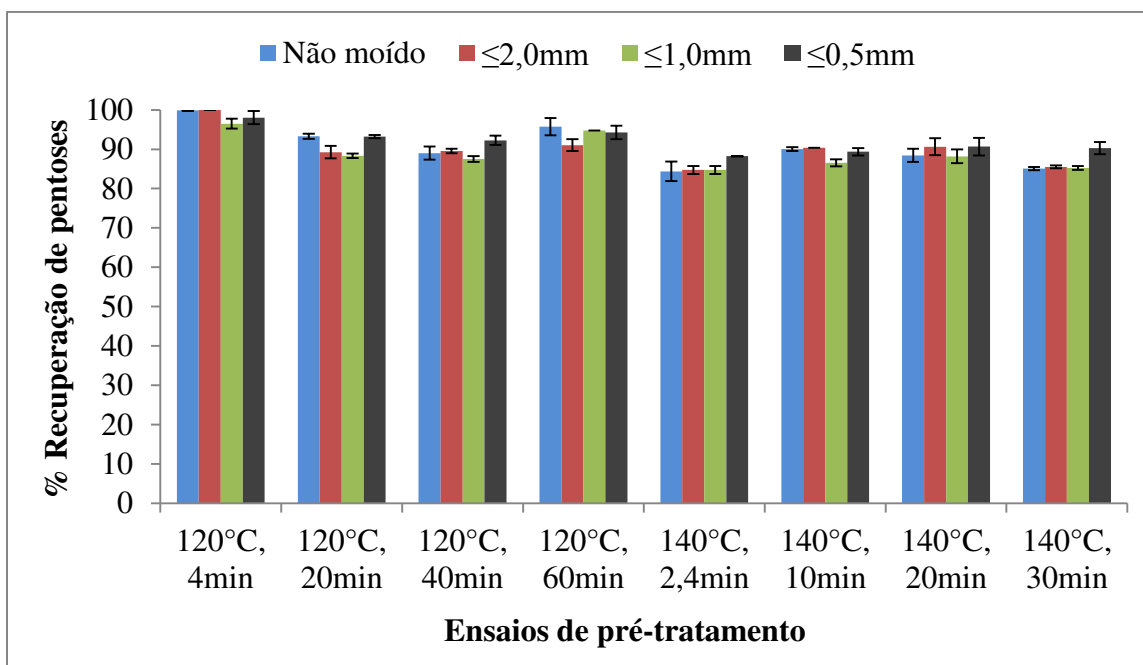


Figura 4.7: Recuperação de pentoses no licor provenientes das hemiceluloses solubilizadas no pré-tratamento.

De acordo com a Figura 4.7, todas as amostras dos licores produzidos nos diferentes ensaios de pré-tratamento obtiveram mais de 85% das pentoses (xilose e arabinose) recuperadas no licor, baseada na porcentagem de hemiceluloses que foram solubilizadas no pré-tratamento.

Analisando a Figura 4.3 do Item 4.3.4, a maior solubilização de hemiceluloses ocorreu no ensaio a 140°C, 30 min, onde aproximadamente 87% das hemiceluloses do bagaço submetido ao pré-tratamento foram solubilizadas. Sendo assim, a Figura 4.7 nos mostra que, para este mesmo ensaio, aproximadamente 85% das hemiceluloses solubilizadas foram recuperadas na forma de pentoses (xilose e arabinose) no licor, e somente 15% convertidas em outros componentes, principalmente furfural (mostrado nas Tabelas 4.7 e 4.8).

Nota-se também que não houve influência do tamanho de partícula, uma vez que os valores das porcentagens em uma mesma condição de pré-tratamento são semelhantes para as diferentes amostras de licor.

4.5. Hidrólise enzimática

4.5.1. Perfis dos carboidratos liberados durante a hidrólise enzimática

As Figuras de 4.8 a 4.16 mostram os perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise, ao longo do tempo, para as amostras pré-tratadas nas diferentes condições e para os materiais não pré-tratados. As concentrações foram expressas como g/g de bagaço integral (sem pré-tratamento).

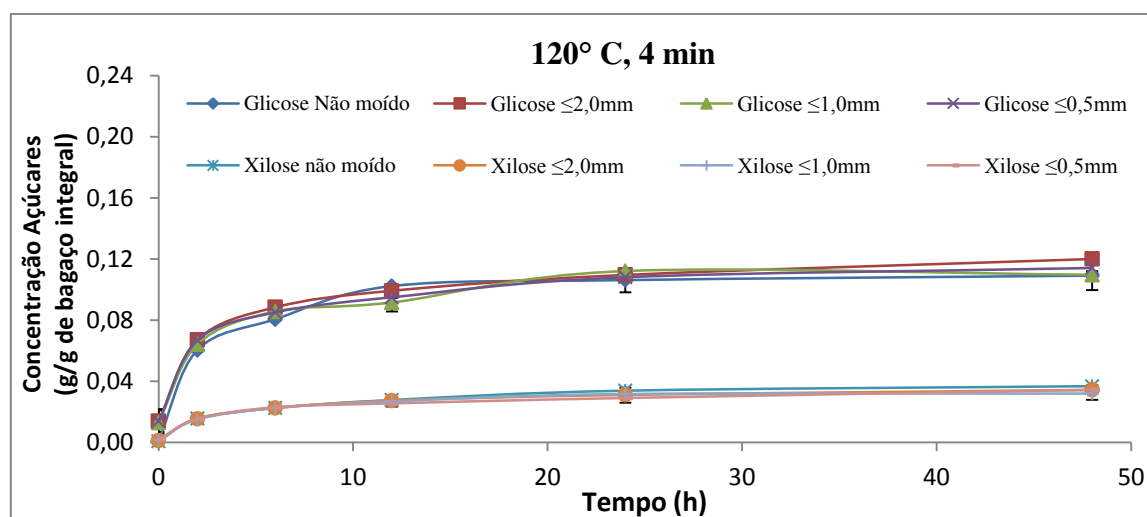


Figura 4.8: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 4 min.

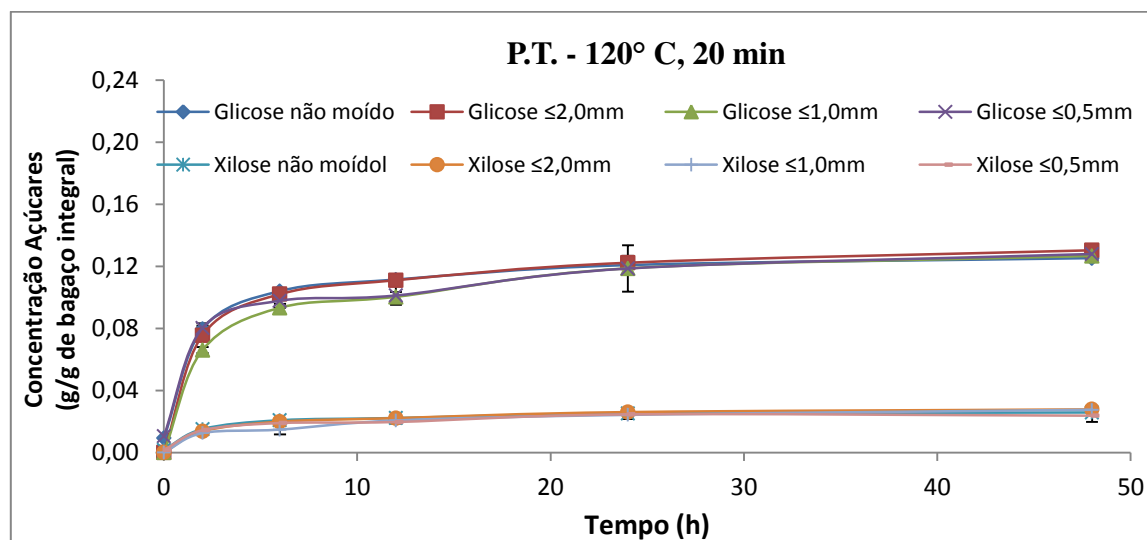


Figura 4.9: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 20 min.

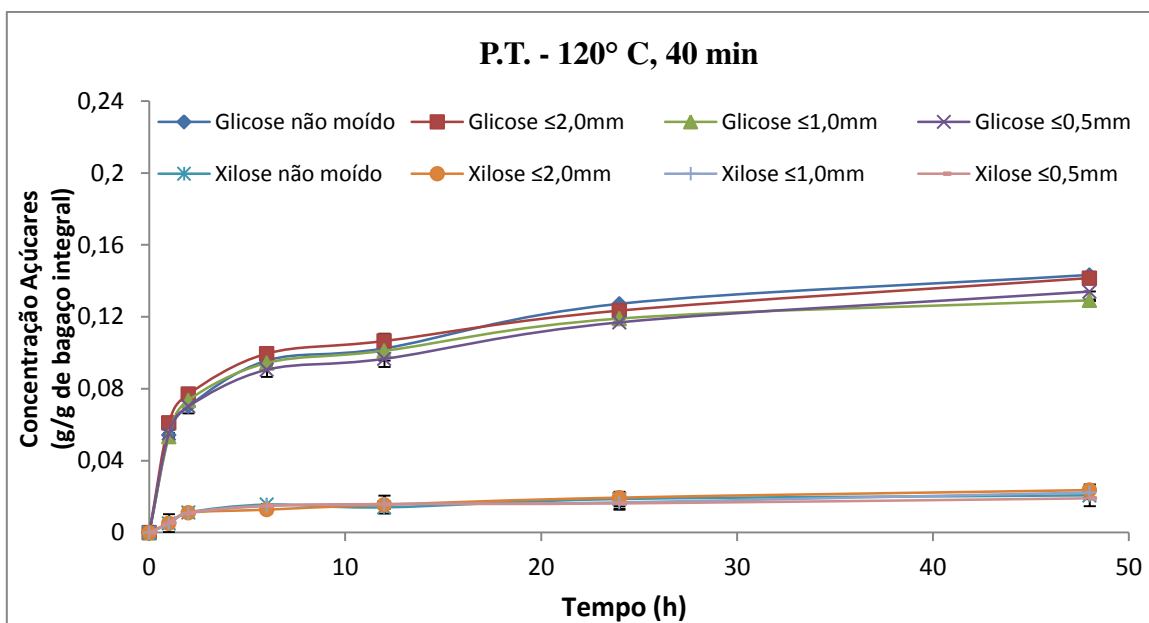


Figura 4.10: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 40 min.

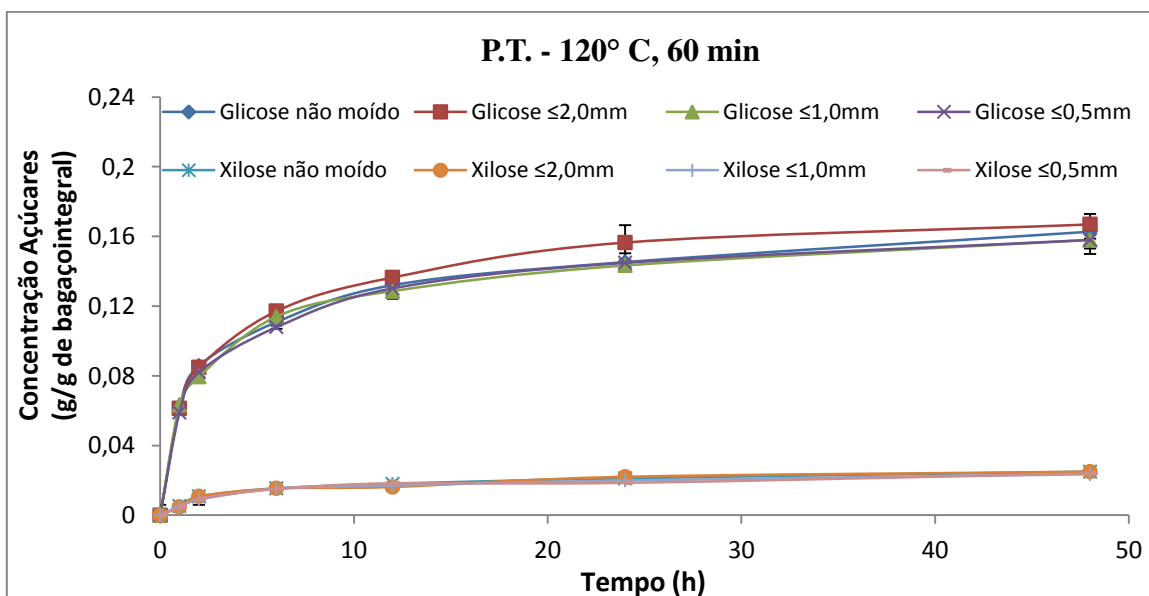


Figura 4.11: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 120° C, 60 min.

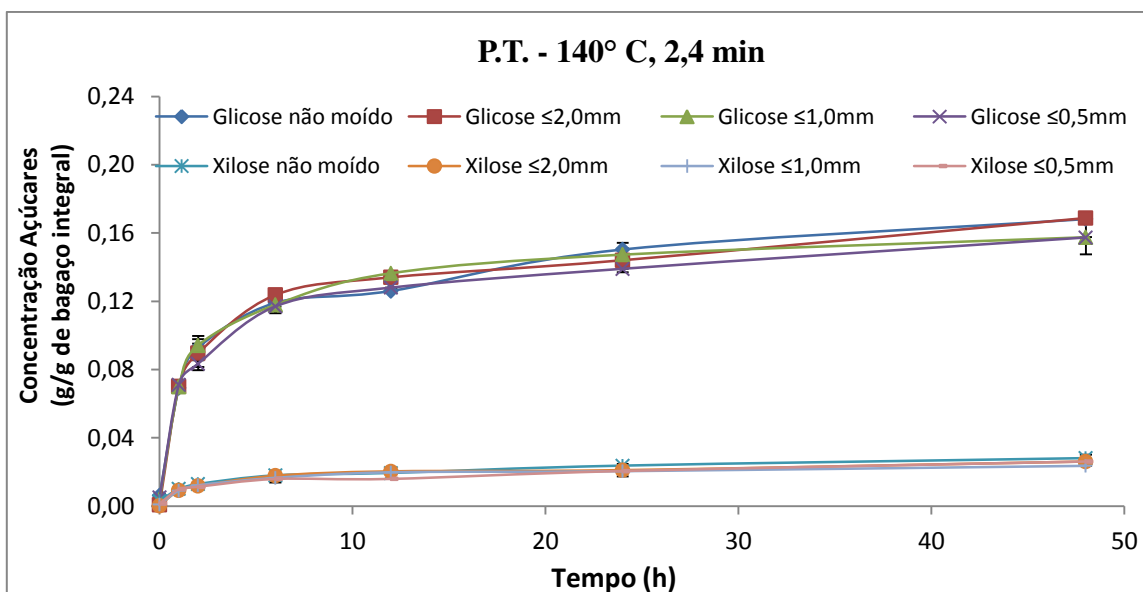


Figura 4.12: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 2,4 min.

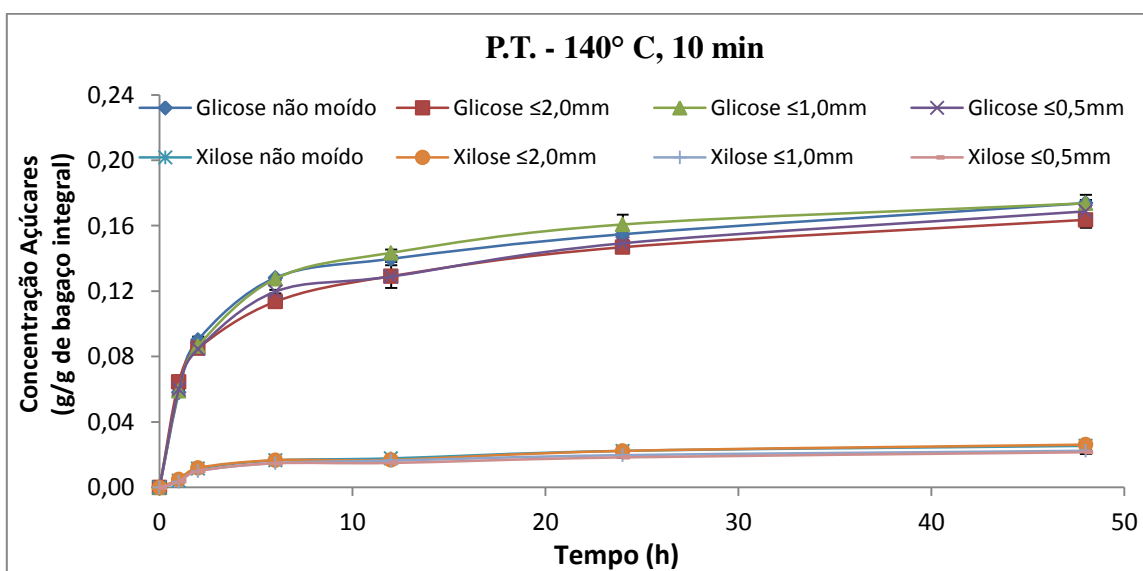


Figura 4.13: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 10 min.

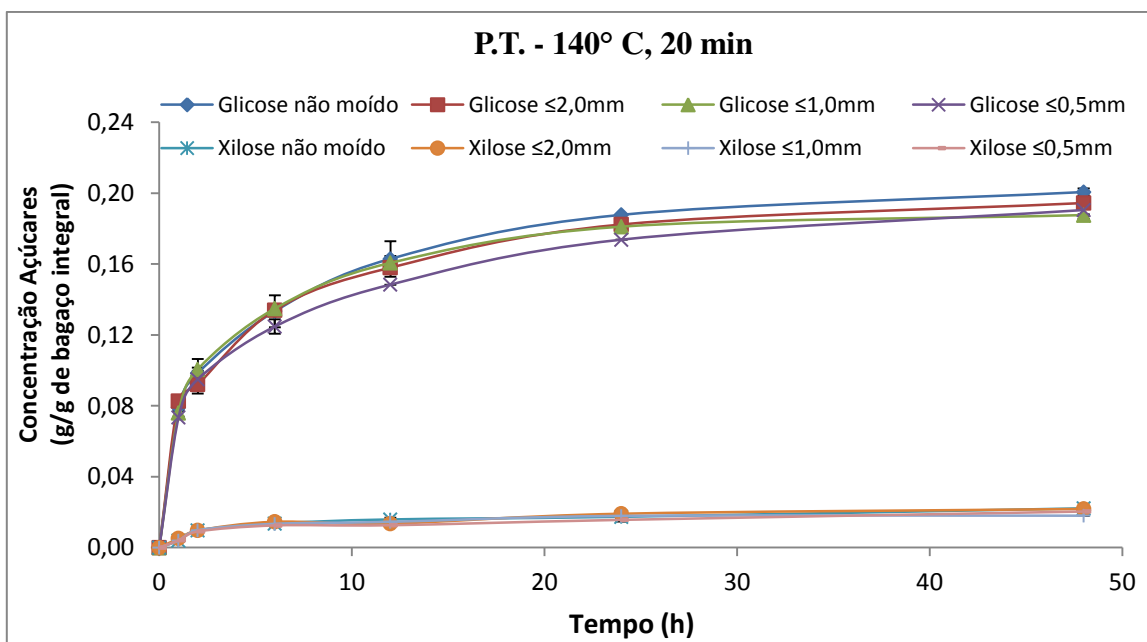


Figura 4.14: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 20 min.

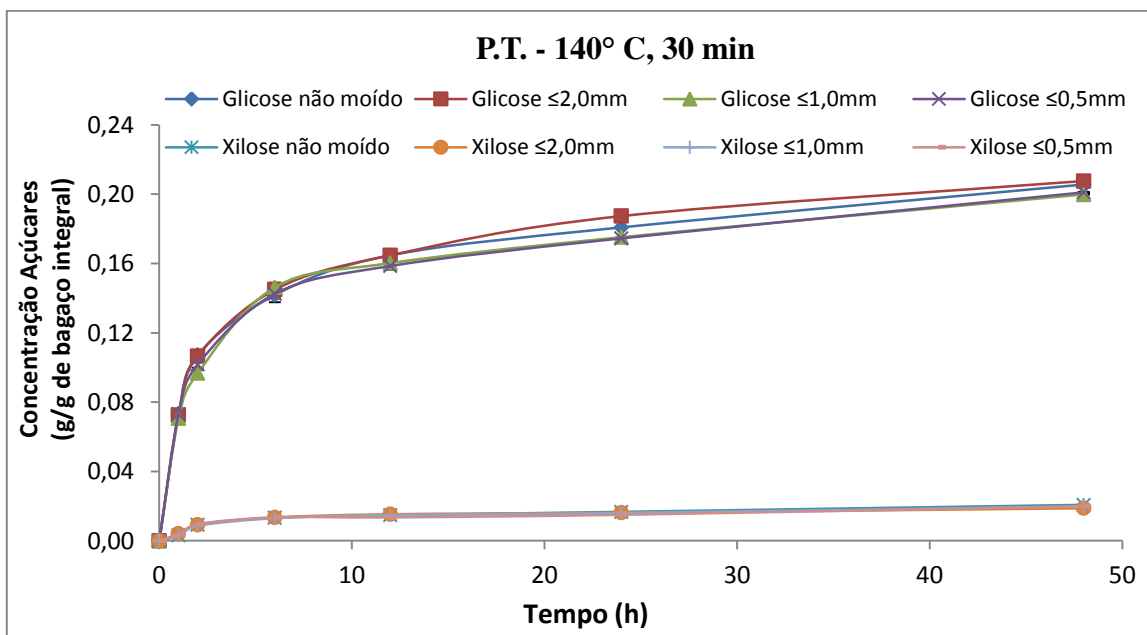


Figura 4.15: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras pré-tratadas a 140° C, 30 min.

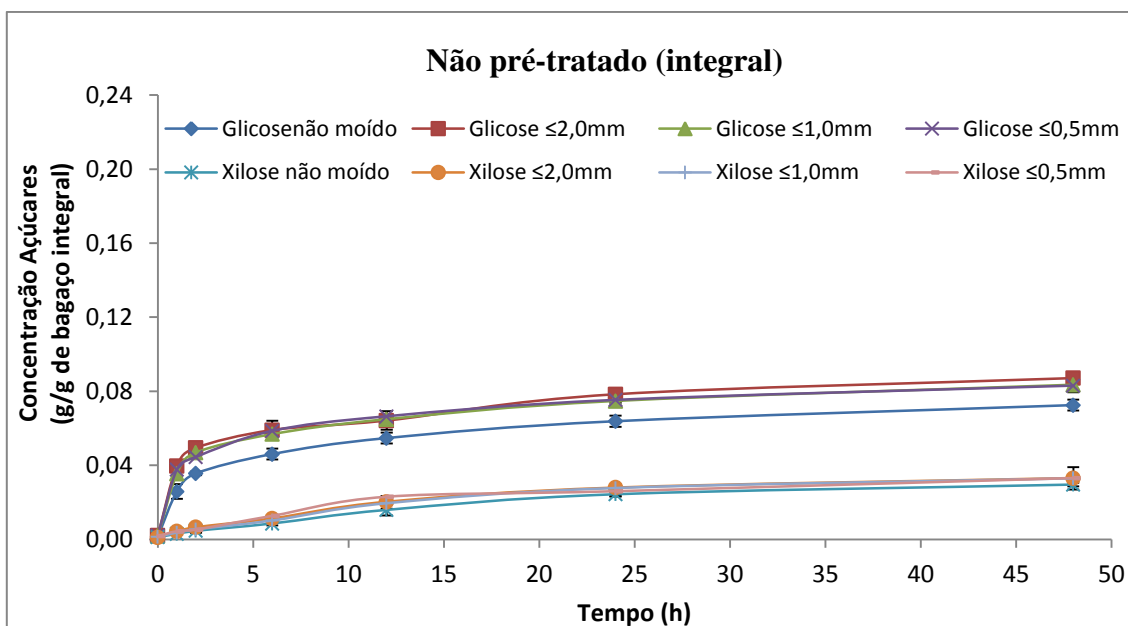


Figura 4.16: Perfis de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática para as amostras não pré-tratadas.

Observando os perfis de hidrólise para cada condição de pré-tratamento, nota-se que a concentração final de glicose, ao final das 48 h de hidrólise, foi maior conforme foi aumentada a severidade do pré-tratamento a que a biomassa foi submetida. As menores concentrações de glicose foram observadas para as amostras pré-tratadas a 120° C, 4 min, sendo de aproximadamente 0,11 g/g de bagaço integral. Por outro lado, as maiores concentrações foram observadas para as amostras pré-tratadas a 140° C, 30 min, as quais chegaram a 0,21 g/g bagaço integral. Nas amostras não pré-tratadas (Figura 4.16), a concentração de glicose variou de 0,07 a 0,09 g/g de bagaço integral. Dessa forma, fica evidente o aumento da eficácia da conversão da celulose em glicose na hidrólise enzimática após o pré-tratamento da biomassa.

Em relação aos perfis de xilose, a maior concentração obtida após as 48h de hidrólise foi observada para as amostras pré-tratadas a 120° C, 4 min, sendo de aproximadamente 0,035 g/g de bagaço integral. Por outro lado, as menores concentrações foram de 0,019 g/g de bagaço integral, obtidas para as amostras pré-tratadas a 140° C, 30 min. Observa-se que houve uma diminuição na concentração final de xilose conforme mais severo foi o pré-tratamento. Isso se deve ao fato de que, o material pré-tratado em

condições mais severas, apresentou uma menor quantidade de hemiceluloses disponível na hidrólise, como mostrado nas Tabelas 4.3 e 4.4 do item 4.3.3.

Também foi observado que o tamanho de partícula não influenciou na hidrólise enzimática, uma vez que os perfis (tanto para glicose, como para xilose) foram semelhantes para as diferentes amostras pré-tratadas em uma mesma condição.

Baseado nos perfis de hidrólise, foram calculadas as conversões dos carboidratos e rendimentos para cada condição de pré-tratamento.

4.5.2. Conversão dos carboidratos na hidrólise enzimática

As Figuras 4.17 e 4.18 mostram a conversão dos carboidratos na hidrólise enzimática para as diferentes amostras de bagaço pré-tratadas em cada condição estabelecida.

4.5.2.1. Conversão da celulose

A Figura 4.17 apresenta a porcentagem de conversão da celulose em glicose dos materiais pré-tratados e das amostras integrais (sem pré-tratamento), submetidos à hidrólise enzimática. O cálculo é mostrado no apêndice I.

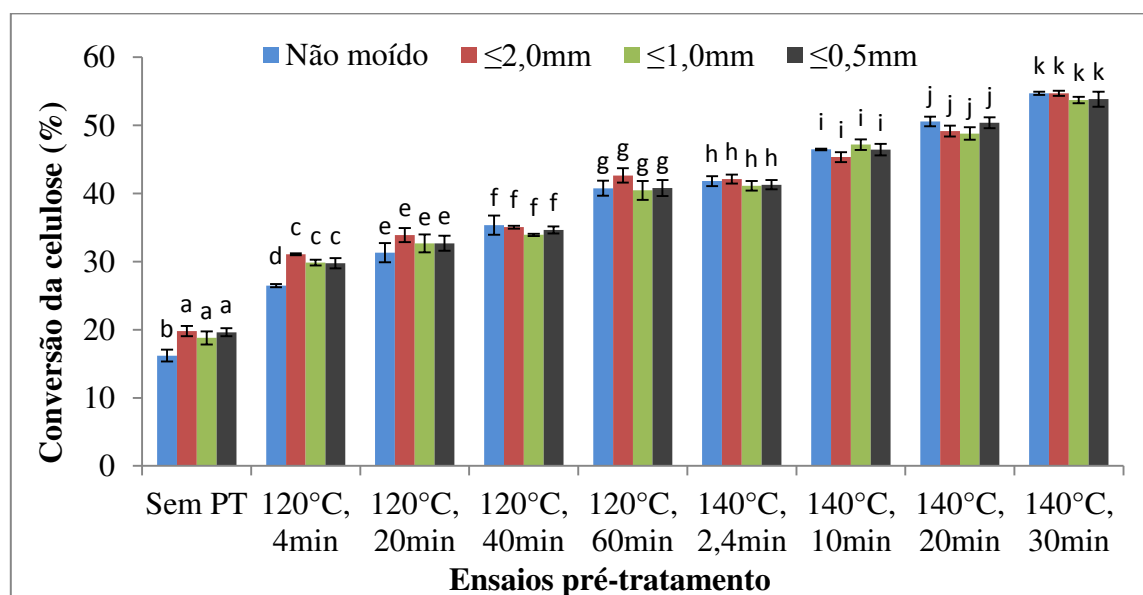


Figura 4.17: Conversão de celulose na hidrólise enzimática. Barras com mesma letra indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$).

De acordo com a Figura 4.17, a conversão da celulose na hidrólise variou de 26 a 55% para os materiais pré-tratados nas diferentes condições. Nota-se uma grande diferença na conversão dos materiais pré-tratados para os não pré-tratados, os quais tiveram conversão máxima de 20%. É possível observar que o aumento da severidade do pré-tratamento resultou em uma maior conversão. Todos os materiais pré-tratados a 140°C tiveram conversões superiores comparadas à temperatura de 120°C. A menor conversão foi observada nos materiais pré-tratados a 120° C, 4 min, a qual variou entre 26 a 31% entre as diferentes amostras. A maior conversão ocorreu nos materiais pré-tratados a 140°C, 30 min, chegando a 54-55%. Foi realizado o Teste Tukey HSD para avaliar se houve diferença estatística na conversão entre as amostras com diferentes granulometrias, pré-tratadas em uma mesma condição. O software utilizado foi o STATISTICA 7.0 e os resultados a 95% de confiança mostraram que não houve diferença significativa na conversão entre as diferentes amostras, exceto para a amostra não moída sem pré-tratamento e a pré-tratada na condição mais branda (120° C, 4 min), as quais apresentaram uma conversão menor que as amostras moídas. O maior tamanho de partícula do bagaço não moído pode ter dificultado a hidrólise enzimática, levando a uma menor conversão do bagaço não pré-tratado. Da mesma forma, no ensaio mais brando (120° C, 4 min), a baixa temperatura e o pouco tempo de exposição do material no pré-tratamento pode não ter causado muitas alterações na sua estrutura, levando a uma conversão menor do bagaço não moído, assim como observado para no material não pré-tratado.

O aumento da conversão devido a maior a severidade do pré-tratamento pode estar relacionado à remoção das hemiceluloses, pois essas torna a biomassa recalcitrante, cobrindo e protegendo as fibras de celulose contra o ataque enzimático (JIANG *et al.*, 2013).

JIANG *et al.* (2013), trabalhando com bagaço de cana (pré-tratado a 145°C, 15min, 0,5% (m/v) de ácido sulfúrico), obtiveram uma conversão de glicose de 46,1% em 72 h de hidrólise enzimática (1% de carga de sólidos). Também é reportado que o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído não aumentou a área de superfície da biomassa (comparada ao material integral). Além disso, observaram um aumento do índice de cristalinidade, ocasionado pelo pré-tratamento, por ser capaz de hidrolisar principalmente os componentes amorfos da biomassa, restando no material uma maior porcentagem de

regiões cristalinas nas fibrilas de celulose, as quais são mais resistentes à hidrólise enzimática. CANILHA *et al.* (2011) avaliaram a eficiência do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em diferentes condições (temperatura, tempo de reação e concentração de ácido), na hidrólise enzimática. Na melhor condição, observou uma conversão de glicose de 45,4% após 72 h de hidrólise (10% de carga de sólidos e 10 FPU/g de bagaço de celulase).

Como uma alternativa para melhorar a conversão de glicose, condições mais severas de pré-tratamento poderiam ser utilizadas. Por outro lado, levaria a uma maior perda de celulose no material sólido, como também uma maior degradação dos açúcares no licor (CANILHA *et al.*, 2011).

ROCHA *et al.* (2011), avaliando uma condição mais severa de pré-tratamento comparada à utilizada no presente trabalho, obteve uma conversão de celulose na hidrólise enzimática de 75%, para bagaço de cana pré-tratado com um mistura de ácido sulfúrico 1% (m/v) e ácido acético 1% (m/v) a 190° C por 10 minutos. LU *et al.* (2009) avaliaram a eficiência de diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído na hidrólise enzimática de palha de trigo. A máxima conversão de glicana a glicose (63,7%) foi obtida para a amostra pré-tratada a 180°C por 10 minutos, com 1% (m/m) de ácido sulfúrico e 20% (m/m) de sólidos. As baixas conversões obtidas no presente trabalho (máximo de 55%) podem estar relacionadas à baixa severidade do pré-tratamento, sendo que a utilização maiores temperaturas de pré-tratamento poderiam resultar em maiores conversões da celulose durante a hidrólise enzimática.

Em relação à influência do tamanho de partícula, GOEL e RAMACHANDRAN (1983) também não observaram nenhum efeito significativo na hidrólise em amostras de bagaço de 0,420 a 0,125 mm, pré-tratadas com reagente alcalino. KHULLAR *et al.* (2013), não observaram diferenças no rendimento de glicose entre partículas de *Miscanthus* de 6,0 e 2,0 mm (abertura de peneira) pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído, porém observaram um aumento maior que 20% quando reduziu o tamanho da partícula para 0,08 mm. ZHENG *et al.* (2007) não relataram diferenças na conversão de glicose (%) de palha de milho quando submetida ao pré-tratamento hidrotérmico a 190° C, 10 min para dois tamanhos de partículas, 53-75 µm e 425-710 µm. Por outro lado, LIU *et al.* (2009), avaliando diferentes tamanhos de partículas de palha de milho, pré-tratadas por explosão a vapor, observaram que quanto maior o tamanho das partículas, maior foi a conversão de glicose na hidrólise

enzimática, obtendo diferença de até 30% na conversão de glicana, entre partículas de 2,5 e 0,5 mm.

Nota-se que os resultados reportados na literatura divergem quanto a influência do tamanho de partícula da biomassa na conversão de glicose na hidrólise enzimática. Há resultados que mostram que a redução do tamanho de partícula não influencia a etapa de hidrólise enzimática. Outros que apontam aumento da conversão conforme é reduzido o tamanho de partícula, e por outro lado, também é reportado o aumento da conversão conforme maiores são as partículas do material submetido à hidrólise enzimática. VIDAL-Jr. *et al.* (2011) apontam que não é possível avaliar o efeito do tamanho de partícula na conversão da biomassa sem levar em consideração o pré-tratamento utilizado. Além disso, a biomassa e a faixa de granulometria avaliada podem influenciar diretamente nos resultados. Dessa forma, no presente trabalho, as amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico diluído, nos diferentes tamanhos de partículas avaliados, não influenciaram na conversão de celulose na hidrólise enzimática.

4.5.2.2. Conversão das hemiceluloses

A Figura 4.18 apresenta a porcentagem de conversão das hemiceluloses em xilose dos materiais pré-tratados submetidos à hidrólise enzimática. O cálculo é mostrado no apêndice I.

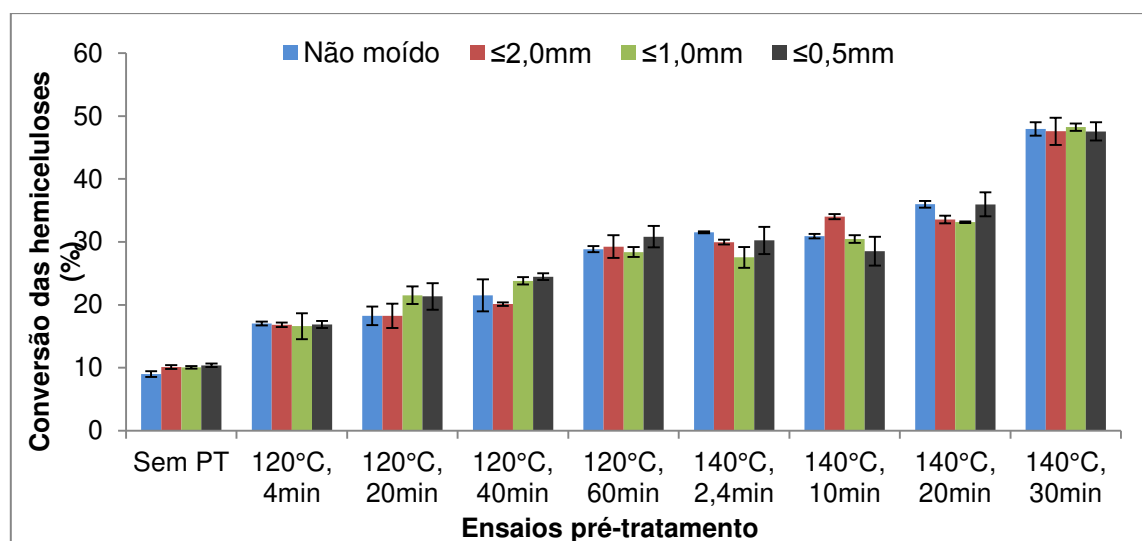


Figura 4.18: Conversão das hemiceluloses em xilose na hidrólise enzimática.

De acordo com a Figura 4.18, a conversão de hemiceluloses variou de 16 a 48% entre as amostras pré-tratadas nas diferentes condições. É possível observar que o pré-tratamento aumentou a conversão das hemiceluloses em relação aos materiais não pré-tratados, tendo esses alcançado uma conversão máxima de 10%. Também foi observado aumento de conversão conforme maior foi a severidade do pré-tratamento. A menor porcentagem foi observada nos materiais pré-tratados a 120°C, 4 min, sendo de aproximadamente 16%. Já a maior foi obtida nos materiais pré-tratados a 140°C, 30 min, chegando a 47-48% de conversão. Também não houve influência do tamanho de partícula, uma vez que as conversões, para uma mesma condição de pré-tratamento, foram semelhantes. De acordo com JUHÁSZ *et al.* (2005), a conversão das hemiceluloses é possível pois a enzima comercial Celluclast (utilizada na hidrólise) contém alta atividade de acetil xilana esterases, capaz de hidrolisar as hemiceluloses.

4.5.3. Rendimento global

A Figura 4.19 mostra o rendimento global da celulose para diferentes amostras de bagaço após o pré-tratamento nas diferentes condições e hidrólise enzimática. Os cálculos são mostrados no apêndice I.

4.5.3.1. Rendimento global da celulose

A Figura 4.19 apresenta o rendimento global da celulose para as diferentes amostras após o pré-tratamento e hidrólise enzimática.

De acordo com a Figura 4.19, o rendimento global de celulose variou entre 23 e 46% nos materiais após o pré-tratamento e hidrólise enzimática. O menor rendimento foi observado nas amostras pré-tratadas a 120°C, 4 min, o qual variou entre 23 e 27%. Já os maiores rendimentos foram observados para as amostras pré-tratadas a 140°C, 30 min, sendo de 44-46%. Todos os ensaios a 140°C apresentaram rendimentos superiores aos observados a 120°C, mesmo com tempos de reação inferiores. Dessa forma, pode-se a temperatura de pré-tratamento exerceu grande influência na hidrólise enzimática, sendo que a 140°C foram observados os maiores rendimentos globais.

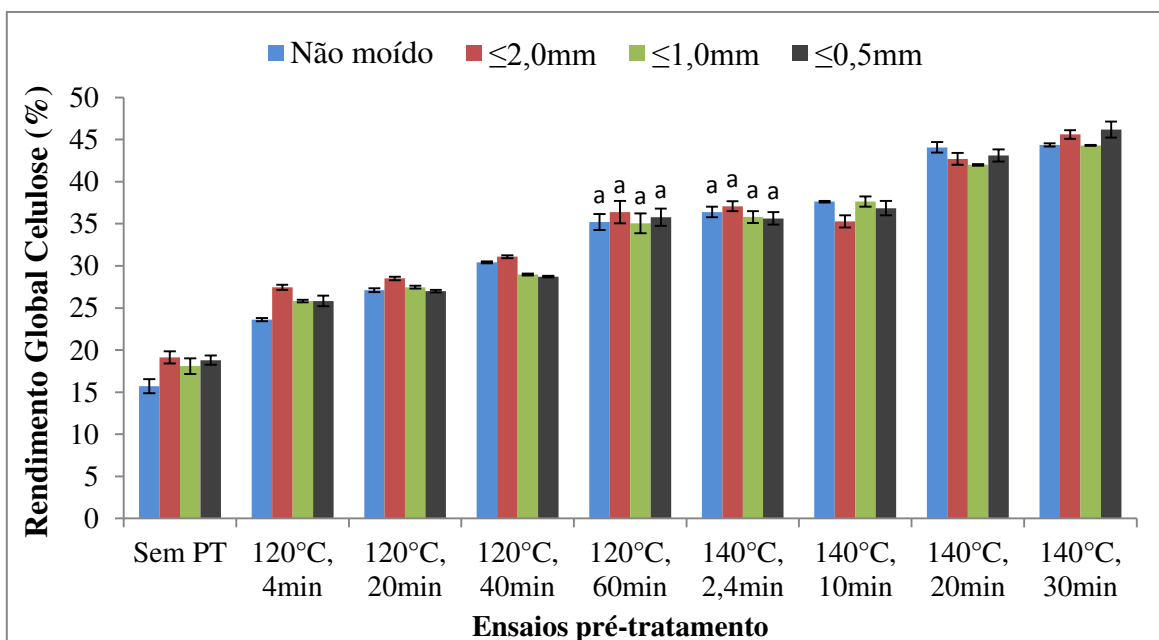


Figura 4.19: Rendimento global da celulose. As barras com mesma letra indicam que não houve diferença estatística significativa ($p=0,05$).

Os rendimentos entre as amostras pré-tratadas a 120°C, 60 min e 140°C, 4 min, apresentaram valores semelhantes, entre 35 e 37%. Por outro lado, o fator de severidade (FS) e fator de severidade combinado (FSC) foram maiores para o ensaio a 120°C, 60 min (2,37 e 1,29, respectivamente), comparados ao ensaio a 140°C, 4 min que obteve o FS de 1,56 e o FSC de 0,53 (mostrado na Tabela 4.2 do item 4.3.1). Foi realizado o Teste Tukey HSD a 95% de confiança, e os resultados mostraram que não houve nenhuma diferença significativa entre as amostras pré-tratadas nessas duas condições, conforme indicado pelas barras com letras iguais na Figura 4.19. Sendo assim, o aumento da temperatura resultou em uma maior efetividade do pré-tratamento em tempos menores de reação, e também na hidrólise enzimática.

Também não foi observada influência do tamanho das partículas entre os diferentes materiais, uma vez que os rendimentos globais de celulose, para uma mesma condição, são semelhantes após o pré-tratamento e hidrólise enzimática do material.

MONAVARI *et al.* (2009), observaram uma leve diferença (aproximadamente 3%), no rendimento global de carboidratos liberados após pré-tratamento por explosão a vapor e hidrólise enzimática, entre amostras de abeto (*Picea abies*) com diferentes

tamanhos de partícula (1 a 6 mm), tendo a granulometria do material influenciado pouco o processo.

Os resultados mostraram que não houveram diferenças no pré-tratamento e hidrólise enzimática entre os materiais com diferentes granulometrias, mostrando não haver necessidade em reduzir o tamanho de partículas do bagaço. Dessa forma, o bagaço não moído foi selecionado para as análises mostradas nos itens 4.6 e 4.7.

4.6. Avaliação do pré-tratamento, hidrólise enzimática e formação de inibidores

A Figura 4.20 apresenta a solubilização de massa no pré-tratamento, o rendimento de pentoses (xilose e arabinose) obtidas no licor, a conversão de celulose na hidrólise enzimática, rendimento global de celulose, e a concentração de inibidores formados no licor de pré-tratamento (5-hidroximetilfurfural e furfural) (em g/L), para a amostra de bagaço não moído.

Analizando a Figura 4.20, fica evidente que o aumento da temperatura e do tempo de pré-tratamento resultaram em uma maior solubilização de massa, principalmente das hemiceluloses, que foi recuperada na forma de pentoses no licor. O aumento da severidade do pré-tratamento resultou em maiores rendimentos de pentoses no licor, tendo chegado a um valor superior a 70%. Da mesma forma, o aumento da severidade do pré-tratamento resultou em uma maior conversão da celulose na hidrólise enzimática e rendimento global, obtendo o máximo de 55 e 44%, respectivamente.

Nota-se que, mesmo em tempos de reação inferiores, as conversões de celulose e rendimentos globais dos materiais pré-tratados a 140°C foram maiores do que os pré-tratados a 120°C. Sendo assim, a maior temperatura avaliada (140°C), associada a menores tempos de reação, foi mais eficiente na hidrólise.

Por outro lado, houve maior formação de inibidores nos licores produzidos no pré-tratamento a 140°C, o qual variou de 0,2 g/L (2,4 min) até 0,9 g/L de furfural na condição mais severa (30 minutos). Por outro lado, o ensaio mais severo a 120°C (60 minutos) produziu somente 0,2 g/L de furfural. Sendo assim, a temperatura mais elevada de pré-tratamento teve grande influência na degradação da xilose produzida, levando a formação de furfural.

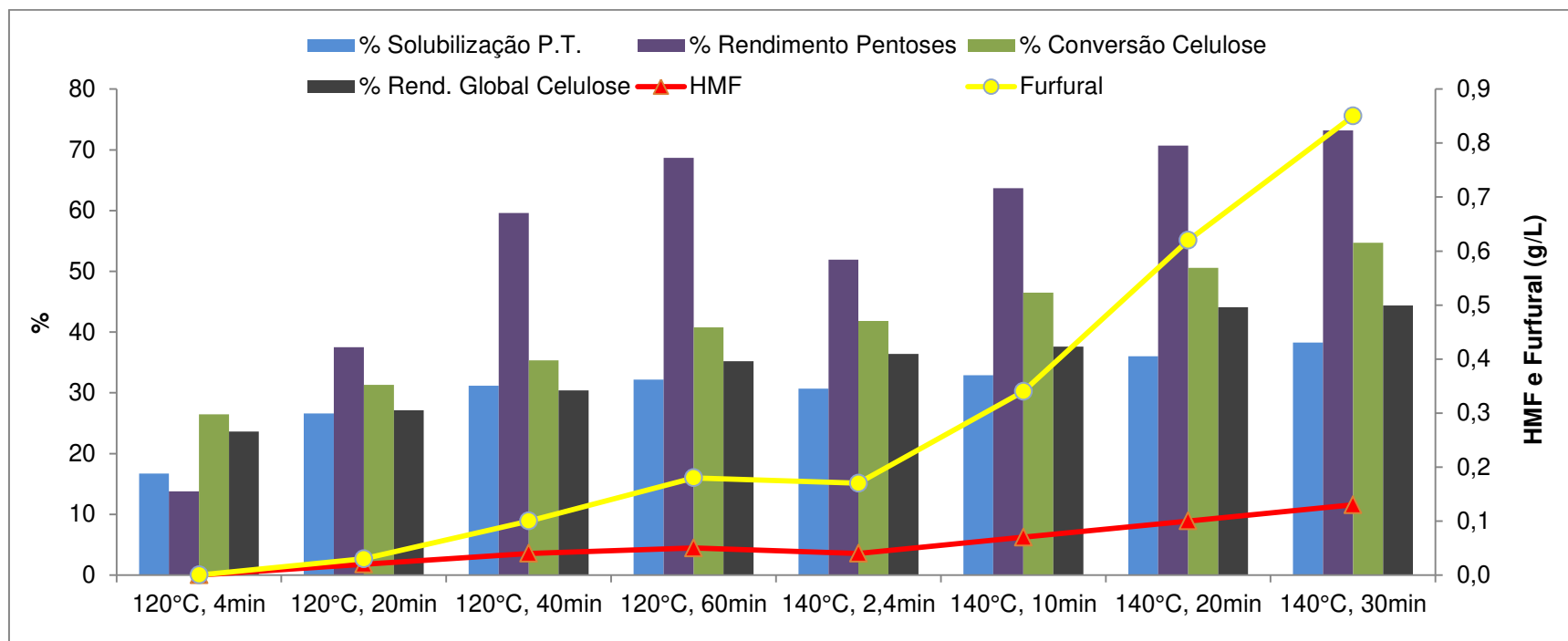


Figura 4.20: Massa solubilizada no pré-tratamento, rendimento de pentoses no licor, conversão de celulose na hidrólise, rendimento global de celulose, e formação de inibidores (HMF e furfural) no licor de pré-tratamento para a amostra de bagaço não moído.

4.7. Balanço de massa

A Figura 4.21 apresenta o fluxo de massa, para material não moído, na melhor condição de pré-tratamento definida (140°C, 30 min) e na hidrólise enzimática. Os componentes foram expressos em grama de massa seca (g MS).

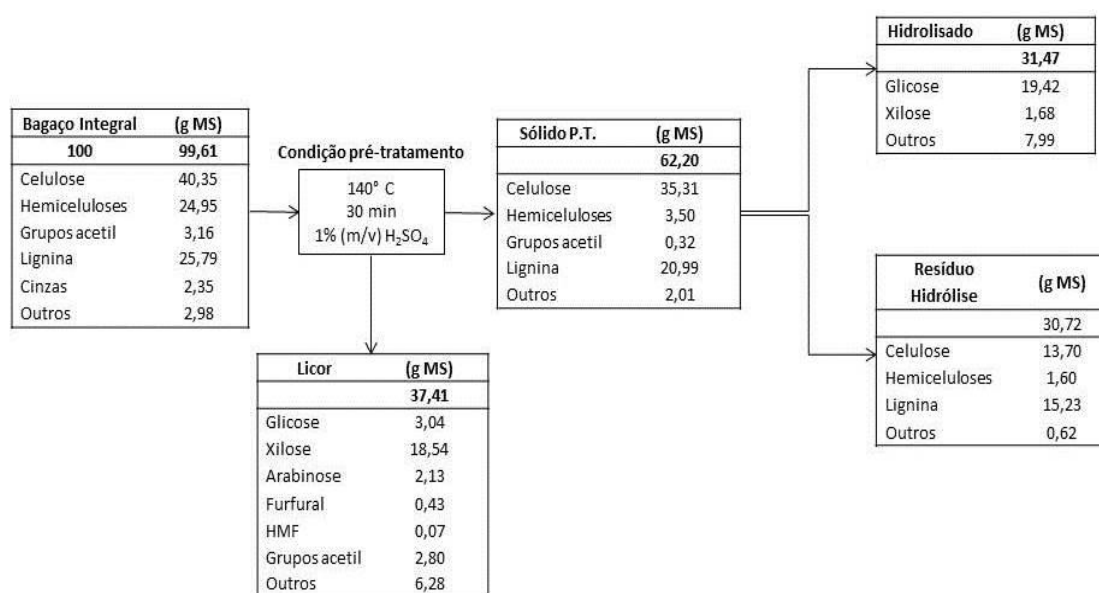


Figura 4.21: Balanço de massa nas etapas do processo.

Após o pré-tratamento, 61,7% da massa permaneceu na fração sólida, enquanto que 37,8% de massa foram solubilizadas e suas frações recuperadas no licor de pré-tratamento. A fração sólida pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática, sendo que 50,6% de massa foram hidrolisadas e 49,4% permaneceram na fração sólida.

Nota-se que a fração sólida obtida após a hidrólise enzimática ainda apresenta celulose, a qual não foi convertida a glicose durante a reação.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliada a influência do tamanho de partícula do bagaço de cana em diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e na hidrólise enzimática, objetivando a conversão dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis.

Não houve alteração significativa na composição química das amostras brutas após a moagem, sendo os teores dos componentes semelhantes aos observados na amostra não moída.

O fator de severidade foi calculado para as diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e foi determinado que a condição mais severa foi a 140°C, 30 min. Nos ensaios de pré-tratamento observou-se o aumento na solubilização das hemiceluloses conforme maior foi o tempo e a temperatura de pré-tratamento. A 140°C, foram obtidas maiores solubilizações de hemiceluloses em menores tempos de reação, comparado aos ensaios realizados a 120° C. O melhor ensaio determinado foi na condição mais severa (140°C, 30 minutos), sendo que, aproximadamente, 87% das hemiceluloses foram solubilizadas e o rendimento de pentoses (xilose e arabinose) no licor foi de 77%. Nessa condição mais severa, foi observada uma solubilização de celulose de 17%, o que não é desejável visando a utilização da fração sólida na hidrólise enzimática. Porém, houve um aumento de 38-40 para 54-56% no teor de celulose entre as diferentes amostras pré-tratadas. Por outro lado, a maior temperatura ocasionou uma maior degradação da xilose no licor e consequente formação de furfural, chegando a 0,9 g/L. Em relação ao tamanho de partícula, não foi observada diferença significativa, entre as diferentes amostras, na solubilização de hemiceluloses e nem no rendimento de pentoses no licor, indicando que a faixa da granulometria avaliada não influenciou no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

As diferentes condições de pré-tratamento foram avaliadas em relação à conversão de celulose na hidrólise enzimática e ao rendimento global. Como esperado, a conversão e rendimento global foram maiores nos materiais que apresentaram maior remoção de

hemiceluloses no pré-tratamento, tendo obtido uma conversão de celulose máxima de 55% e rendimento global de 44%, na condição de pré-tratamento de 140°C, 30 minutos. O tamanho de partícula também não influenciou nesta etapa, uma vez que as amostras pré-tratadas com diferentes granulometrias apresentaram conversões e rendimentos de hidrólise semelhantes.

O estudo demonstrou que houve uma remoção eficiente das hemiceluloses e recuperação dos açúcares no licor, na condição de pré-tratamento mais severa avaliada. Porém, a conversão de celulose na hidrólise enzimática e rendimento global do processo não apresentaram a mesma eficiência, podendo estar relacionado à baixa severidade dos pré-tratamentos avaliados, resultando em baixas conversões de celulose. Também não foi demonstrada a necessidade em reduzir o tamanho de partícula do bagaço de cana, uma vez que a faixa da granulometria avaliada não obteve influência nas etapas de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e hidrólise enzimática. Contudo, o efeito do tamanho de partícula deve ser avaliado juntamente com o pré-tratamento empregado, não podendo tratar esse resultado como um caso generalizado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, com base nos resultados aqui apresentados, têm-se:

- Avaliação da cinética de solubilização dos componentes e eficácia na hidrólise enzimática em materiais pré-tratados a temperaturas mais elevadas;
- Avaliação de uma maior faixa granulométrica da biomassa para determinação da influência do tamanho de partícula;
- Avaliação da influência do tamanho de partícula em diferentes pré-tratamentos;
- Avaliação da adsorção das enzimas em materiais com diferentes granulometrias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR R.; RAMIREZ J. A.; GARROTE G.; VASQUEZ M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v. 55, p.309-318, 2002.

ALVES DO PRADO, H. F.; LEITE, R. S. R.; MARTINS, D. A. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Cellulase: Types and Action, Mechanism and Uses. Reading: Adam E. Golan, 2011. Cap. 6: Cellulolytic Enzymes Isolated from Brazilian Areas: Production, Characterization and Applications, p. 183-210.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANDO, H.; SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; UEMURA, Y.; HATATE, Y. Decomposition behaviour of plant biomass in hot-compressed water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 39, p. 3688–3693, 2000.

ANDRIC, P.; MEYER A. S.; JENSEN, P. A.; JOHANSEN, K. D. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 308-324, 2010.

AYALA, O. L. B. Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2012. Dissertação (Mestrado).

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

BALLESTEROS, I.; OLIVA J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES P.; BALLESTEROS M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry*, v. 38, p.187-192, 2002.

BARROS, R. R. O.; PAREDES, R. S.; ENDO, T.; BON, E. P. S.; LEE, S. H. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 288–294, 2013.

BENJAMIN Y.; CHENG H.; GÖRGENS J. F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, v. 51, p. 7-18, 2013.

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

BHALLA, A.; BANSAL, N; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 751-759, 2013.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable andustainable Energy Reviews*, v. 36, p. 91-106, 2014.

BIANCHI, M. L. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado).

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, v. 19, p. 797–841, 1994.

BOTELLA, C.; DIAZ, A. B.; WANG, R.; KOUTINAS, A.; WEBB, C. Particulate bioprocessing: A novel process strategy for biorefineries, *Process Biochemistry*, p. 546-555, 2009.

CANEVASCINI, G., GATTEN, C. A. A comparative investigation of various cellulase assay procedures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p. 1573-1590, 1981.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 1467–1475, 2011.

CARRIER, M.; SERANI-LOPPINET, A.; DENUX, D.; LASNIER, J. M.; HAM-PICHAVANT, F.; CANSELL, F.; AYMONIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 298-307, 2011.

CASTRO, A. M., PEREIRA, N. J. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 1462-1476, 2012.

CHEN, Y.; DONG, B.; QIN, W.; XIAO, D. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6994–6999, 2010.

CHHEDA J. N.; ROMÁN-LESHKOV Y.; DUMESIC J. A. Production of 5-hydroxymethylfurfural and furfural by dehydration of biomass-derived mono- and polysaccharides, *Green Chemistry*, v. 9, p. 342-350, 2007.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERREO, S.; ORIANI, L.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, v. 40, p. 1-11, 2012.

CHUNG, B. Y.; LEE, J. T.; BAI, H. W.; KIM, U. J.; BAE, H. J.; WI, S. G.; CHO, J. Y. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 81, p. 1003-1007, 2012.

CLAEYSSSENS, M.; TOMME, P. Structure function relationships of cellulolytic proteins from *Trichoderma reesei*, In KUBICEK, C. P. et al. Ed *Trichoderma reesei* Cellulases. Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Technical Communications and Springer Gmb H, v. 43, p. 1-11, 1989.

CONDE-MEJÍA, C.; JIMÉNEZ-GUTIÉRREZA, A.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 90, p. 189-202, 2012.

DASARI, R. K.; BERSON, R. E. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137, p. 289-299, 2007.

DEHKHODA, A. Concentrating lignocellulosic hydrolysate by evaporation and its fermentation by repeated fedbatch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*. Industrial Biotechnology Boras University and SEKAB E-Technology, Sweden, 2008. Dissertação (Mestrado).

DEKKER, R. F. H. Hidrolisis enzimática de lignocelulósicos. In IX CURSO INTERNACIONAL DE INGIENERIA BIOQUÍMICA, Valparaiso – Valparaiso, 1989.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA T. L.; JESUS C. D. F.; ROSSELL C. E. V.; MACIEL-FILHO R.; BONOMI A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane, *Energy*, v. 43, p. 246-252, 2012.

DIAS M. O. S.; JUNQUEIRA T.; CAVALETT O.; PAVANELLO L. G.; CUNHA M. P.; JESUS C. D. F.; MACIEL-FILHO R.; BONOMI A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Applied Energy*, v. 109, p. 72-79, 2013.

DYK, J. S. V; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1458-1480, 2012.

DISPARDO, J. Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand. Energy Information Administration/DOE, Washington, DC, 2000.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v. 55, p. 33, 1996.

DÜSTERHÖFT, E. M.; ENGELS, F. M.; VORAGEN, A. G. J. Parameters affecting the enzymic hydrolysis of oil-seed meals, lignocellulosic by-products of the food industry. *Bioresource Technology*, v. 44, p. 39-46, 1993.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communication*, v. 21, p. 542–556, 2000.

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, v. 186, p. 1–67, 2005.

EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 12, p. 225-228, 1990.

ELSHAFEI, A. M.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E. C.; GADDY, J. L. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Bioresource Technology*, v. 35, p. 73-80, 1991.

FAN, L. T.; LEE, Y.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, p. 177-199, 1980.

FAN, L.; LEE, Y.; GHARPURAY, M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 23, p. 158-183, 1982.

FAN, L. T., GHARPURAY, M. M., LEE, Y. H. Design and economics evaluation of cellulose hydrolysis processes. In: *Cellulose hydrolysis Biotechnology Monographs*, v. 57, p. 149-187, 1987.

FENGEL, D. e WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter & CO, 1989, 613p.

FUENTES, L. L. G. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009. Dissertação (Mestrado). GALBE, M.; ZACCHI, G.. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 108, p. 41–65, 2007.

GARCIA, D. R. Determinação de Dados Cinéticos do Pré-Tratamento de Bagaço de Cana-de Açúcar com Peróxido de Hidrogênio Alcalino e da Hidrólise Enzimática Posterior. Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H.; FAN, L. T. Structural modifications of lignocellulosics by pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p. 157-172, 1983.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GIESE, E. C.; PIEROZZI, M.; DUSSÁN, K. J.; CHANDEL, K.; SILVA, S. S. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, v. 88, p. 1266-1272, 2013.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIC, R. Hemicellulose. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GLASSER, W. G.; KAAR, W. E.; JAIN, R. K.; SEALEY, J. E. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p. 367-374, 2000.

GOEL, S. C.; RAMACHANDRAN, K. B. Comparison of the rates of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and bagasse with celluloses. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 5, p. 281-284, 1983.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, p. 72-78, 2010.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 6, P. 1500-1504, 2009.

GU, F.; WANG, W.; LEI, J.; JIN, Y. Sulfite–formaldehyde pretreatment on rice straw for the improvement of enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 218-224, 2013.

GU F.; WANG W.; JING L.; JIN Y. Effects of green liquor pretreatment on the chemical composition and enzymatic digestibility of rice straw. *Bioresource Technology*, v. 149, p. 375-382, 2013.

GUO, H.; CHANG J.; YIN Q.; WANG P.; LU M.; WANG X.; DANG X. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 361-365, 2013.

GURGEL, L. V. A. Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Estudo cinético de Sacarificação de Celulose para Produção de Etanol. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010. Tese (Doutorado).

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

HARRISON M. D.; ZHANG Z.; SHAND K.; O'HARA I. M.; DOHERTY W. O. S.; DALE J. L. Effect of pretreatment on saccharification of sugar cane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 105-113, 2013.

HARUN S.; BALAN V.; TAKRIFFL M. S.; HASSAN O.; JAHIM J.; DALE B. E. Performance of AFEX™ pretreated rice straw as source of fermentable sugars: the influence of particle size. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, p. 40-57, 2013.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. *Clinical chemistry principles and techniques*, 2 ed. Harper and Row Publishers Inc. N. Y., 1974, 1288 p.

HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCKER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C.. Determination of acid soluble lignin concentration curve by UV-Vis Spectroscopy. National Renewable Energy Laboratory (NREL), p. 1-13, 2007.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. *Chemical Technology*, v. 10, p. 315–319, 1980.

HSU, T. A.; HIMMEL, M.; SCHELL, D.; FARMER, J.; BERGGREN, M. Desing and initial operation of a high-solids, pilot-scale reactor for dilute-acid pretreatment of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 3-18, 1996.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. *Biomass and Bioenergy*, p.1-10, 2012.

HONG S. H.; LEE J. T.; LEE S.; WI S. G.; CHO E. J.; SINGH S.; LEE S. S.; CHUNG B. Y. Improved enzymatic hydrolysis of wheat straw by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 94, p. 231–235, 2014.

JIANG, L. Q.; FANG, Z.; LI, X. K.; LUO, J.; FAN, S. P. Combination of dilute acid and ionic liquid pretreatments of sugarcane bagasse for glucose by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 1942-1946, 2013.

JONES, J.; SEMRAU, K. Wood hydrolysis for ethanol production – Previous experience and the economics of selected processes. *Biomass*, v. 5, p. 109-135, 1984.

JONGLERTJUNYA, W.; MAKKHANON, W.; SIWANTA, T.; PRAYOONYOUNG, P. Dilute Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Butanol Fermentation. *Chiang Mai Journal of Science*, v. 41, p. 60-70, 2014.

JUAHÁSZ T.; SZENGUEL Z.; RÉCZEY K. Characterization of cellulases and hemicellulases profuced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 33, v. 188-203, 2014.

KAAR, W. E.; BRINK, D. L. Summative analysis of nine common. North American woods. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 11, p. 479-494, 1991a.

KAAR, W. E.; GOOL, L. G.; MERRIMAN, M. M.; BRINK, D. L. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 11, p. 447-463, 1991b.

KABEL M. A.; BOS G.; ZEEVALKING J.; VORAGENS A. G. J.; SCHOLS H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2034-2042, 2007.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by diluteacid hydrolysis. *Biomass Bioenerg*, v. 30, p. 247-253, 2006.

KARUNANITHY, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated in high shear bioreactor. In: ASABE Annual international meeting, Paper No. 084114, Rhode Island, June 29–July 2, 2008.

KATZEN, R.; MADSON, P. W.; MONCEAUX, D. A. Use of cellulosic feedstocks for alcohol production. The Alcohols Textbook, Nottingham University Press, p. 37-46, 1995.

KIM, S. B., LEE, Y. Y. Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. Bioresource Technology, v. 83, p. 165–171, 2002.

KLINKLE, H.B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxydation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. Biotechnology and Bioengineering, v. 81, p. 738-747, 2003.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. International Sugar Journal, v. 106, p.1263, 2004.

KOOSTRA, A. M. J.; SCOTT, H. H. B. E.; SANDERS, J. P. M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. Biochemical Engineering Journal, v. 46, p. 126-131, 2009.

KRISTENSEN, JAN BACH. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose Substrate interactions and high solids loadings. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark, 2009. Tese (Doutorado).

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J. e STROEVE. P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

LARIOS, G., GILBON, A., HUITRON, C. Sistema celulolítico extracelular de *Aureobasidium sp.* Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM México D.F. Curso de

Biotecnología de Enzimas Industriales. 16-19 October, Fundación CIEPE, Venezuela, 1984.

LARSSON, S.; QUINTANA-SAINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Biochemistry Biotechnology, v. 84, p. 617-632, 2000.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. Biomass Bioenergy, v. 23, p. 367–380, 2002.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. FEMS Yeast Research, v. 3, p. 133-140, 2003.

LEE, D.; YU, A. H. C.; WONG, K. K. Y. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 45, p. 407-415, 1994.

LEE, Y. H.; FAN, L. T. Properties and mode of action of cellulase. Advances in Biochemical Engineering, v. 17, p. 131-168, 1980.

LEE, D.; OWENS, V. N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD, 2007.

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

LIU, Z. H.; QIN L.; PANG F.; JIN, M. J.; LI, B. Z.; KANG Y.; DALEC, B. E. YUANA, Y. J. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 176-184, 2013.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57/58, p. 741–761, 1996.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. I. S. Pretorius, Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506-524, 2002.

LU, Y.; MOSIER, N. S. Biomimetic Catalysis for Hemicellulose Hydrolysis in Corn Stover. *Biotechnology Progress*, v. 23, p. 116-123, 2007.

LU X.; ZHANG Y.; ANGELIDAKI I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content, *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3048-3053, 2009.

MAHA, I. Preparation of cellulose and cellulose derivative azo compounds. *Cellulose*, v. 9, p. 337–349, 2002.

MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 98, p. 815-832, 2002.

MÄKI-ARVELA, P.; ANUGWOM, I.; VIRTANEN, P.; SJÖHOLM, R.; MIKKOLA, J. P. Dissolution of lignocellulosic materials and its constituents using ionic liquids – A review. *Industrial Crops and Products*, v. 32, p. 175–201, 2010.

MANZOOR A.; KHOKHAR Z. U.; HUSSAIN A.; UZMA; AHMAD S. A.; SUED Q. A.; BAIG S. Dilute sulfuric acid: a cheap acid for optimization of bagasse pretreatment, Science International (Lahore), v. 24, p. 41-45, 2012.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, p. 274–282, 2002.

MARTIN C.; ALRIKSSON B.; SJOSE A.; NILVEBRANT N. O.; JONSSON L. J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agroindustrial residues for ethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 140, p. 339–352, 2007.

MARTÍN, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis quitosana. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007. Dissertação (Mestrado).

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. Enzymatic conversion of biomass for fuel production. American Chemical Society, p. 292-323, 1993.

MENON, V.; RAO, M.. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Process in Energy and Combustion Science, v. 38, p. 522-550, 2012.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; CARA, C.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; Mussatto, S. I. An approach to aptimization of enzymatic hydrolisys from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 85, p. 1092-1098, 2010.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Current Opinion in Microbiology, v. 4, p. 324-325, 2001.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONAVARI, S.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Impact of impregnation time and chip size on sugar yield in pretreatment of softwood for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6312–6316, 2009.

MOOD S. H.; GOLFESHAN A. H.; TABATABAEI M.; JOUZANI G. S.; NAJAFI G. H.; GHOLAMI M.; ARDJMAND M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOREIRA NETO, J. Modelagem Matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2011. Dissertação (Mestrado).

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., DRESCHER, R., *et al.* Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production, Paper 103, BIOT Division, 225th American Chemical Society Meeting, New Orleans, March, 2003.

MOSIER, N.; WYMAN, C. E.; DALE, B. D.; ELANDER, R. T.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R.. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.98/100, p. 49–58, 2002.

OLIVÉRIO, J. L.; HILST, A. G. P. DHR-Dedini Hidrólise Rápida – Revolutionary Process for Producing Alcohol from Sugar Cane Bagasse, XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, Janeiro/fevereiro, 2005.

OLSSON, L.; JORGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol production from lignocellulosic material. In: Polysaccharides Structural Diversity and Functional Versatility. S. Dimitriu (Ed), Marcel Dekker, New York, p. 957-993, 2005.

PATHAK, A. N., GHOSE, T. K. Cellulases-1. Sources technology. Process Biochemistry, v. 8, p. 35-38, 1973.

PENG, Y.; WU, S. The structural and thermal characteristics of wheat straw hemicelluloses. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, v. 88, p. 134-139, 2010.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. Biotechnology Advances, v. 30, p. 879-903, 2012.

PÉREZ, J.; MUNHÖZ-DORADO, J.; De-la-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. International Microbiology, v. 5, p. 53-63, 2002.

PORDESIMO, L. O.; RAY, S. J.; BUSCHERMOHLE, M. J.; WALLER, J. C.; WILKERSON, J. B.. Processing cotton gin trash to enhance in vitro dry matter digestibility in reduced time. Bioresource Technology, v. 96, p. 47-53, 2005.

QI B.; CHEN X.; WANA Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production, Bioresource Technology, v. 101, p. 4875-4883, 2010.

QURESHI, N.; MANDERSON, G. Bioconversion of renewable resources into ethanol: An economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation, and membrane technologies. Energy Sources, v. 17, p. 241-265, 1995.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2010. Tese (Doutorado).

RABELO, S. C.; ROSSEL, C. E. V.; ROCHA, G. J. M.; ZACCHI, G. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by steam pretreatment impregnated with hydrogen peroxide. *Biotechnology Progress*, v. 28, p. 1207–1217, 2012.

RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S. E.; BOLOBOBA, A. V. Microbial celulasas (review). *Applied Biochemistry Microbiology*, v. 38, p. 305-321, 2002.

RILEY, C. Bioethanol: A renewable transportation fuel from biomass. In *AICHE SPRING CONFERENCE*, 2002.

RITTER, S. K. Lignocellulose: A complex biomaterial. *Plant Biochemistry*, v. 86, p. 15, 2008.

RIVERS, D. B.; EMERT, G. H. Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnological Letters*, v. 9, p. 365-368, 1987.

RIVERS, D. B.; EMERT, G. H. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 278-281, 1988.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROCHA M. V. P.; RODRIGUES T. H. S.; ALBUQUERQUE T. L.; GONÇALVES L. R. B.; MACEDO G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 243, p. 234-243, 2014.

SAHA, B. D. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANCHEZ, J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresources Technology*, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

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

SASAKI M.; ADSCHIRI T.; ARAI K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 301–304, 2003.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v. 61, p. 263–289, 2010.

SHERARD, E.; KRESSMAN, F. Review of processes in the United States prior to World War II. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 37, p. 5-8, 1945.

SHUSHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria prima?. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. SCARLATA, C.; SLUITER, J. TEMPLETON, D.. Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), p. 1-12, 2005.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. SCARLATA, C.; SLUITER, J. TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), p. 1-16, 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. SCARLATA, C.; SLUITER, J. TEMPLETON, D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. National Renewable Energy Laboratory (NREL), p. 1-14, 2008b.

SOCOL, C. R.; FARACO, V.; KARP, S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAS-SOCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process, p. 101-122, 2010.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, p. 35-53, 1976.

SUN, R. C.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J. Characterization and esterification of hemicelluloses from rye straw. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 18, p. 1247–1252, 2000.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: A review. Bioresource Technology, v.83, p.1-11, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology, v. 96, p. 1599–1606, 2005.

SUN, N.; RAHMAN, M.; QIN, Y.; MAXIM, M. L.; RODRIGUEZ, H.; ROGERS, R. D. Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. Green Chemistry, v. 11, p. 646–655, 2009.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Conversion of dilute-acid hydrolysates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. Bioresource Technology, v. 69, p. 59-66, 1999.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, v. 2, p. 472-499, 2007.

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

TAKASHIMA, S.; IIKURA, H.; NAKAMURA, A.; HIDAKA M.; MASAKI H.; UOZUMI, T. Overproduction of recombinant *Trichoderma reesei* cellulases by *Aspergillus oryzae* and their enzymatic properties. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 163-171, 1998.

TEIXEIRA L. C.; LINDEN J. C.; SCHROEDER H. A. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 111-127, 2000.

VIDAL Jr., B. C.; DIEN, B. S.; TING, K. C.; SINGH V. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion - A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, p. 1405-1421, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 86, p. 88-95, 2004.

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

YANIK, J.; EBALE, A.; KRUSE, A.; SAGLAM, M.; YÜKSEL, M. Biomass gasification in supercritical water: II. Effect of catalyst. *Fuel*, v. 86, p. 2410–2415, 2007.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Tibtech*, v. 17, p. 482-487, 1999.

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 157, p. 174–209, 2009.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in enzymology*. California: Academic Press, v. 160, p. 87-116, 1988.

WYMMAN, C. E. Handbook on Bioethanol: Production and utilization: Washington DC: Taylor e Francis, 1996.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities and Comercial Challenges. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 24, p. 189-226, 1999.

ZENG, M.; MOSIER, N. S.; HUANG, C. P.; SHERMAN, D. M.; LADISCH, M. R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 265-278, 2007.

ZHANG, Y. H. P, LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioenergy*, v. 88, p.797-824, 2004.

ZHANG, H.; WU, J.; ZHANG, J.; HE, J. 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: a new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose. *Macromolecules*, v. 38, p. 8272–8277, 2005.

ZHAO X.; PENG F.; CHENG K.; LIU D. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 44, p. 17-23, 2009.

ZHBANKOV, R. G. Hydrogen bonds and structure of carbohydrates. *Journal of Molecular Structure*, v. 270, p. 523–539, 1992.

ZHENG, M.; MOSIER, N. S.; HUANG, C. P.; SHERMAN, D. M.; LADISCH, M. R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioenergy*, v. 97, p. 265-278, 2007.

ZHONG W.; ZHANG Z.; LUO Y.; SUN S.; QIAO W.; XIAO M. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*, v. 102, p 11177–11182, 2011.

ZHU, W.; ZHU, J. Y.; GLEISNER, R.; PAN, X. J. On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2782-2792, 2010.

APENDICE I

Nesta seção é apresentado os cálculos realizados para os rendimentos do licor de pré-tratamento, conversão de açúcares na hidrólise enzimática e rendimento global.

Rendimento de pentoses no licor de pré-tratamento:

$$\text{Rend. pentoses (\%)} = \frac{m_{\text{xilose licor (g)}} + m_{\text{arabinose licor (g)}}}{m_{\text{xilana inicial (g)}}} \times 0,88 \times 100$$

Rendimento de glicose no licor de pré-tratamento:

$$\text{Rend. glicose (\%)} = \frac{[(m_{\text{celobiose licor (g)}} \times 0,95) + (m_{\text{glicose licor (g)}} \times 0,90)]}{m_{\text{glicana inicial (g)}}} \times 100$$

Recuperação de pentoses no licor baseada na porcentagem de hemiceluloses solubilizadas no pré-tratamento:

$$\text{Recup. pentoses (\%)} = \frac{\text{Rendimento pentoses licor (monômero+oligômero) (\%)}}{\text{Solubilização hemicelulose P.T. (\%)}} \times 100$$

Conversão de celulose na hidrólise enzimática:

$$\text{Conversão celulose (\%)} = \frac{\text{massa glicose hidrolisado enzimático (g)}}{\text{massa glicana bagaço pré-tratado (g)}} \times 0,9 \times 100$$

Conversão de hemiceluloses na hidrólise enzimática:

$$\text{Conversão hemicelulose (\%)} = \frac{\text{massa xilose hidrolisado enzimático (g)}}{\text{massa xilana bagaço pré-tratado (g)}} \times 0,88 \times 100$$

Rendimento global celulose:

$$\text{Rend. global cel. (\%)} = \frac{\text{m glicose hidrolizado enzimático (g)} \times 0,9}{\text{m glicana bag. P.T. (g)} \times \text{celulose bag. bruto (\%)}} \times 100$$

Os fatores de conversão usados para os monômeros de glicose (0,9) e xilose (0,88) são usados serem expressos na forma de açúcares poliméricos, glicana e xilana, respectivamente. Sendo:

$$\text{Xilana} = \text{Xilose} \times \frac{132,1}{150,1}$$

$$\text{Glicana} = \text{Glicose} \times \frac{162,2}{180,2}$$