



**LILIANE PIRES ANDRADE**

**“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MATÉRIA-PRIMA  
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A  
PARTIR DE BAGAÇO DE CANA”**

**CAMPINAS  
2014**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

LILIANE PIRES ANDRADE

**“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA MATÉRIA-PRIMA  
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A  
PARTIR DE BAGAÇO DE CANA”**

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

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA LILIANE PIRES ANDRADE  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Rubens Maciel Filho", is written over a horizontal line. Below the line, the name "Prof. Dr. Rubens Maciel Filho" is printed in a small, sans-serif font.

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

CAMPINAS  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

An24e Andrade, Liliane Pires, 1985-  
Estudo da influência da matéria-prima no processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana / Liliane Pires Andrade. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rubens Maciel Filho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bioetanol. 2. Pré-tratamento. 3. Bagaço de cana. 4. Hidrólise enzimática. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the influence of raw material in the ethanol production process from sugarcane bagasse

**Palavras-chave em inglês:**

Bioethanol  
Pretreatment  
Sugarcane bagasse  
Enzymatic hydrolysis

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Químicos

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

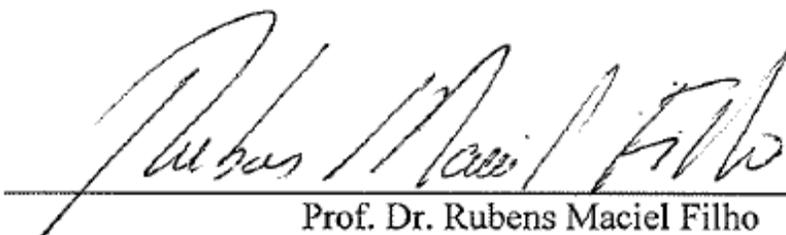
Rubens Maciel Filho [Orientador]  
Sarita Cândida Rabelo  
Mylene Cristina Alves Ferreira Rezende

**Data de defesa:** 07-10-2014

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

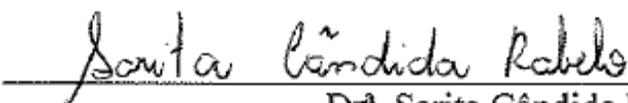
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado defendida por Liliane Pires Andrade e aprovada em 07 de outubro de 2014, pela banca constituída pelos doutores:



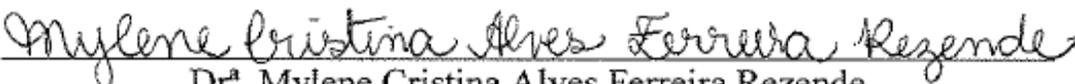
---

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho  
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



---

Dr.ª Sarita Cândida Rabelo  
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



---

Dr.ª Mylene Cristina Alves Ferreira Rezende  
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



## RESUMO

No cenário mundial atual, a procura por combustíveis e outros químicos desenvolvidos a partir de tecnologias sustentáveis tem se tornado uma demanda crescente. Neste contexto, diversas biomassas são investigadas ao redor do mundo, como matérias-primas para a produção de etanol de segunda geração que é considerado um biocombustível com grande potencial para substituir gradativamente os combustíveis fósseis. Estudos direcionados à produção de etanol celulósico demonstram que alterações simultâneas em importantes parâmetros, como tempo de pré-tratamento e teor de sólidos na hidrólise enzimática, influenciam diretamente no rendimento final do processo. O presente trabalho teve por objetivo estudar a influência da matéria-prima, por meio da coleta do bagaço de cana de açúcar em diferentes períodos da safra, no processo de produção de etanol. Para isso, foram avaliadas as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação com ênfase na otimização da hidrólise enzimática. A execução foi dividida em três etapas. Na primeira, o bagaço de cana foi submetido a diferentes tempos de pré-tratamento (severidades na faixa de 4,01 a 4,10) por explosão a vapor em escala piloto. Em seguida, a biomassa pré-tratada resultante foi hidrolisada enzimaticamente, utilizando teores de sólidos, nesta etapa, de 8% e 12%, 0,5% de surfactante (p/p-TS), baixa carga da enzima Cellic CTec2 (5FPU/g-celulose), temperatura de 50°C e tempo de 48h. A fermentabilidade dos caldos obtidos foi testada, usando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A condição de pré-tratamento com severidade de 4,01 foi a que apresentou melhores resultados em todas as etapas e a escolhida para a continuidade deste trabalho. Na segunda etapa do trabalho, as variáveis teor de sólidos, carga enzimática e teor de surfactante da hidrólise enzimática foram investigadas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para identificar as regiões ótimas de processo através das superfícies de resposta. Novamente a fermentabilidade dos caldos obtidos foi testada, usando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e suplementando o meio com melaço. Por meio da validação do modelo estatístico determinou-se a condição otimizada para realizar a hidrólise enzimática, 12% de teor de sólidos e 6 FPU/g-celulose de Cellic CTec2. Na terceira etapa a variabilidade da matéria prima foi avaliada utilizando o pré-tratamento determinado na primeira etapa e a hidrólise otimizada na segunda. Foi possível concluir que as variações na composição do bagaço “in natura” não interferem no resultado final, que é a composição do caldo hidrolisado

obtido, demonstrando que este é um processo com características robustas, ou seja, que o resultado final não é influenciado pelas flutuações nas características da matéria-prima utilizada.

Palavras chaves: Bioetanol de 2ª geração; efeito da matéria-prima; explosão a vapor, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

In the current global scenario, the demand for fuels and other chemicals developed from sustainable technologies has become an increasing demand. In this context, various biomasses are investigated around the world, as raw materials for the production of second generation ethanol, a biofuel that is regarded with great potential to gradually replace fossil fuels. Studies directed to produce cellulosic ethanol demonstrate that simultaneous changes in key parameters such as time of pre-treatment and solids content in the enzymatic hydrolysis directly influence the final yield of the process. The present work aims to study the influence of the raw material, through the gathering of sugarcane bagasse in different harvest periods in the ethanol production process. To that, the steps of pre-treatment, enzymatic hydrolysis and fermentation with emphasis on optimizing enzymatic hydrolysis were evaluated. This study was divided into three steps. In the first sugarcane bagasse was pretreated by steam explosion in pilot scale with different times of pretreatment (severities in the range of 4.01 to 4.10). Then, the resulting pretreated biomass was hydrolyzed enzymatically, using solids content of 8% and 12%, and 0.5% of surfactant (w / w, TS), low enzyme load Cellic CTec2 (5FPU / g -cellulose), temperature of 50 ° C and time of 48 hours. The fermentability of the hydrolysates obtained was tested, using the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The condition of pretreatment severity of 4.01 showed the best results at throughout the process and it was chosen to continue this work. In the second step, enzymatic hydrolysis, the variables, solids content, enzyme loading and surfactant content were investigated using a central composite rotational design (CCRD) to identify the optimal process regions through response surfaces. Again fermentability of the hydrolysates obtained were tested using the *Saccharomyces cerevisiae* yeast and the medium was supplemented with molasses. By the statistical validation of the model, the optimized condition for enzymatic hydrolysis was determined, this is 12% solids and 6 FPU / g cellulose Cellic CTec2. In the third step the raw material variability was evaluated by pretreatment determined in the first step and the optimized hydrolysis determined in the second step. It was concluded that variations in the composition of the sugarcane bagasse does not interfere in the final result, that is the composition of the

hydrolyzate obtained, demonstrating that this is a robust process, ie, the result is not influenced by the variations in the characteristics of the used feedstock.

**Key words:** 2nd generation bioethanol; effect of the raw material; steam explosion, enzymatic hydrolysis.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Organização do trabalho.....	3
1.3. Principais contribuições deste trabalho .....	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1. A cana-de-açúcar .....	7
2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar .....	9
2.2. Biomassa Lignocelulósica .....	11
2.2.1. Celulose .....	14
2.2.2. Hemiceluloses.....	16
2.2.3. Lignina.....	17
2.2.4. Outros Compostos: Extrativos e Cinzas .....	18
2.3. Processo para Produção de Etanol a Partir de Biomassa Lignocelulósica .....	19
2.3.1. Pré-Tratamento da Biomassa Lignocelulósica .....	20
2.3.1. 1. Pré-Tratamento por Explosão a Vapor .....	25
2.5. Hidrólise da Biomassa Lignocelulósica .....	28
2.5.1. Hidrólise Enzimática .....	28
2.6. Detoxificação de Caldos Hidrolisados .....	34
2.7. Fermentação de Caldos Hidrolisados .....	37
2.8. Comentários Finais .....	39
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	41
3.1. Materiais .....	42
3.1.1. Reagentes.....	42
3.1.2. Equipamentos .....	43
3.1.3. Matéria Prima .....	44
3.1.4. Enzima.....	44
3.2. Procedimento Experimental .....	44

3.2.1. Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	44
3.2.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar .....	45
3.2.3. Caracterização do Bagaço Pré-tratado.....	47
3.2.4. Atividade Enzimática .....	48
3.2.5. Hidrólise Enzimática da Celulose do Bagaço Pré-tratado.....	48
3.2.6. Detoxificação do Caldo Hidrolisado .....	49
3.2.7. Fermentação do Caldo Hidrolisado .....	49
3.2.7.1. Fermentação Suplementada com Glicose e Nutrientes. ....	49
3.2.7.2. Fermentação Suplementada com Melaço.....	50
3.2.8. Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática do Bagaço Pré-tratado .....	51
3.2.9. Análises .....	51
3.2.9.1. Determinação da concentração de glicose.....	51
3.2.9.2. Determinação da concentração de Glicose, Frutose, Glicerol, Ácido Acético e Etanol. .	52
3.2.9.3. Determinação da concentração de Glicose, Frutose, Arabinose e Xilose. ....	52
3.2.9.4. Determinação da concentração de Furfural e HMF.....	53
3.2.10. Análise Estatística dos Resultados. ....	53
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
4.1. Escolha da Condição de Pré-tratamento.....	55
4.2. Determinação da Condição de Hidrólise Enzimática da Celulose. ....	62
4.2.1. Análise Estatística da Conversão e Concentração de Glicose dos Caldos Hidrolisados.....	68
4.2.1.1. Validação Experimental dos Modelos Estatísticos Determinados para Conversão e Concentração de Glicose dos Caldos Hidrolisados. ....	73
4.2.2. Análise Estatística das Concentrações de Ácido Acético, Furfural e HMF dos Caldos Hidrolisados.....	75
4.2.3. Detoxificação dos Caldos Hidrolisados obtidos no Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática. ....	79
4.2.4. Fermentação dos Caldos Hidrolisados obtidos no Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática. ....	81
4.3. Análise da Influência da Variabilidade da Matéria-Prima no Processo de Produção de Etanol. ....	84

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	91
5.1. Sugestões Para Trabalhos Futuros .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93



Dedico este trabalho aos  
meus pais, Sueli e José Maria,  
com muito amor e carinho.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela fé e coragem em sempre lutar pelos meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, Sueli e José Maria pela dedicação, pela caminhada, pela luta, pela lida. Agradeço pela vida, pelos ensinamentos, pelos sermões, e principalmente pelos exemplos, eles são valiosíssimos! Agradeço pelos agrados e principalmente pelos desagradados, assim eu pude ver que na vida, nem tudo é como a gente quer, aprendi a ter limites, a ser mais gente. Agradeço e me desculpo pelas preocupações. Aprendi com vocês a ter coragem, a não desanimar, a saborear a vitória. Obrigada por tudo que vocês planejaram e fizeram, por tudo que planejaram e não fizeram e pelo que fizeram sem planejar. Amo vocês!

Meu muito obrigado ao Prof. Dr. Rubens Maciel Filho pela orientação, aprendizado, paciência e exemplo de dedicação e amor ao que faz.

Agradeço a minha irmã Barbara, e a toda a minha família, avós, tias, tios, primas e primos, que mesmo estando distantes me proporcionaram estímulo, apoio e confiança.

Agradeço ao meu querido namorado Rodolfo pelo apoio, amor e compreensão.

Agradeço aos meus amigos Adriana e José Augusto, que me acolheram quando cheguei a Piracicaba e que considero como parte da minha família, pelo apoio, conselhos, e por todo o suporte que me deram.

Agradeço as amigas Graciela e Karina pelos conselhos, incentivos pessoais e também pela ajuda, dando-me confiança de estar indo pelo caminho correto.

Agradeço a todos os amigos que fiz enquanto estive cursando as disciplinas na UNICAMP, denominada Patota, entre eles: Aline Martin, Aline Roberta, Camila, Fernando, Filipe, Glazieli, João Vilela, Luiz, Paula, Rafaela, Rafael Perna, Rafael Tadeu, e Valter por tornarem meus dias mais alegres e por tudo que compartilhamos.

Agradeço aos amigos do CTC, Alberto, Alexandra, Danilo, Ivo, Luciano, Nilton, Rafael, Sérgio e Veridiana, pelo suporte no decorrer da realização deste trabalho, pela amizade e disposição de tornar o nosso local de trabalho um ambiente agradável, palco de muito trabalho e alegrias.

A Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Araújo Galvão e a Dr<sup>a</sup>. Juliana Conceição Teodoro pelo suporte técnico no decorrer da realização deste trabalho.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Carvalho da Costa e ao Prof. Dr. Rafael Ramos de Andrade pela ajuda com os ensaios de fermentação e nas análises de HPLC.

Ao CTC por ter confiado e investido no meu desenvolvimento, meu muito obrigado.

À Empresa Novozymes Latin America Ltda, pelo fornecimento das enzimas utilizadas neste trabalho.

À Usina Iracema, pelo fornecimento do bagaço de cana-de-açúcar.

A todos aqueles que infelizmente não estão escritos aqui, mas que com seu auxílio e colaboração, tornaram possível a realização desse trabalho.

**Muito obrigada!**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar (BNDES e CGEE, 2008). .....	8
Figura 2.2: Composição aproximada do bagaço de cana-de-açúcar (Fonte: Dados CTC).....	10
Figura 2.3: Estrutura dos materiais lignocelulósicos. (Adaptado de RUBIN, 2008) .....	12
Figura 2.4: Estrutura da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL e WEGENER,1989). .....	14
Figura 2.5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (RABELO, 2010). .....	15
Figura 2.6: Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses. (FENGEL e WEGENER, 1989). .....	17
Figura 2.7: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).....	18
Figura 2.8: Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (Fonte: US Department of Energy Genome Programs <a href="https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Pretreatment_-_original.jpg">https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Pretreatment_-_original.jpg</a> ) .....	21
Figura 2.9: Formação dos componentes inibitórios (Adaptado de CHANDEL; SILVÉRIO; SINGH, 2011).....	24
Figura 2. 10: Representação esquemática da hidrólise da celulose em glicose por enzimas celulolíticas (Adaptado de TAHERZADEH; KARIMI, 2007). .....	30
Figura 3.1: Fluxograma das etapas do desenvolvimento do trabalho. ....	41
Figura 3.2: Reator de pré-tratamento “Steam Explosion” .....	46
Figura 4.1: Balanço de massa para a celulose após pré-tratamento em escala piloto. ....	58
Figura 4.2: Balanço de massa para a hemicelulose após pré-tratamento em escala piloto. ....	59
Figura 4.3: Conversões obtidas nos experimentos de hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima Cellic CTec2. Condições experimentais: pH 4,8 (solução tampão citrato de sódio 100mM), 50°C e tempo total de 48 horas.....	65

Figura 4.4: Concentrações de glicose alcançadas em 48 horas nos experimentos do DCCR da hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima Cellic CTec2.....	66
Figura 4.5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a conversão obtida na hidrólise enzimática em função da concentração de enzima e teor de sólidos (a) e (b).....	70
Figura 4.6: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração e glicose presente no caldo hidrolisado em função da concentração de enzima e teor de sólidos (a) e (b).....	72
Figura 4.7: Balanço de massa para a celulose após pré-tratamento em escala piloto. ....	88
Figura 4.8: Balanço de massa para a hemicelulose após pré-tratamento em escala piloto. ....	89
Figura 4.9: Conversões e concentrações de glicose obtidas nos experimentos de hidrólise enzimática, para determinar a variabilidade da matéria prima. Condições experimentais: 12% TS, 6FPU/g-celulose (Cellic CTec 2), pH 5,0; 50°C e 48h. ....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição química de materiais lignocelulósicos com potencial para produção de etanol de segunda geração .....	13
Tabela 2.2: Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos (Adaptado de SANTOS et al., 2012). .....	23
Tabela 2. 3: Métodos de detoxificação para hidrolisados de bagaço de cana de açúcar (Adaptado de CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010) .....	36
Tabela 4.1: Condições e severidades de pré-tratamento por explosão a vapor em escala piloto. .	55
Tabela 4.2: Análise composicional dos bagaços “in natura” e pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos insolúveis.....	56
Tabela 4.3: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos solúveis. ....	57
Tabela 4.4: Conversões obtidas nas reações de hidrólise enzimática de bagaços pré-tratados em escala piloto com teores de sólidos de 8% e 12%, carga enzimática de 5FPU/g-celulose, 0,5%Surfactante/-TS e 48 horas totais de reação (experimentos realizados em duplicata). .....	60
Tabela 4.5: Dados experimentais e rendimentos obtidos em ensaios de fermentação de caldos hidrolisados suplementados com glicose, em <i>shaker</i> (frascos agitados) a 32°C, pH 5,0 e tempo total de 10 horas. Concentração inicial de substrato, 160g/L. Meio padrão (“Branco”) e cultivos suplementados com glicose. ....	61
Tabela 4.6: Valores utilizados no DCCR para as três variáveis. ....	63
Tabela 4.7: Matriz de planejamento completo codificado para a hidrólise enzimática. ....	64
Tabela 4.8: Concentrações de HMF, Furfural e Ácido Acético encontradas nos caldos hidrolisados finais dos experimentos do DCCR.....	67
Tabela 4. 9: Coeficientes de regressão para a conversão obtida na hidrólise enzimática. ....	68
Tabela 4. 10: Análise de variância (ANOVA) para a conversão obtida na hidrólise enzimática. ....	69
Tabela 4.11: Coeficientes de regressão para a concentração e glicose presente no caldo hidrolisado. ....	71
Tabela 4.12: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose presente no caldo hidrolisado. ....	72

Tabela 4. 13: Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para a validação dos modelos.....	74
Tabela 4. 14: Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo de processo. ....	74
Tabela 4.15: Coeficientes de regressão para a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado. ....	75
Tabela 4.16: Coeficientes de regressão para a concentração de furfural presente no caldo hidrolisado. ....	76
Tabela 4.17: Coeficientes de regressão para a concentração de HMF presente no caldo hidrolisado. ....	76
Tabela 4.18: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado. ....	77
Tabela 4.19: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de furfural presente no caldo hidrolisado. ....	77
Tabela 4.20: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de HMF presente no caldo hidrolisado. ....	78
Tabela 4.21: Concentrações de glicose e compostos inibidores da fermentação nos caldos hidrolisados sem/com detoxificação.....	80
Tabela 4.22: Composição do melaço utilizado nos experimentos de fermentabilidade.....	82
Tabela 4.23: Dados experimentais e rendimentos obtidos em ensaios de fermentação de caldos hidrolisados suplementados com melaço, em regime batelada a 32°C, pH 5,0 volume de reação 180 mL e tempo de 10 horas. Concentração inicial de substrato aproximadamente 175g/L. ....	82
Tabela 4.24: Análise composicional dos bagaços “in natura”.....	85
Tabela 4.25: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos insolúveis. ....	86
Tabela 4.26: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos solúveis. ....	87

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

**Martin Luther King**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

**Isaac Newton**



## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A iminente escassez das reservas de petróleo, principal fonte energética mundial, juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, são os principais motivos que levaram os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis.

Um dos principais objetivos do uso dos biocombustíveis é a substituição de combustíveis fósseis, permitindo a diminuição da dependência por recursos não renováveis e a redução das emissões de gases de efeito estufa. A queima de combustíveis fósseis representa aproximadamente 82% das emissões dos gases causadores do efeito estufa. Portanto, seja pela questão ambiental global, seja pela importância em reduzir a dependência externa de energia, o bioetanol de cana-de-açúcar, que já apresenta indicadores ambientais muito positivos quando comparado a outras opções, representa uma alternativa potencialmente viável na substituição de combustíveis fósseis (IPCC, 2014; SINGH et al., 2010).

O bioetanol pode ser misturado com a gasolina ou usado como um único combustível, utilizando motores dedicados. Além disso, o bioetanol tem um maior calor de vaporização e índice de octanagem em relação à gasolina. O etanol já é misturado com gasolina e estudos realizados pelos fabricantes de veículos resultaram que estes podem usar uma mistura de até 85% de etanol com 15% de gasolina. Na verdade, a gasolina pode usar o bioetanol como combustível oxigenado para aumentar seu conteúdo de oxigênio, causando a melhor oxidação dos hidrocarbonetos e diminuindo gases de efeito estufa (HAGHIGHI MOOD et al., 2013). O etanol não só reduz a dependência das importações de petróleo e as incertezas causadas pelas flutuações do preço do mesmo, mas também assegura a redução de problemas relacionados à poluição ambiental devido ao aspecto sustentável sugerido por sua rota de produção (HUANG et al., 2008). Vale a pena ressaltar que com o emprego dos motores flex qualquer proporção de mistura de etanol com gasolina, ou mesmo o uso destes combustíveis puros é possível. Além disso, deve ser levado em conta que a gasolina brasileira disponível para o consumidor final já possui um teor aproximado entre 22 e 25 % de etanol.

Diante deste cenário, o bioetanol passou a constar de forma definitiva na agenda dos governos e das políticas de praticamente todos os países. Sua utilização não está apenas restrita

ao combustível, mas incorpora também o etanol de grau químico como fonte de matéria-prima para a fabricação de produtos químicos levando à redescoberta da alcoolquímica (SILVA, 2009).

No Brasil, o etanol é majoritariamente produzido a partir da cana-de-açúcar. No entanto, apesar do grande potencial de utilização de todas as frações (caldo, bagaço e palha) que constituem esta gramínea, apenas o caldo tem sido eficientemente utilizado para produção do etanol. Segundo, SOARES e ROSSELL (2007), o país possui uma condição propícia para o uso do bagaço da cana, pelo fato de o bagaço já estar disponível de uma forma razoavelmente limpa, em grande quantidade e concentrada ao lado das usinas de açúcar e álcool, o que torna o bagaço da cana uma fonte atrativa para produção de energia e conversão em produtos químicos, em especial o etanol.

O processo de produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas compreende, principalmente, as seguintes etapas: 1) pré-tratamento (físico, químico ou físico-químico) da biomassa; 2) hidrólise (ácida ou enzimática) das frações de celulose e hemicelulose; 3) fermentação dos açúcares produzidos nas etapas anteriores e 4) separação/purificação do etanol produzido.

Conforme ALVIRA et al. (2010), as características estruturais e composicionais da biomassa tornam imprescindível uma etapa prévia de tratamento com vistas a disponibilizar adequadamente a fração de celulose à etapa posterior de hidrólise enzimática, onde, efetivamente, são produzidos os monossacarídeos fermentescíveis. Esta etapa, denominada de pré-tratamento, ainda é, contudo, uma tarefa tecnicamente complexa, pois quebrar a estrutura da lignina e destruir a estrutura cristalina da celulose, de modo a disponibilizar maior área possível desta fração às enzimas celulolíticas, não é uma tarefa simples e pode associar custos impactantes no processo, além de influenciar a sustentabilidade.

Deve-se ressaltar que inúmeras variáveis influenciam no desenvolvimento do processo de conversão da celulose por rota enzimática, dentre elas, podem-se citar: o tempo reacional, a temperatura e o pH do meio, a concentração do biocatalisador (enzima), o teor de sólidos secos, a presença de surfactante e a variabilidade da matéria-prima.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar e definir condições de pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor em escala piloto, que maximize a hidrólise enzimática da celulose; avaliar a influência da variabilidade da matéria-prima no

rendimento global do processo de produção de etanol celulósico e definir uma condição ótima de processo de sacarificação enzimática empregando metodologia estatística.

## 1.1. Objetivos

O objetivo global deste trabalho é investigar a influência da matéria-prima, bagaço de cana-de-açúcar pelo uso de amostras obtidas em diferentes épocas do ano e devidamente caracterizadas, no processo de produção de etanol. Em especial, foram avaliadas as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação com ênfase na otimização da hidrólise enzimática.

Para isso, as seguintes etapas, que constituem os objetivos específicos, foram realizadas:

- Análise do bagaço de cana-de-açúcar em relação a sua composição química;
- Estudo das condições de pré-tratamento por explosão a vapor;
- Otimização das condições de hidrólise enzimática, isto é, teor de sólidos, concentração enzimática e concentração de surfactante;
- Detoxificação e fermentação dos caldos obtidos para avaliar a produção de etanol;
- Avaliação sazonal da matéria-prima, para a melhor condição determinada.

## 1.2. Organização do trabalho

O Capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, apresenta os principais conceitos sobre a composição química da cana-de-açúcar. Além disso, revisa os tipos de pré-tratamento mais utilizados, bem como apresenta uma revisão sobre as enzimas celulasas e sobre a conversão da celulose. Uma revisão dos principais trabalhos consultados, tanto na análise do pré-tratamento quanto na hidrólise enzimática, também foi apresentada. A conversão da biomassa a etanol também foi abordada.

No Capítulo 3, “Metodologia Experimental”, é apresentada a descrição detalhada da parte experimental.

São apresentados no Capítulo 4, “Resultados e Discussões”, os dados experimentais obtidos em cada análise, além dos resultados das análises estatísticas com as observações pertinentes.

Por fim, no Capítulo 5, “Conclusões e Sugestões para Próximos Trabalhos”, encontra-se a conclusão do trabalho, com destaque para o aprendizado e experiência adquirida, além de sugestões para trabalhos futuros.

### **1.3. Principais contribuições deste trabalho**

No desenvolvimento deste trabalho, destacam-se as seguintes contribuições:

Determinação de uma condição de pré-tratamento dentro da faixa estudada que permitisse um melhor aproveitamento de todas as frações da biomassa lignocelulósica utilizada (bagaço de cana-de-açúcar). A condição A (pressão de  $17 \text{ kgf/cm}^2$ ,  $t_1 = 5 \text{ min}$  e  $t_2 = 8 \text{ min}$ ) foi definida como a melhor e seus resultados apresentaram alto nível de recuperação global de hemicelulose, com conseqüente baixa formação de compostos de degradação como furfural, assim como recuperação global de celulose de aproximadamente 95%, o que indica que esta fração foi preservada, uma característica desejável quando se deseja produzir etanol a partir de biomassas. Na hidrólise enzimática, o caldo obtido com o bagaço pré-tratado, nesta condição, foi aquele com conversão de celulose em glicose mais elevada, tanto para ensaios realizados com 8% quanto com 12% (m/m) de sólidos. Para os demais bagaços pré-tratados, conversões similares foram atingidas. A fermentabilidade de todos os caldos obtidos foi avaliada com meio sintético e foi satisfatória, atingindo-se rendimentos semelhantes aos observados para o ensaio em branco, na média, em torno de 90%.

Para determinar uma condição de hidrólise enzimática otimizada, foi utilizada metodologia estatística que evidenciou que a relação da concentração de glicose na hidrólise está diretamente associada ao teor de sólidos no reator enquanto a conversão de celulose em glicose tem relação mais estreita com a carga enzimática. Também foi mostrado que a concentração dos potenciais inibidores do processo fermentativo esta diretamente relacionada ao teor de sólidos, justificando a necessidade de uma etapa de detoxificação dos caldos hidrolisados. A validação

dos modelos determinados pelo planejamento experimental para conversão e concentração de glicose confirmaram a vantagem de utilizar esta ferramenta para a otimização de processos em busca de maior produtividade, possibilitando a determinação da melhor condição de hidrólise enzimática dentro da faixa investigada, a saber, teor de sólidos de 12% e carga enzimática de 6 FPU/g-celulose de Cellic CTec2.

O processo de detoxificação investigado neste trabalho não possibilitou uma redução significativa na concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado. Entretanto pode-se ressaltar que não houve perda expressiva na concentração de glicose e que este método era baseado numa operação unitária já existente no ambiente industrial da usina: o processo de clarificação utilizado na produção de açúcar. Além disso, mesmo não removendo o ácido acético este método por ter sido eficiente para remover outros compostos não avaliados que poderiam interagir sinergicamente com o ácido acético e causar maior inibição do processo fermentativo. Os resultados obtidos na fermentação dos caldos hidrolisados corroboram com esta hipótese, uma vez que, grande semelhança com os ensaios padrão foi observada, indicando que os rendimentos de fermentação inferiores a 90% não tinham relação direta com a presença de inibidores no caldo hidrolisado utilizado na composição do mosto.

O principal objetivo deste trabalho foi alcançado ao se constatar que as variações na entrada do processo, ou seja, a composição do bagaço “in natura” não interfere no resultado final, que é a composição do caldo hidrolisado obtido, demonstrando que este é um processo com características robustas.



## CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, ou seja, melhor assimilação da energia solar, tendo assim maior produtividade de biomassa no processo de fotossíntese, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana, como mostrado na Figura 2.1. Todos esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare (BNDES e CGEE, 2008).

Acredita-se que a cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia, Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Posteriormente, disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial regiões tropicais e subtropicais (SILVA, 2009).

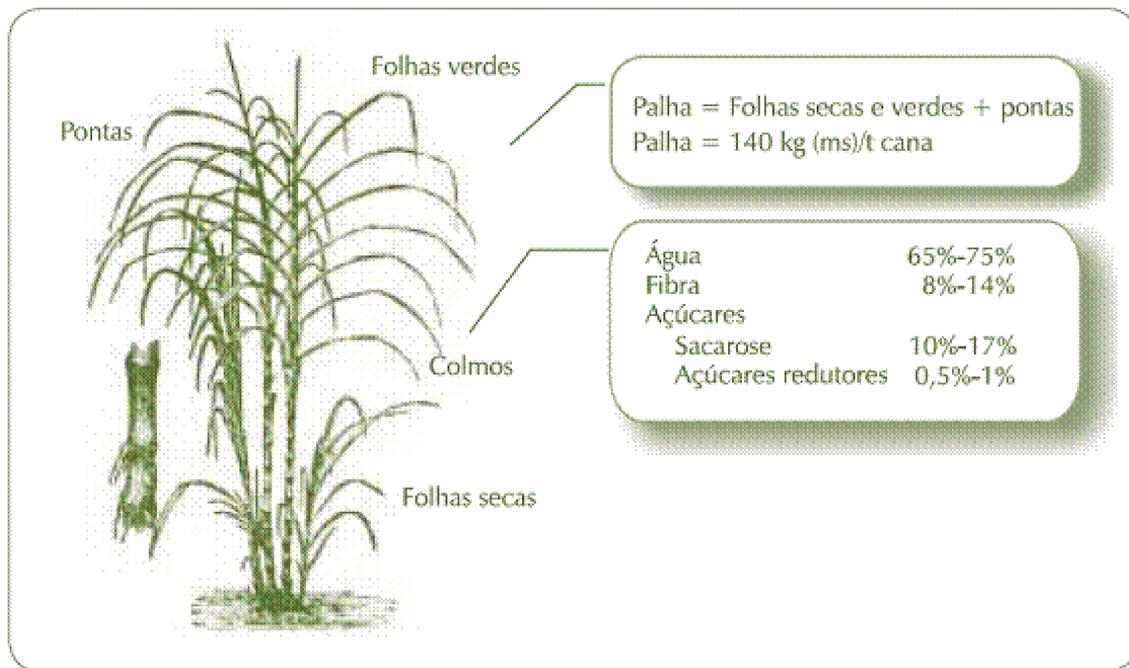


Figura 2.1: Estrutura típica da biomassa de cana-de-açúcar (BNDES e CGEE, 2008).

Como um dos principais produtos agrícolas do Brasil, cultivada desde a época da colonização, a cana-de-açúcar é atualmente a opção de biomassa que agrega maior produtividade por unidade de área e melhor balanço energético, que é a razão entre a energia que sai na forma de produto (etanol, por exemplo) e a energia fóssil consumida na cadeia produtiva. Além disso, o advento da cultura de cana para produção de bioetanol a partir dos açúcares extraíveis da cana (sacarose e açúcares redutores no caldo) vem gerando grandes excedentes de bagaço com potencial de serem transformados em bioetanol, também conhecido como etanol de 2ª geração, e aumentar significativamente a oferta deste combustível sem exigir um aumento proporcional das áreas de plantio. Nessa nova condição, o aproveitamento da cana é integral (CGEE, 2009).

### **2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana é a fração da biomassa resultante dos procedimentos de limpeza, preparo e extração do caldo da cana, e a palha compreende resíduos da colheita constituídos por folhas (verdes e secas) e pontas. O bagaço apresenta variações em sua composição em função principalmente do tipo de corte (manual ou mecânico) e do processamento industrial.

De acordo com o CGEE (2009), o bagaço não é uma biomassa homogênea, apresentando variações em sua composição, assim como na sua estrutura morfológica em função dos procedimentos de corte e de processamento industrial. No que diz respeito à sua composição, influenciam significativamente fatores como: a realização ou não das queimadas antes do corte; os procedimentos de colheita e carregamento com maior ou menor arraste de terra, areia e resíduo vegetal, tais como corte manual, mecânico, cana picada, corte incluindo o ponteiro etc.; o tipo de solo onde a cana é cultivada (latossolos, solos arenosos, outros); e os diferentes procedimentos de limpeza da cana: a seco por revolvimento em mesas, limpeza com arrasto por corrente de água, limpeza pneumática. Influenciam também a geometria e outros detalhes construtivos das mesas de revolvimento, assim como a relação de volume de água aplicada por tonelada.

A composição química do bagaço depende das condições climáticas a que esteve exposta a cana-de-açúcar, tipos de microrganismos, assim como a época sazonal. Na Figura 2.2, encontra-se a composição aproximada do bagaço de cana-de-açúcar.

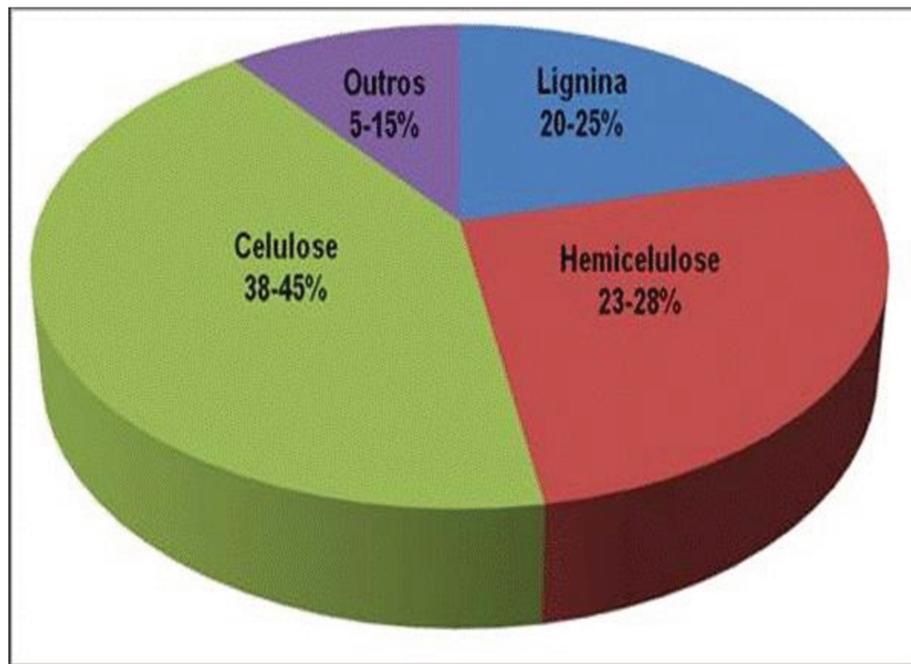


Figura 2.2: Composição aproximada do bagaço de cana-de-açúcar (Fonte: Dados CTC).

Outro dado apresentado pelo CGEE (2009), é que o bagaço não apresenta morfologia e tamanho de partículas uniformes, distinguindo-se uma fração esponjosa e outra de fibras com elevada relação de esbeltez (razão entre o comprimento e o diâmetro da fibra). Existem diferenças significativas na densidade aparente apresentada por estas frações. Estudos mais recentes distinguem três frações características no bagaço: casca, fibra e medula. A medula é formada por partículas esponjosas que apresentam uma forma relativamente regular e um fator comprimento/largura próximo a um, podendo ser aproximadas a esferas; a casca é de tamanho bem maior, apresentando-se como lâminas grosseiramente retangulares; e as fibras podem ser representadas como cilindros com um fator de esbeltez próximo a 50, sendo assemelhadas a cilindros de comprimento infinito.

## 2.2. Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais lignocelulósicos são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL e WEGENER, 1989).

O principal componente da biomassa lignocelulósica é a celulose, uma cadeia polissacarídea de moléculas de glicose. As hemiceluloses, o segundo componente mais abundante da biomassa, é composto de vários açúcares de 5 e 6 carbonos, tais como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é composta por três componentes fenólicos principais, a saber, álcool p-cumarílico (H), álcool coniferílico (L) e álcool sinapílico (S). Celulose, hemiceluloses e lignina formam estruturas chamadas de microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas que media a estabilidade estrutural na parede celular das plantas (RUBIN, 2008). A forma como estes compostos estão estruturadas na biomassa lignocelulósica está apresentada na Figura 2.3.

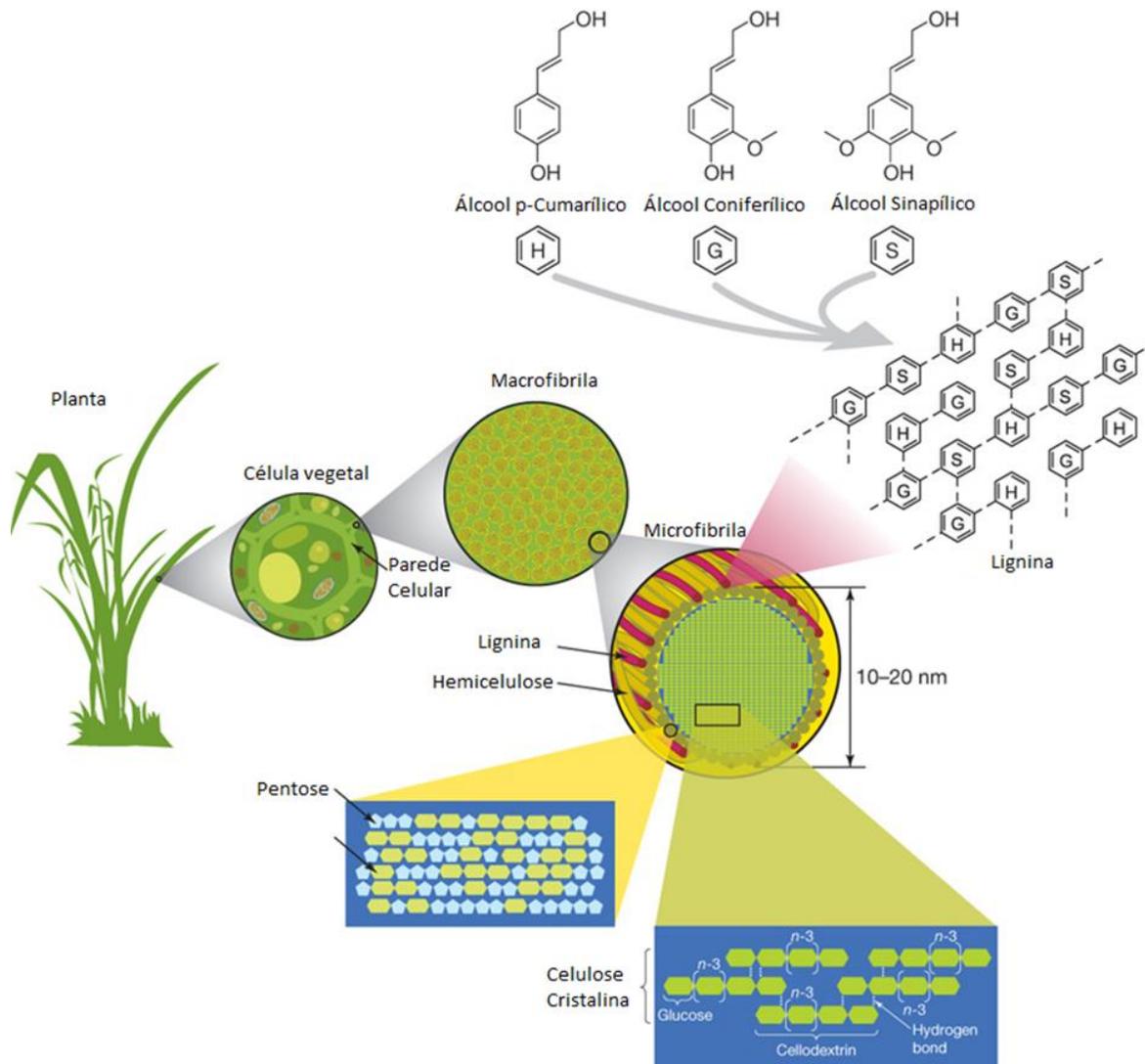


Figura 2.3: Estrutura dos materiais lignocelulósicos. (Adaptado de RUBIN, 2008)

A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemiceluloses, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição química de materiais lignocelulósicos com potencial para produção de etanol de segunda geração

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	73,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	7	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: SANTOS et al., 2012

O alto teor de celulose e hemiceluloses, baixo teor de lignina, assim como grande disponibilidade e baixo custo de obtenção são características que revelam uma fonte de biomassa com grande potencial para o processo de etanol de 2ª geração. Entretanto, para que este grande potencial de obtenção de diversos produtos de valor agregado seja aproveitado há necessidade de desenvolvimento de tecnologias na área de bioprocessos, de biotecnologia e engenharia, devido às características químicas e morfológicas desses compostos como a elevada resistência a agentes biológicos, sendo indispensáveis os tratamentos prévios, às vezes sob condições drásticas para a obtenção de açúcares fermentescíveis (MORAES, 2013).

### 2.2.1. Celulose

A celulose está presente na maioria dos vegetais em frações entre 40-50%, sendo o principal componente da parede celular vegetal e a macromolécula mais abundante na natureza. A sua estrutura pode ser classificada em três níveis organizacionais. O primeiro é definido pela sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (LIU; SUN, 2012). Este polímero natural é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose (Figura 2.4).

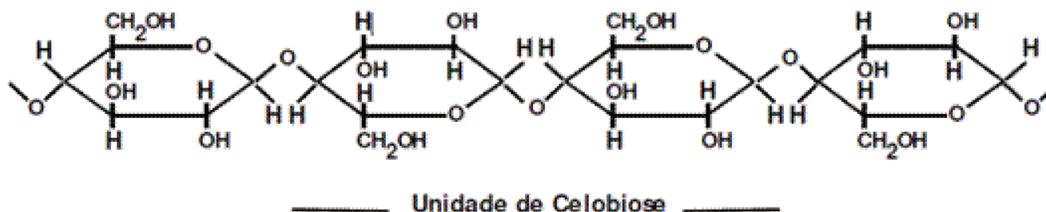


Figura 2.4: Estrutura da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose (FENGEL e WEGENER,1989).

Em função da linearidade da celulose, as suas moléculas apresentam tendência em formar ligações de hidrogênio inter e intramolecular. Existem ligações de hidrogênio entre grupos OH de unidades de glicose adjacentes da mesma molécula de celulose (ligação intramolecular – responsável pela rigidez) e entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose (ligação intermolecular – responsável pela formação da estrutura supramolecular) (FENGEL e WEGENER,1989). De acordo com FUENTES (2009), a existência destas ligações tem um efeito

importante na reatividade que apresentam as fibras celulósicas. As ligações intermoleculares de hidrogênio permitem uma estrutura fibrilar terciária de alta cristalinidade. As zonas que apresentam elevada cristalinidade conferem proteção à célula e constituem um impedimento estérico tornando-se difíceis de penetrar por solventes e reagentes. Por outro lado, as zonas relativamente mais desordenadas (amorfas) são mais acessíveis e mais susceptíveis a todas as reações químicas e à degradação pelos pré-tratamentos. Na Figura 2.5, é possível observar como é a distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila.

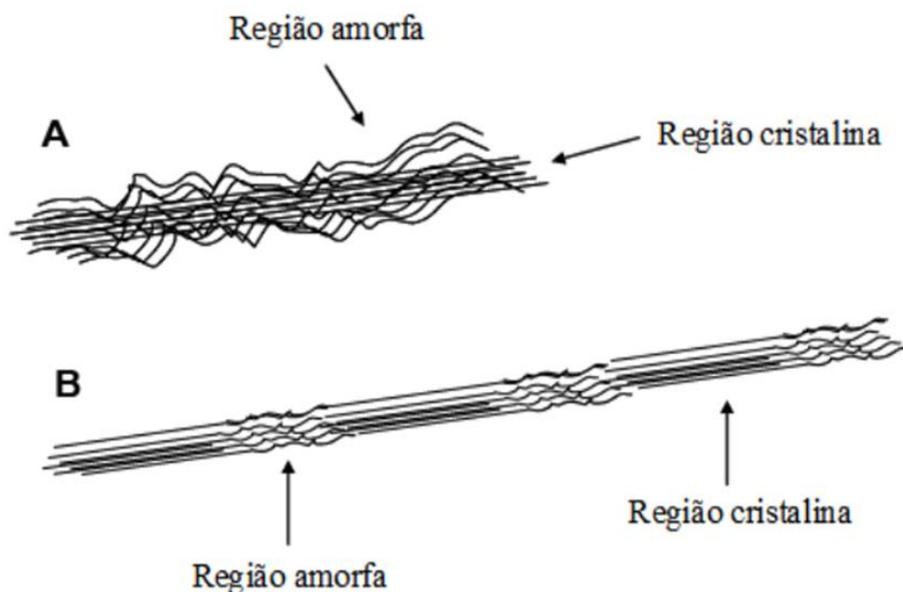


Figura 2.5: Diferentes visões do modo de distribuição da celulose cristalina e amorfa na microfibrila. A: Celulose cristalina está no centro da microfibrila e é envolta pelo substrato amorfo. B: As regiões cristalinas e amorfas são repetidas ao longo da dimensão horizontal (RABELO, 2010).

Apesar da sua simplicidade química, existe uma complexa gama de formas físicas da celulose devido principalmente à diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial,

a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (RABELO, 2010).

### **2.2.2. Hemiceluloses**

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, dependendo da fonte (Figura 2.6). São estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lignina. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado, formando ligações de hidrogênio com celulose, ligações covalentes com a lignina e ligações éster com unidades de acetil e ácidos hidroxicinâmicos. São polímeros de baixo peso molecular, com um grau de polimerização (DP) de 80-200. As fórmulas gerais são  $(C_5H_8O_4)_n$  e  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , que são chamados pentoses e hexoses, respectivamente. Comparadas com a celulose, são relativamente mais fáceis de hidrolisar devido à sua estrutura amorfa, e ramificada (com a cadeia lateral curta), bem como o seu menor peso molecular (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; REN; SUN, 2012; SANTOS et al., 2012).

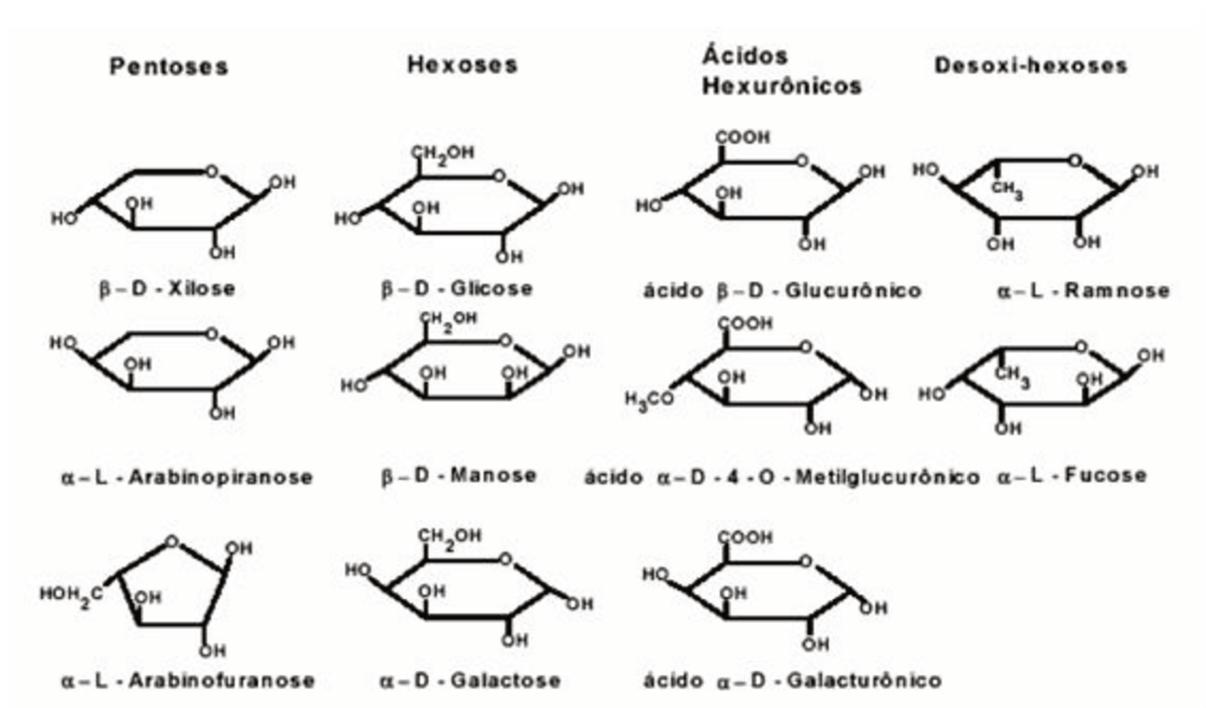


Figura 2.6: Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses. (FENGEL e WEGENER, 1989).

As hemiceluloses são relativamente sensíveis às condições de operação, por conseguinte, parâmetros tais como a temperatura e tempo de operação têm de ser controlados para evitar a formação de produtos indesejáveis por serem potencialmente inibidores da fermentação, tais como furfural e HMF (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

### 2.2.3. Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. A lignina é a substância que confere rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e mecânicos aos tecidos vegetais e vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal. É uma macromolécula amorfa que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares

(Figura 2.7). A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose. (LU; RALPH, 2012; FENGEL e WEGENER, 1989 ).

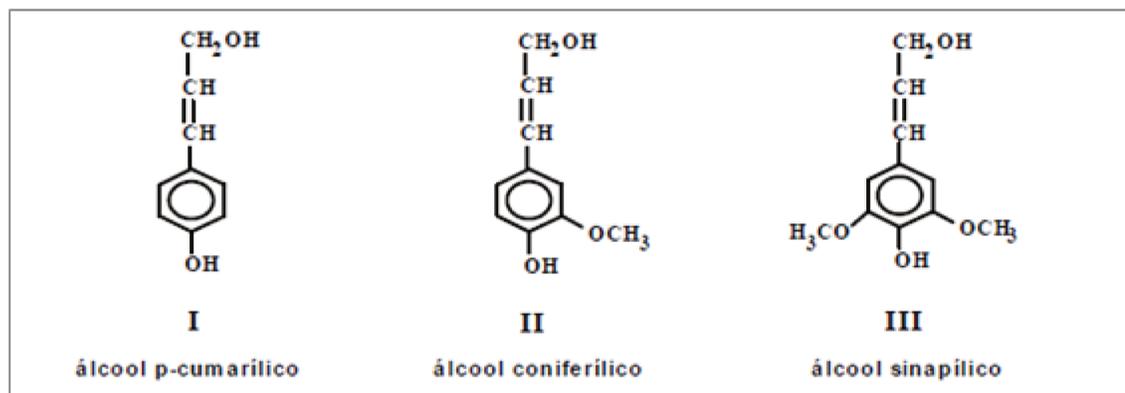


Figura 2.7: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).

No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (SANTOS et al., 2012).

#### 2.2.4. Outros Compostos: Extrativos e Cinzas

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos, porém têm um efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa. A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., como resultado dos nutrientes adquiridos durante o seu crescimento (SILVA, 2009).

Existem outros materiais que também não são comumente extraíveis com os solventes mencionados e também não se encontram na parede celular, tais como os compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas (RAMOS, 2003).

Os extrativos do bagaço compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, que podem ser extraídas utilizando solventes polares e apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais.

### **2.3. Processo para Produção de Etanol a Partir de Biomassa Lignocelulósica**

O desenho de processos de baixo custo para produzir bioetanol combustível, a partir de matérias lignocelulósicas, implica na seleção de matérias-primas mais adequadas e na definição de uma configuração de processo adequado tornando possível a conversão das matérias-primas no produto final dentro das especificações. A tarefa de definir uma configuração adequada do processo exige a geração e avaliação de muitos fluxogramas para encontrar aqueles com melhores indicadores de desempenho. Neste trabalho, a importância da matéria-prima como um fator-chave na economia do processo de produção de etanol é realçada. A produção de bioetanol também é examinada, considerando-se diferentes tendências com o intuito de reduzir os custos de produção. Além disso, alguns aspectos que envolvem metodologias de análise de processo são forçados a fim de mostrar como eles podem contribuir para a criação de tecnologias para a produção de bioetanol combustível (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Em linhas gerais, a produção do bioetanol de 2ª geração inclui cinco principais etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise da celulose, fermentação das hexoses, separação e tratamento de efluentes. Além disso, a detoxificação (processo para retirar as substâncias potencialmente inibidoras da fermentação) e a fermentação de pentoses liberadas durante o processo de pré-tratamento pode ser realizada. A fração sólida do pré-tratamento contém a celulose que é posteriormente hidrolisada e fração líquida contém o hidrolisado hemicelulósico. Uma vez que a hidrólise da celulose é concluída, o hidrolisado resultante é fermentado e

convertido em etanol. Este processo é chamado de hidrólise e fermentação separada (SHF). SHF é uma das configurações que já foram testadas mais extensivamente (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010), e será a configuração abordada nesta dissertação.

### **2.3.1. Pré-Tratamento da Biomassa Lignocelulósica**

A produção de etanol a partir dos materiais lignocelulósicos compreende as etapas de hidrólise da celulose e hemiceluloses, separação da lignina residual, fermentação dos açúcares presentes no caldo hidrolisado obtido, e, finalmente, recuperação e purificação do etanol produzido. A etapa de hidrólise ainda é uma tarefa tecnicamente problemática porque a digestibilidade da celulose é dificultada por fatores físico-químicos, estruturais e composicionais. Devido a isto, torna-se imprescindível pré-tratar a biomassa de modo a facilitar a obtenção de açúcares potencialmente fermentescíveis na etapa de hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é, portanto, promover modificações químicas e estruturais na biomassa, de modo a se obter um material (polpa) com elevado teor de celulose (substrato de interesse) e que apresente alta acessibilidade da matriz lignina-carboidrato às enzimas celulolíticas (KUMAR; WYMAN, 2009).

O processo de produção de etanol lignocelulósico é, contudo, fortemente influenciado por fatores físico-químicos, estruturais e composicionais. Assim, o desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento da biomassa visando alterar e/ou remover barreiras estruturais (recalcitrância) e composicionais são de fundamental importância para o sucesso do processo global (SUN; CHENG, 2002).

A Figura 2.8 apresenta o esquema das transformações que sofre a biomassa durante o pré-tratamento com a alteração da estrutura e o aumento da área superficial da celulose.

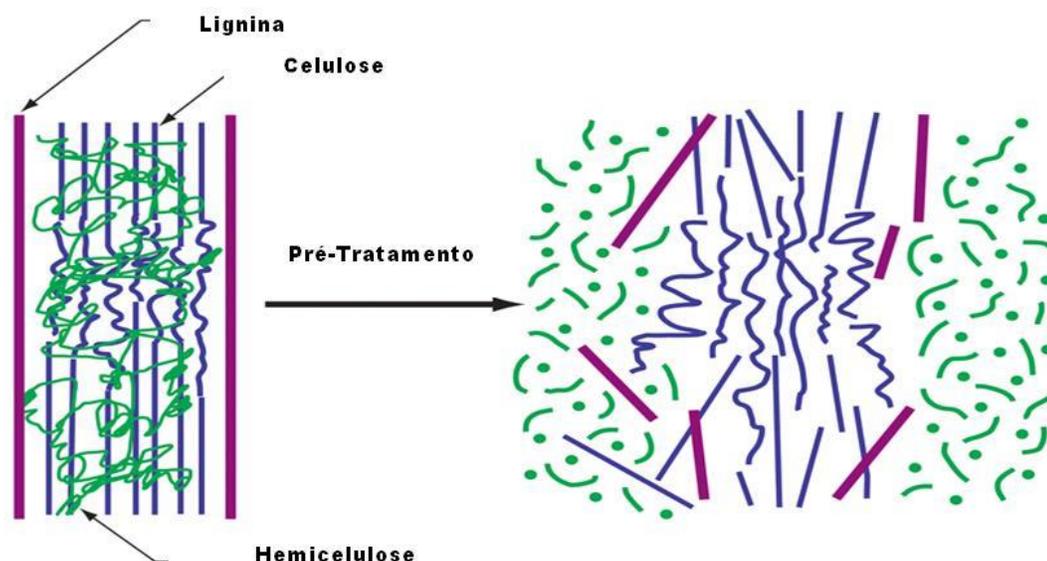


Figura 2.8: Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (Fonte: US Department of Energy Genome Programs [https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Pretreatment\\_-\\_original.jpg](https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Pretreatment_-_original.jpg))

Diversos trabalhos, (ALVIRA et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; GU, 2013; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; MOSIER et al., 2005b; SUN; CHENG, 2002; YANG; WYMAN, 2008) abordam que um bom pré-tratamento é conhecido por alterar a estrutura da lignina, conseguindo incrementar a acessibilidade da enzima à celulose, desarticulando a estrutura altamente ordenada da celulose, aumentando o volume do poro e a área superficial. Para isso, o pré-tratamento deve obedecer a alguns critérios:

- Resultar em uma elevada recuperação de todos os carboidratos;
- Resultar em uma elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática subsequente;
- Evitar ou minimizar a formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação subsequentes;
- Requerer baixo investimento e custo operacional;
- Requerer uma baixa demanda energética; e
- Não ser agressivo ao meio ambiente.

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos. Esses métodos podem ser classificados de diferentes formas: pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos e combinados têm recebido uma maior atenção, já que removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica. (WYMAN et al., 2011). De acordo com a literatura, (CUNHA, 2005; GÁMEZ et al., 2006; LASER et al., 2002), os mais comuns são baseados no emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida (Ammonia Fibre Explosion ou AFEX) e hidróxido de sódio, todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa

Várias revisões sobre pré-tratamento foram publicadas nos últimos anos (ALVIRA et al., 2010; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; MOSIER et al., 2005a; SUN; CHENG, 2002; YANG; WYMAN, 2008). Na Tabela 2.2, são apresentados, de forma simplificada, os diferentes tipos de pré-tratamento pesquisados e as respectivas mudanças causadas à biomassa lignocelulósica, além disso, as vantagens e desvantagens dos mesmos.

Tabela 2.2: Efeito de diferentes pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos (Adaptado de SANTOS et al., 2012).

Pré-tratamento		Características composicionais			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade.	Não remove.	Não remove.	Redução de cristalinidade.	Alto consumo de energia.
Químico	Ácido	Pouca despolimerização.	80-100% de remoção.	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura.	Condições médias, altas produção de xilose.	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente oneroso.
	Alcalino	Inchação significativa, e pouca despolimerização.	Considerável solubilidade.	Considerável Solubilização, >50%.	Remoção efetiva de ésteres, lignina, acetil.	Reagente caro, recuperação alcalina.
	ARP	Menor que 5% de despolimerização.	~50% de solubilização.	~70% de solubilização.	Efetiva deslignificação.	Recuperação alcalina, relativamente caro.
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização.	Pequena solubilização.	Solubilização acima de 70%.	Efetiva deslignificação em condições suaves.	Caro, necessidade de mais ozônio.
	Organosolv	Considerável inchação.	Significativo, quase completa.	Significativo, pode ser quase completa.	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação.	Recuperação de solvente cara.
Físico-Químico	Explosão a vapor	Pouca despolimerização.	80-100% de remoção.	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura.	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem.	Degradação da xilana como produto inibitório.
	Explosão com CO <sub>2</sub>	Aumenta a área superficial, e diminuição do grau de cristalinidade.	Considerável solubilização.	Não remove.	Alta produção de xilose, não há formação de inibidores.	Necessita alta pressão, não modifica a lignina.
	Oxidação úmida	Aumenta a área superficial.	~70% de solubilização.	Considerável Solubilização, >50%.	Eficiente remoção da lignina, baixa formação de inibidores.	Alto custo do oxigênio e do catalisador alcalino.
	AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade.	Acima de 60% de solubilidade.	10-20% de solubilização.	Menor perda de xilanas, não há formação de inibidores.	Recuperação de amônia, não é efetiva para alta concentração de lignina.
	LHW (Hidrotérmico)	Aumenta a área superficial.	Acima de 80% de solubilização.	Baixa remoção de lignina.	Alta produção de xilose, baixa formação de inibidores.	Alta demanda de água e energia.
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização.	Acima de 80% de solubilização.	~40% de deslignificação.	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação.	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise.

Fonte: (ALVIRA et al., 2010; GÍRIO et al., 2010; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; MOSIER et al., 2005a; SANTOS et al., 2012; SUN; CHENG, 2002)

Componentes inibitórios podem ser classificados em dois grupos: inibidores originalmente presentes na biomassa e inibidores produzidos por condições severas na etapa do pré-tratamento. Os inibidores presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Em contrapartida, os pré-tratamentos que trabalham em condições drásticas, ou seja, presenças de reagentes ácidos combinados com altas temperaturas são fortemente passíveis à formação de produtos inibitórios devido à degradação dos açúcares e da lignina, levando assim à produção de ácidos orgânicos e fenólicos, aldeídos furânicos e outros produtos. A Figura 2.9 mostra a procedência de cada um dos inibidores proveniente de diferentes constituintes da biomassa.

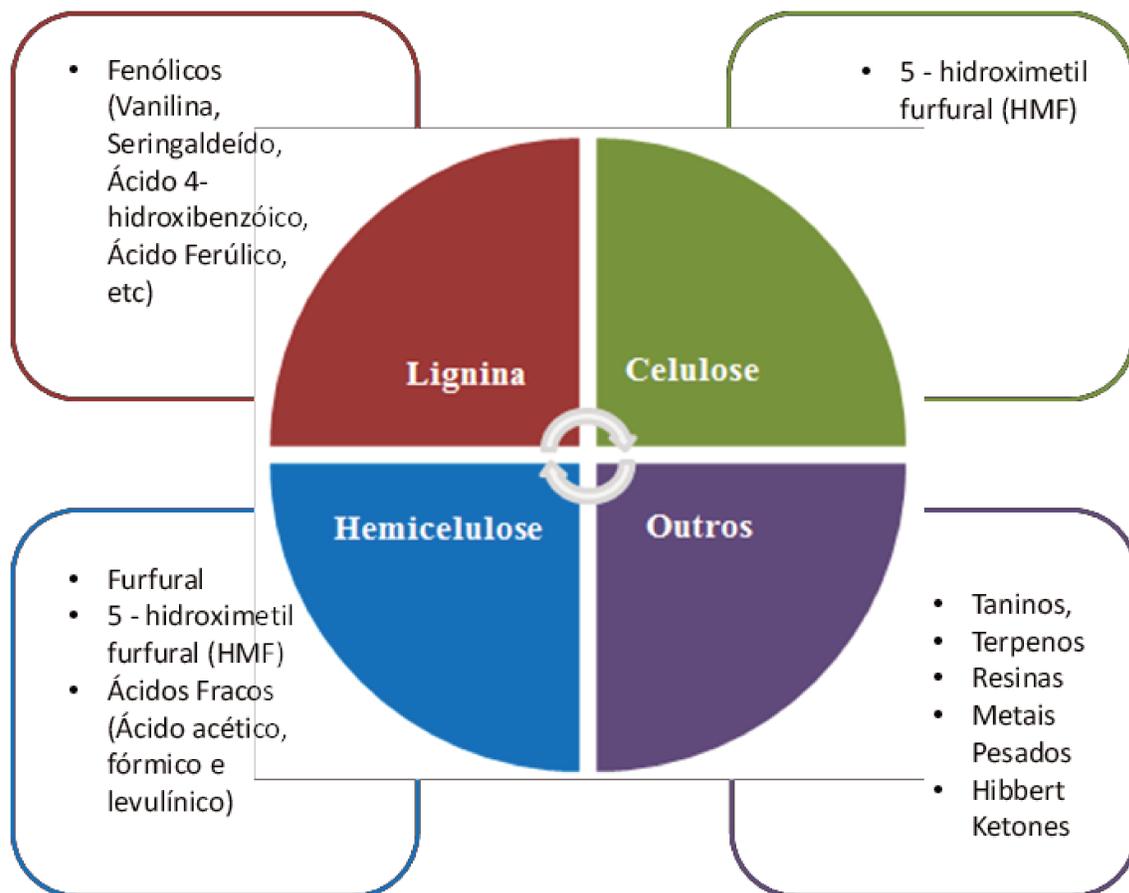


Figura 2.9: Formação dos componentes inibitórios (Adaptado de CHANDEL; SILVÉRIO; SINGH, 2011).

Da degradação das pentoses resulta o furfural e da degradação das hexoses, o inibidor produzido é o 5-hidroximetilfurfural (HMF). Quando é promovida a degradação destes inibidores, o ácido fórmico e levulínico são formados. Compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, catecol e siringaldeído podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina. O ácido acético originalmente presente na biomassa é liberado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Uma variedade de métodos biológicos, físicos e químicos pode ser aplicada com o fim de reduzir a concentração de inibidores antes de realizar a etapa de hidrólise enzimática e fermentação.

Para a matéria-prima de interesse do presente trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar, pode-se considerar que uma combinação de pré-tratamentos foi empregada, a saber: fragmentação mecânica, quando da prensagem da cana nas moendas, e explosão a vapor, tratamento físico-químico. Este procedimento já vem sendo empregado pelas unidades industriais há bastante tempo, dado que em tais ambientes a produção de “bagaço hidrolisado” para alimentação animal é prática bastante comum. Por esta razão, apenas este tipo de pré-tratamento foi aqui investigado.

### **2.3.1. 1. Pré-Tratamento por Explosão a Vapor**

Explosão a vapor é o método mais extensivamente investigado para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010; CUNHA, 2005; HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; PITARELO, 2007; RAMOS, 2003; SUN; CHENG, 2002; YU et al., 2012). É um método termo-mecânico-químico que envolve a quebra dos componentes estruturais por aquecimento com vapor (termo), corte (mecânico, devido à descompressão súbita e evaporação da umidade) e auto-hidrólise (química) das ligações glicosídicas (MENON; RAO, 2012). Neste método, a biomassa é impregnada com vapor saturado até que o sistema atinja a pressão desejada, por exemplo,  $15\text{kgf/cm}^2$ . Após certo tempo, tipicamente de 1-10 min, a pressão do sistema é rapidamente aliviada. Esta descompressão súbita causa uma espécie de explosão, o que promove

a separação, em certo grau, da celulose das demais frações da biomassa (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; YANG; WYMAN, 2008).

Este pré-tratamento combina força mecânica e efeitos químicos relacionados com a hidrólise (auto-hidrólise) dos grupos acetil presentes na hemicelulose. A auto-hidrólise ganha espaço quando as altas temperaturas promovem a formação de ácido acético a partir dos grupos acetil, além do fato de que a água pode agir como um ácido quando em altas temperaturas. Os efeitos mecânicos são causados porque a pressão é reduzida subitamente e as fibras são separadas durante a explosão devido à descompressão. Deste modo, com a remoção parcial ou total da hemicelulose via processo de explosão, supõe-se maior exposição da superfície da celulose e consequente aumento da acessibilidade de biocatalisadores a esta estrutura. Apenas uma porção limitada da lignina é removida durante o pré-tratamento, mas uma parte é redistribuída na superfície da fibra devido às reações de fusão e despolimerização/repolimerização. A remoção e redistribuição da hemicelulose e lignina aumenta o volume dos poros do material pré-tratado, tornando a biomassa mais susceptível à solvatação e, por conseguinte, aos processos de hidrólise ácida ou enzimática. As microfibrilas parecem não ser afetadas significativamente pelo pré-tratamento. A fragmentação em si é considerada de menor importância para a digestibilidade do material. Dependendo da severidade do pré-tratamento, ou seja, dos níveis de pressão e temperatura empregados, alguma degradação da celulose a glicose também poderá ocorrer (ALVIRA et al., 2010).

O processo de explosão a vapor oferece várias características atraentes quando comparado a outras tecnologias de pré-tratamento. Estas características incluem, potencial de menor impacto ambiental, menor investimento de capital, maior potencial de eficiência energética, menos produtos químicos, condições do processo menos perigosas e recuperação completa dos açúcares (GLASSER; WRIGHT, 1998). Entre as principais vantagens, vale a pena mencionar a possibilidade de usar um tamanho maior de *chip*, além de não precisar adicionar catalisador ácido, recuperação elevada de açúcar, bons rendimentos de hidrólise enzimática e sua viabilidade para o desenvolvimento em escala industrial. É notável o fato de que o uso de energia para a obtenção de tamanhos pequenos de *chips* antes do pré-tratamento pode responder por um terço das necessidades de energéticas de todo o processo (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ,

2005). Além disso, embora a possibilidade de evitar os catalisadores ácidos anteriormente tenha sido indicada como vantagem, a adição de um catalisador ácido, tem sido também descrita como uma forma de aumentar a digestibilidade da celulose, e melhorar a hidrólise/solubilização da hemicelulose e, dependendo da temperatura, para diminuir a produção de compostos de degradação (SUN; CHENG, 2002). Uma vez que são necessárias a redução de custos e de baixo consumo de energia para um pré-tratamento eficaz, os tamanhos de partículas elevadas, bem como a adição de ácido não seriam desejáveis para otimizar o processo (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Embora a utilização de ácido na explosão de vapor tenha sido introduzida com algumas desvantagens, muitas abordagens de pré-tratamento impregnado com  $H_2SO_4$ ,  $SO_2$  ou  $CO_2$  (usualmente 0,3 a 3% p/p) podem aumentar efetivamente a exposição da molécula de celulose ao posterior ataque enzimático. Este procedimento reduz o tempo e a temperatura do pré-tratamento e, ao mesmo tempo, pode conduzir a um aumento na recuperação de glicose e redução na formação de inibidores. O pré-tratamento a vapor com adição de catalisadores parece ser a tecnologia mais próxima da comercialização em curto prazo (YU et al., 2012).

Dentre os vários métodos de pré-tratamento investigados para biomassas lignocelulósicas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MOSIER et al., 2005a), explosão a vapor tem sido provado ser eficaz para diferentes materiais (GLASSER; WRIGHT, 1998), como o álamo (poplar) (OLIVA et al., 2003), o bagaço de azeitona (CARA et al., 2008), resíduos agrícolas de milho como palha e sabugo (HONGQIANG; HONGZHANG, 2008; VARGA; RÉCZEY; ZACCHI, 2004), a palha de trigo (BALLESTEROS et al., 2006), o bagaço de cana-de-açúcar (MARTÍN; MARCET; THOMSEN, 2008; ROCHA et al., 2012), e a palha de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2012). Foi realizado com sucesso em madeiras duras, resíduos agrícolas, e biomassas energéticas, mas não foi muito eficaz para madeiras macias devido ao seu baixo teor de grupos acetil na porção hemicelulósica (SUN; CHENG, 2002)

A explosão a vapor, devido ao seu menor investimento de capital e maior eficiência energética está entre um número muito limitado de tecnologias de pré-tratamento de baixo custo para demonstração em escala piloto e aplicações comercializadas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

## 2.5. Hidrólise da Biomassa Lignocelulósica

Um passo chave na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, é a hidrólise da celulose, que pode ser catalisada com ácidos ou enzimas. Devido à sua maior produção de açúcar e seu potencial de menor impacto ambiental, a hidrólise enzimática é mais atraente do que a hidrólise ácida (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). No processo enzimático, as enzimas, celulasas, são utilizadas como catalisadores para hidrolisar as cadeias de celulose para o produto final de interesse, glicose. Ao contrário dos catalisadores comuns, a conversão da celulose em glicose por via enzimática apresenta uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação. Deste modo, é possível a redução de custos de separação dos produtos, assim como problemas com tratamento de efluente. Estes fatores justificam o fato deste processo ter se tornado cada vez mais popular como integrante da tecnologia de conversão de biomassa em biocombustível (HIMMEL et al., 2007; LAUREANO-PEREZ et al., 2005). Por esta razão, a hidrólise enzimática foi aqui investigada, e está descrita em detalhes, a seguir.

### 2.5.1. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é efetuada por celulasas que são altamente específicas. Os produtos da hidrólise são usualmente açúcares redutores tais como a glicose. Os custos com utilidades para a hidrólise enzimática são baixos quando comparado com a hidrólise ácida ou alcalina, porque a hidrólise enzimática é geralmente conduzida em condições moderadas (pH 4,8 e temperatura de 45 - 50 °C). Portanto, não acarreta em problemas de corrosão, o consumo de utilidade é baixo, assim como a toxicidade dos hidrolisados, sendo estas as principais vantagens deste processo (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Tanto bactérias como fungos podem produzir celulasas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesófilos ou termófilos. As bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*,

*Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* podem produzir celulases. *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* têm sido extensivamente estudadas para a produção de celulase. Embora muitas bactérias celulolíticas, particularmente as anaeróbicas celulolíticas como *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens* produzem celulases com alta atividade específica, porém não produzem em quantidades elevadas. Porque os microrganismos anaeróbicos possuem uma taxa de crescimento muito baixa e requerem condições anaeróbicas de crescimento, a maioria das pesquisas para a produção de celulase comercial tem se concentrado em fungos. Os fungos que têm sido relatados para produzir celulases incluem *Sclerotium rolfsii*, *P. chryso sporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum* (SUN; CHENG, 2002). De todos estes gêneros de fungos, o *Trichoderma* tem sido o mais estudado para a produção de celulase, sendo que as celulases de *Trichoderma reesei* e *T. viride* foram as mais amplamente estudadas e melhor caracterizadas. Um conjunto completo para a produção de celulases, a estabilidade sob as condições de hidrólise enzimática, e a resistência da enzima aos inibidores químicos, são vantagens das celulases produzidas por *Trichoderma*. As principais desvantagens das celulases de *Trichoderma* são os níveis abaixo do ideal e a baixa atividade das  $\beta$ -glicosidases. Por outro lado, *Aspergilli* são produtores de  $\beta$ -glicosidases muito eficientes. Em vários estudos, celulases de *Trichoderma* foram suplementadas com  $\beta$ -glicosidases e apresentaram significativa melhora (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

No corrente entendimento da hidrólise enzimática de celulose nativa por sistemas de enzimas microbianas extracelulares resulta primeiramente da interação sinérgica da  $\beta$ -1-4-endoglucanases e  $\beta$ -1-4-exoglucanases (celobiohidrolases) para o rendimento da celobiose que é posteriormente clivada para glicose pela  $\beta$ -1-4-glicosidase. As endoglucanases (EGs) atuam aleatoriamente para hidrolisar celulose amorfa e solubilizar derivados de celulose. Essa reação envolve a clivagem das ligações  $\beta$ -1-4-glicosídicas com uma pequena liberação de açúcares redutores. Em contraste, celobiohidrolases (CBHs), que inicialmente pensava-se que removiam consecutivamente resíduos de celobiose do final não redutor da cadeia de celulose, foi recentemente mostrado que atacam a celulose por ambos os finais, redutor e não redutor, da cadeia de celulose. Finalmente, as  $\beta$ -glicosidases completam o processo de hidrólise catalisando a hidrólise de resíduos de celobiose em glicose, ou removendo resíduos glicosil do final não

reduzidor de celooligossacarídeos solúveis, oligômeros, Figura 2. 10. Embora essas definições ainda serem utilizadas para agrupar celulasas, estudos recentes têm indicado que a especificidade dos substratos com as diversas endoglucanases e celobiohidrolases são consideravelmente mais complicadas do que esta classificação simplificada (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

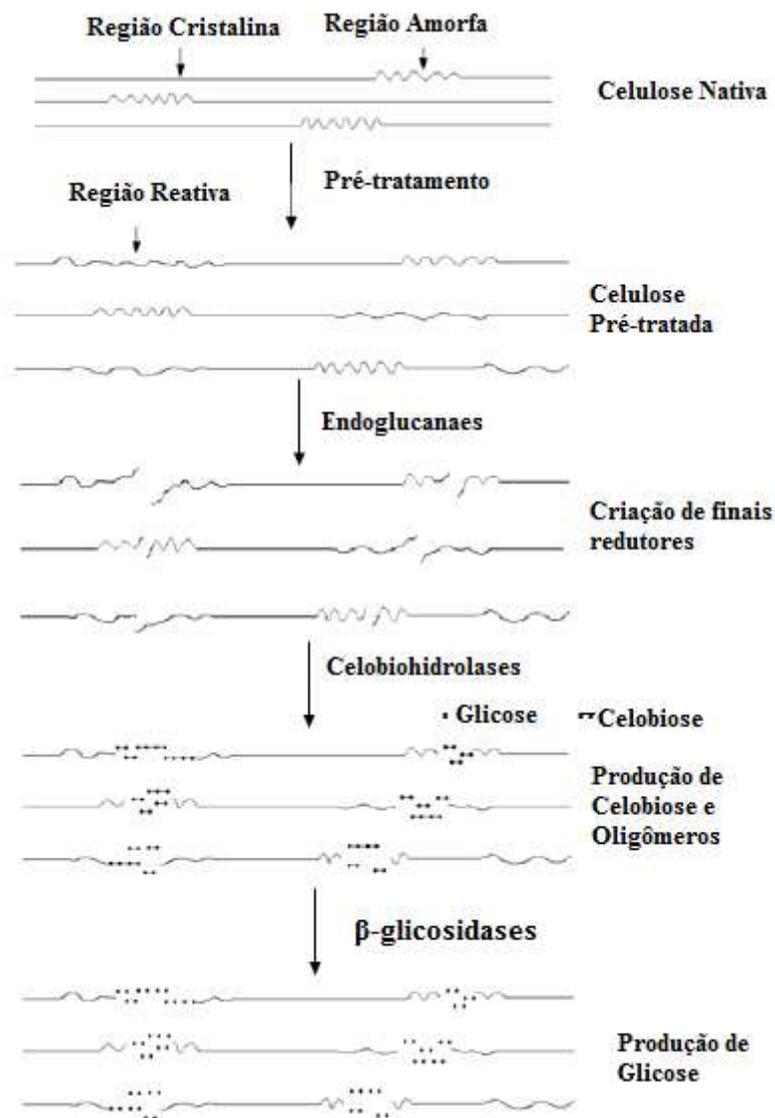


Figura 2. 10: Representação esquemática da hidrólise da celulose em glicose por enzimas celulolíticas (Adaptado de TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Nas últimas décadas, uma grande quantidade de pesquisa e esforço foi gerada na área de sistemas enzimáticos para a bioconversão de materiais lignocelulósicos. As celulases desempenham um papel significativo no processo enzimático por catalisar a hidrólise da celulose em açúcares fermentáveis solúveis (MENON; RAO, 2012).

Mais recentemente, a importância das chamadas monooxigenases polissacarídicas líticas da família AA9 (antiga GH61) tem sido enfatizada. A CBH I é a proteína mais abundantemente produzida por muitos fungos celulolíticos, e tem recebido uma grande atenção da academia e da indústria no que diz respeito ao seu mecanismo de ação e fatores que poderiam afetar a sua eficiência, especialmente em relação à sinergia com outras celulases. Há discordância na literatura sobre o passo limitante da velocidade da CBH I sobre a celulose, com algumas evidências que apontando para a dissociação e outras evidências para a etapa de complexação. Há um consenso geral, no entanto, que a ação progressiva da CBH I muitas vezes para enquanto se move ao longo da cadeia de celulose, aparentemente em resposta a "obstáculos" em seu caminho. A natureza destes obstáculos tem sido pouco clara, no entanto, FOX et al., (2012) e JALAK et al., (2012) observaram que a constante de velocidade da hidrólise da celulose por CBH I foi consideravelmente aumentada na presença de endoglucanase. Este aumento não poderia ser contabilizado completamente pelo sinergismo convencional onde a endoglucanase cria novas extremidades redutoras na cadeia para a CBH I hidrolisar. Em vez disso, foi levantada a hipótese de que os pontos de estagnação da CBH I estão em regiões amorfas e que, por exemplo, por hidrólise seletiva destas regiões, podem prevenir ou causar a estagnação da CBH I. Se for verdade, endoglucanases (ou combinações de enzimas) que digerem mais profundamente regiões amorfas em celulose podem ser vantajosas para promover a atividade da celobiohidrolase e a sinergia global CBH-EG. Do ponto de vista prático, é de interesse que esse mecanismo seja de grande importância para reduzir a razão entre enzima / substrato, que os produtores de enzimas e seus clientes estão buscando. Os resultados apresentados por IGARASHI et al., (2011) sugerem que a sinergia entre a CBH I e a CBH II também pode refletir na remoção de obstáculos para a CBH I pela progressão da CBH II (HARRIS et al., 2014).

Um desenvolvimento recente com relação à morfologia das microfibrilas e a sinergia durante a hidrólise enzimática é a observação feita por RESCH et al., (2013), de que celulasas fúngicas livres desconstruem a celulose (como Avicel) de uma maneira muito diferente do que os complexos multienzimáticos, celulosomas, de algumas bactérias anaeróbias. O primeiro (neste caso, a enzima comercial Cellic CTec2 da Novozymes) produzem uma ablação e um efeito afinando preferencialmente uma das extremidades da celulose enquanto os celulosomas produzem finais espalhados e reflexivos da separação das microfibrilas. Mais importante ainda, os autores demonstraram que uma combinação de enzimas livres e celulosomas digeriram a celulose (Avicel) sinergicamente, promovendo a hidrólise das microfibrilas dentro da partícula através da combinação de ablação e fibrilação. Ainda falta um completo entendimento do mecanismo desta sinergia, mas uma vez alcançado irá suscitar projetos de enzimas que possam imitar essa sinergia de forma menos complexa. De relevância a este respeito é a hidrólise eficiente de celulose cristalina observada por XU et al., (2013) com minicelulosomas artificiais contendo enzimas multicatalíticas que tiram proveito das sinergias em três níveis: (1) sinergia endo- / exo-cellulase, (2) sinergias intramolecular das proteínas individuais contendo várias atividades catalíticas, e (3) a partir de sinergia intermolecular a proximidade dos módulos catalíticos dentro da estrutura dos celulosomas.

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é confrontada por um grande número de obstáculos que diminuem o desempenho da enzima (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Os fatores que afetam diretamente a hidrólise enzimática da celulose incluem substrato, atividade da celulase e condições de reação (temperatura, pH, etc). Visando o avanço do processo global, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o intuito de promover melhorias na enzima que resultem, principalmente, em aumento de atividade associado ao aumento simultâneo de estabilidade (SUN; CHENG, 2002).

Um dos principais fatores que afetam o rendimento e a taxa inicial de hidrólise enzimática é a concentração de substrato (celulose e / ou hemicelulose). A alta concentração de substrato pode causar inibição pelo substrato, o que diminui substancialmente a taxa de hidrólise. A extensão da inibição depende da razão enzima / substrato. Problemas na agitação e na transferência de massa também surgem com alta concentração de substrato. A proporção de

enzima para o substrato utilizada é outro fator para a hidrólise enzimática. Obviamente, a aplicação excessiva de celulase, até certo nível, aumenta a taxa inicial de hidrólise e o rendimento. No entanto, o aumento na quantidade de celulase aumenta significativamente o custo do processo. Em geral, utilizam-se cargas enzimáticas de 5 a 35 FPU por grama de substrato (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Uma vez que a ação das enzimas celulolíticas ocorre através de três etapas, a saber, adsorção, biodegradação e dessorção do substrato, a atividade da celulase diminui durante a hidrólise, e acredita-se que a adsorção irreversível da enzima sobre a celulose é parcialmente responsável por esta desativação. A adição de agentes tensoativos pode aumentar a conversão enzimática de celulose em açúcares monoméricos. Vários mecanismos têm sido propostos para o efeito positivo da adição de tensoativo na hidrólise enzimática. O surfactante pode alterar ou modificar a natureza das propriedades de superfície de celulose, reduzir a ligação irreversível da celulase na celulose, evitar a desnaturação da enzima, bem como a ligação improdutivo de enzimas aos resíduos de lignina. Os tensoativos não-iônicos, tais como Tween 20, mostraram ser os mais eficazes para melhorar a hidrólise enzimática (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

Outro fator muito importante que limita a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é a presença de lignina, que geralmente representa uma percentagem significativa na biomassa. VAN DYK; PLETSCHKE, (2012) estabeleceram uma correlação entre a porcentagem de lignina e liberação de açúcares a partir de substratos lignocelulósicos, fornecendo a evidência de que a lignina tem um efeito sobre a hidrólise. Várias razões têm sido apresentadas como as razões pelas quais a presença de lignina reduz a hidrólise:

- A lignina fornece uma barreira física que limita a acessibilidade das celulasas e / ou hemicelulasas aos seus substratos;
- As celulasas são adsorvidas à lignina, que reduz a produtividade da hidrólise do substrato;
- A lignina também pode inibir diretamente as enzimas hidrolíticas;

- Também tem sido sugerido que "resíduos de lignina bloqueiam o progresso da celulase para baixo da cadeia de celulose";
- Alguns pesquisadores indicam que não apenas a presença de lignina, mas que o tipo e a distribuição dela têm impacto sobre hidrólise enzimática.

Sendo assim, os atributos mais desejados para bioconversão de biomassas lignocelulósicas por celulasas é o mecanismo hidrolítico completo, de alta atividade específica, alta taxa de transformar substratos como celulose nativa / biomassa, estabilidade térmica, diminuição da suscetibilidade à inibição enzimática por celobiose e glicose, adsorção seletiva em celulose, o sinergismo entre as diferentes enzimas e capacidade de resistir a forças de cisalhamento. Esses parâmetros são cumpridos através de abordagens de engenharia de proteínas, em relação às técnicas de expressão e desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para otimizar as condições de hidrólise. A eficiência hidrolítica de um complexo multienzimático para a sacarificação da biomassa depende tanto propriedades individuais das enzimas como das suas proporções no coquetel multienzimático. O complexo de celulase ideal deve ser altamente ativo para matéria-prima utilizada, capaz de hidrolisar completamente a biomassa, operar bem em pH levemente ácido, suportar o stress do processo, e ser rentável. Para melhorar o rendimento e taxa de hidrólise enzimática, as pesquisas têm-se centrado na otimização do processo de hidrólise, aumentando a atividade das celulasas, otimizando as condições do processo, reciclo de enzimas e estratégias de recuperação. Apesar de intensa pesquisa nas últimas décadas, a etapa de hidrólise enzimática permanece como um grande gargalo técnico-econômico no processo de bioconversão de biomassa em etanol lignocelulósico (MENON; RAO, 2012).

## **2.6. Detoxificação de Caldos Hidrolisados**

Durante o pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, são formados além de açúcares, ácidos alifáticos (acético, fórmico e levulínico), derivados de furano (furfural e HMF), e compostos fenólicos. A existência destas substâncias é mais provável quando altas temperaturas e / ou adição de ácido são empregados. Estes compostos são conhecidos por afetar o desempenho

da fermentação para a produção de etanol. O furfural pode ser gerado como um produto de degradação das pentoses. Verificou-se que os conteúdos de furfural aumentam com a concentração de catalisadores ácidos, tais como  $H_2SO_4$  (PATTRA et al., 2008).

Outra substância inibidora encontrada nas hemiceluloses do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado é o ácido acético. O ácido acético pode ser gerado quando a reação de hidrólise realiza-se no grupo de acetil da hemicelulose (RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004). Geralmente, o ácido acético é inibidor de levedura quando a sua concentração está entre 4 e 10 g/L. A concentração máxima de ácido acético obtida em hidrolisados de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratado com 6% de  $H_2SO_4$ , durante 60 min foi de 2,72 g/L, valor mais baixo do que para um efeito tóxico (PATTRA et al., 2008). Enquanto utilizando 4% de  $H_3PO_4$ , durante 300 min, o valor mais elevado foi de 4,0 g/L de ácido acético (GÁMEZ et al., 2006), por outro lado, relativamente uma baixa concentração de furfural (1,5 g/L) foi obtida quando foi utilizado 6 % de  $H_3PO_4$  a 300 °C, embora seja superior ao limite (1,0 g/L) para a inibição da levedura. Isto mostra que a decomposição de pentoses para o furfural é baixa e confirma a seletividade deste tratamento, utilizando ácido fosfórico.

Vários métodos de detoxificação, como neutralização, supercalagem com hidróxido de cálcio, carvão ativo, resinas de troca iônica (CARVALHEIRO et al., 2005) e detoxificação enzimática usando lacase (CHANDEL et al., 2007) são conhecidos para a remoção de vários compostos inibidores a partir de hidrolisados lignocelulósicos. A Tabela 2 apresenta os principais métodos de detoxificação implementados em hidrolisados de bagaços de cana-de-açúcar, com suas correspondentes condições de operação. As porcentagens de remoção de compostos tóxicos são mostradas. Poucos métodos podem remover quantidades suficientes de todas as substâncias tóxicas.

Tabela 2. 3: Métodos de detoxificação para hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (Adaptado de CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010)

Método	Agente	Pré-tratamento	Condições	Remoção (%)	Comentários
Detoxificação alcalina	Supercalagem com Ca(OH) <sub>2</sub>	Explosão a vapor com ácido diluído	pH 9-10,5 ajustado para 5,5-6,5 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ou HCl	Furfural (51%), HMF (51%), compostos fenólicos (41%), ácido acético (0%)	
	Supercalagem	Ácido	ND	Furanos (45,8%), compostos fenólicos (35,87%)	
Detoxificação alcalina combinada	KOH e sulfito de sódio	Ácido	pH 10, ajustado para pH 6,5 com HCl e adição de 1% de sulfito de sódio a 90 ° C	ND	Redução de aldeídos e cetonas, e remoção de compostos voláteis
Detoxificação microbiana	<i>Trichoderma reesei</i>	Explosão a vapor	ND	compostos fenólicos (80%)	
Eletrodialíse	Membranas carregada com potencial elétrico diferente	Ácido	Pré-evaporação à 100 °C por 15 min. Operação: eletrodialíse a 20 V. Vazão 50 L/h	Furfural (45%), ácido acético (90%)	Perdas de açúcar inferiores a 5%
Resinas de troca iônica	Resina comercial de troca aniônica	Ácido	Proporção Resina / hidrolisado (w / w): 1:10. Agitação regular por 1 h à temperatura ambiente	Furfural (63,4%), compostos fenólicos (75,8%), ácido acético (85,2%)	
Carvão ativo	Carvão ativo	Ácido	ND	Furanos (38,7%), compostos fenólicos (57%), ácido acético (46,8%)	
Tratamento enzimático	Lacase de <i>C. stercoreus</i>	Ácido	Incubação em agitador orbital a 100 rpm durante 4 h a 30 °C	compostos fenólicos (77,5%)	Não afeta o teor de furanos e ácido acético. Perda insignificante dos açúcares totais e maior remoção de compostos fenólicos

ND: sem dados disponíveis.

## 2.7. Fermentação de Caldos Hidrolisados

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico através do qual açúcares fermentescíveis (glicose) são convertidos em etanol e dióxido de carbono, conforme ilustrado pela reação apresentada a seguir:



De acordo com a reação acima, o rendimento máximo teórico é de 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de dióxido de carbono para cada quilo de glicose utilizada.

Métodos para a fermentação de açúcares de 6 carbonos são conhecidos há (pelo menos) 6000 anos, quando os Sumérios, Babilônios e Egípcios começaram a fazer e descrever o processo de fabricação de cerveja de grãos (amido). Depois de tornar possível a liberação de açúcares de 6 carbonos de materiais lignocelulósicos (final do século 19), a conversão de açúcares de 5 carbonos se tornou interessante. Eles representam uma grande percentagem dos açúcares disponíveis, a capacidade de recuperá-los e fermentá-los são importantes para a eficiência do processo. Apenas na década de 80, pesquisas sobre a fermentação de xilose começaram a dar frutos, quando um número de leveduras selvagens que poderiam converter xilose a etanol foi identificado. As bactérias especialmente têm chamado à atenção dos pesquisadores por causa de suas velocidades de fermentação. Em geral, bactérias podem fermentar em minutos quando comparadas as horas para leveduras (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Os principais problemas encontrados na conversão eficiente de hidrolisados lignocelulósicos a etanol são duplos. Primeiro, depois do pré-tratamento, o hidrolisado não contém apenas açúcares fermentescíveis, mas também uma ampla gama de compostos que tem efeitos inibitórios nos microrganismos usados para fermentação. A composição desses compostos depende do tipo de material lignocelulósico usado e da química e natureza do processo de pré-tratamento. Segundo, o hidrolisado hemicelulósico contém não apenas hexoses, mas também pentoses. Hexoses podem ser facilmente pela *Saccharomyces cerevisiae* por processo bem conhecido. Entretanto, as pentoses são mais difíceis para fermentar. Várias avaliações

econômicas têm ilustrado que a fermentação eficiente de pentoses é importante para a economia global da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Uma produção de etanol a partir de lignocelulósicos economicamente viável requer: (i) o desenvolvimento de um organismo funcional, e (ii) o desenvolvimento de processos e técnicas como estratégias de fermentação e integração de uma etapa fermentativa para o resto do processo (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; VAN MARIS et al., 2006). Com relação ao organismo funcional, deve ser ressaltado que as hexoses podem ser fermentadas, como já mencionado pelas leveduras usuais (*Saccharomyces cerevisiae*) e que o maior desafio está na fermentação economicamente viável das pentoses.

De acordo com HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, (2005) uma variedade de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) tem a capacidade de fermentar carboidratos a etanol mediante condições anaeróbias. Dentre esses, o mais popularmente utilizado é a levedura, que utiliza a fonte de carbono do meio reacional (glicose) para produção da energia necessária à realização de suas atividades fisiológicas, bem como para seu crescimento e reprodução, sendo, portanto, o etanol um subproduto desse processo. Dentre as leveduras utilizadas nos processos das usinas no Brasil, destacam-se as PE-2, SA-1, CAT-1 e BG-1, respectivamente isoladas no processo industrial das usinas: Pedra em 1994, Santa Adélia em 1993, Catanduva em 1998 e Barra Grande em 1993 (BASSO et al., 2008).

## **2.8. Comentários Finais**

Neste Capítulo, abordou-se desde as características da matéria-prima utilizada neste trabalho, o bagaço de cana-de-açúcar, assim como, a biomassa lignocelulósica e qual a sua composição. Foi abordado o processo de produção de etanol de 2ª geração e as etapas principais envolvidas neste processo, com enfoque nas investigadas neste trabalho, a saber, pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática, detoxificação e fermentação. No pré-tratamento, além de sumarizar as diversas maneiras de realizá-lo, constatou-se que o pré-tratamento por explosão a vapor é o mais investigado, provavelmente por ser um método com maior potencial de eficiência energética, menor investimento de capital, menor utilização produtos químicos dentre outros. A escolha pela hidrólise enzimática se deve a especificidade do biocatalisador (enzimas), e há extensiva investigação para reduzir os custos associados a esta etapa. A detoxificação se faz necessária para remover os inibidores formados e/ou liberados nas etapas anteriores, e constitui num grande desafio para a comunidade científica. Finalmente, uma breve revisão sobre o processo fermentativo dos açúcares liberados foi apresentada.



### CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste Capítulo, são descritos os materiais e equipamentos utilizados nos ensaios de todas as etapas experimentais deste trabalho que foi realizado nas dependências do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), no laboratório e na unidade de desenvolvimento de processos (PDU – Process Development Unit) do projeto Etanol 2G, assim como a metodologia aplicada desde a coleta e preparação do bagaço de cana, passando pelas etapas de caracterização, pré-tratamento, hidrólise enzimática e as análises dos produtos e subprodutos.

A seguir, é apresentado o fluxograma, Figura 3.1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** com as principais etapas do desenvolvimento do trabalho.

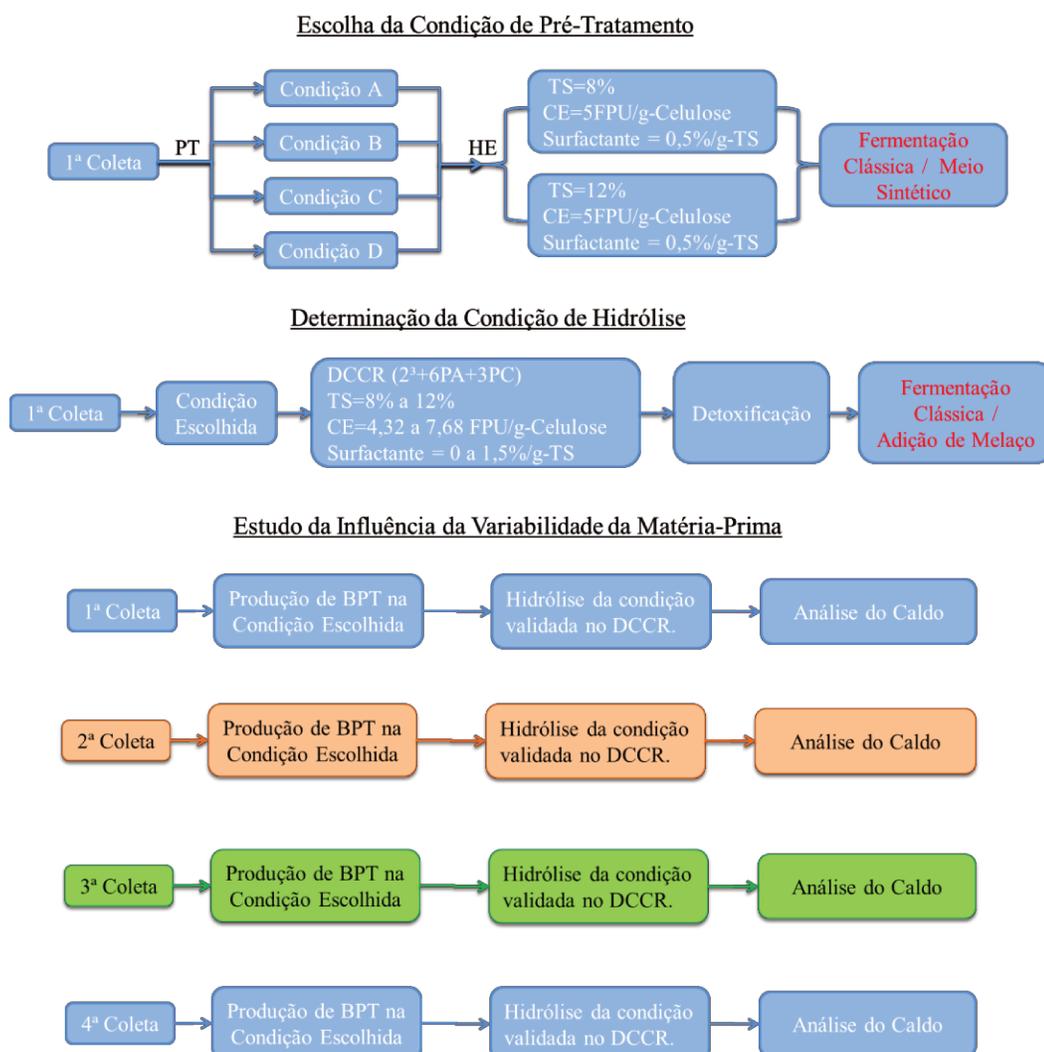


Figura 3.1: Fluxograma das etapas do desenvolvimento do trabalho.

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram os seguintes:

<b>Reagente, (Pureza)</b>	<b>Marca</b>
•Ácido Sulfúrico, (95–98%)	Synth
•Ácido dinitro-3,5-salicílico, (99%)	Sigma Aldrich
•Ácido clorídrico, (37,5%)	Sigma Aldrich
•Ácido cítrico mono hidratado, (99,5%)	Synth
•Álcool Etilico, (99,7%)	Merck
•Fenol, (99%)	Vetec
•Hidróxido de sódio, (97%)	Vetec
•Kit Glicose God-Pap	Laborlab
•Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, (99%)	Vetec
•D-(+)-Glicose, ( $\geq 99,5\%$ )	Sigma Aldrich
•D-(+)-Xilose, ( $\geq 99\%$ )	Merck
•D-(-) Frutose, ( $\geq 99\%$ )	Sigma Aldrich
•L-(+)-Arabinose, (99,5%)	Sigma Aldrich
•Glicerol, ( $\geq 99,5\%$ )	Sigma Aldrich
•Furfural, (99%)	Merck
•HMF, (99%)	Sigma Aldrich
•Ácido Acético, ( $\geq 99,5\%$ )	Fmaia

### 3.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para os ensaios experimentais foram:

- Reator de explosão a vapor;
- Autoclave vertical modelo AF 302756 da marca FABBE PRIMAR;
- pHmetro modelo pH Lab827 da marca Metrohm;
- Centrifuga Excelsia II modelo 206BL da marca Fanem;
- Espectrofotômetro modelo DR5000 da marca HACH;
- Agitador mecânico modelo 713 da marca Fisatom;
- Balança modelo PB 8001 da marca Mettler Toledo com precisão de  $\pm 0,01$  g;
- Analisador de umidade por infravermelho modelo IV 2002 da marca Gehaka;
- Banho termostaticado modelo TE-184 da marca Tecnal;
- Banho Maria modelo SS/90/PID da marca Adamo;
- Moinho de facas modelo TE 340 da marca Marconi;
- Mufla modelo Q-318-24 da marca Quimis;
- Estufa para secagem modelo MA 033 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação (shaker) modelo Inova 44 da marca News Brunswick Scientific;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) módulo Alliance da marca Waters, detector de índice de refração modelo 2414, detector UV modelo 2489, e software Empower 3.

### **3.1.3. Matéria Prima**

A matéria-prima para todos os experimentos foi o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina Iracema, localizada no interior do Estado de São Paulo. A extração do caldo nesta usina é feita por moendas. Os tipos de solos dominantes nesta usina apresentam textura argilosa em 55% da área, em segunda ordem, textura média em 25% da área e, em menor área, solos de textura arenosa em 20% da área. Quanto às condições climáticas, a usina encontra-se numa região com baixa deficiência hídrica. Para este, estudo foram realizadas coletas nos períodos de out/10, mai/11, ago/11 e out/11.

### **3.1.4. Enzima**

Neste trabalho, foi utilizado o coquetel enzimático Cellic CTec2, gentilmente cedido pela Novozymes® (Curitiba/PR, Brasil), e sua atividade enzimática foi experimentalmente determinada.

## **3.2. Procedimento Experimental**

### **3.2.1. Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar foi analisado quanto ao teor dos seus principais constituintes, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, utilizando-se metodologia baseada no procedimento analítico padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável Americano (NREL - National Renewable Energy Laboratory) para análise de biomassa (SLUITER et al., 2008). Este procedimento consiste basicamente numa hidrólise ácida em duas etapas com a finalidade de fracionar a biomassa em porções mais facilmente quantificáveis. A lignina é fracionada em material solúvel em ácido e material insolúvel em ácido. O material insolúvel em ácido inclui cinzas e proteínas, as quais são contabilizadas por análise gravimétrica. A lignina solúvel em

ácido é quantificada por espectroscopia na região do UV visível. Durante a hidrólise, os carboidratos poliméricos são hidrolisados nas formas monoméricas, as quais são solúveis no líquido de hidrólise. Estes são, então, mensurados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Cerca de 2,0 g do bagaço de cana-de-açúcar previamente seco ao ar e moído foi pesado em cadinho, previamente tarado, e posteriormente seco em estufa a 105°C por 24h para determinação do teor de umidade. O bagaço seco em estufa foi queimado em bico de Bunsen e posteriormente calcinado em mufla a 575°C por 4h para determinação de cinzas.

Cerca de 300 mg de amostra seca ao ar foram tratados com 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m) por uma hora a 40°C. Em seguida, foram adicionados 84 mL de água para diluir a concentração do ácido para 4%. A mistura foi autoclavada a 121°C por 30 minutos, resfriada e filtrada em cadinho de vidro sinterizado de porosidade número 3, previamente secos a 105°C e pesados. Cerca de 10 mL do filtrado foi neutralizado com carbonato de cálcio e centrifugado a 5000 rpm. O sobrenadante foi analisado quanto aos teores de açúcares por CLAE utilizando uma coluna BIORAD HPX-87P e água a 0,6 mL/min como eluente e um detector de índice de refração (Waters). O material retido no cadinho foi lavado com 50 mL de água, seco em estufa a 105°C por 4h. O material remanescente no cadinho foi pesado e corresponde à fração da biomassa insolúvel em ácido, ou seja, lignina insolúvel (Klason) e parte do material inorgânico. Em seguida, esse material foi calcinado na mufla a 575°C por 4h, resfriado e pesado. Por diferença de massa, foi determinada a lignina insolúvel em ácido.

### **3.2.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço utilizado nos experimentos foi fornecido pela Usina Iracema. Após a coleta, os sacos de bagaço foram pesados e suas massas foram ajustadas para 8 kg, no laboratório do CTC. Em seguida, uma amostra de 500 g foi separada para determinação da umidade e caracterização (análise composicional). Os experimentos de pré-tratamento foram realizados em reator de Explosão a Vapor (“*Steam Explosion*”), com capacidade volumétrica de 65 litros, apresentado na Figura 3.2.



Figura 3.2: Reator de pré-tratamento “Steam Explosion”.

Primeiramente, o reator foi aquecido pela injeção de vapor, mediante vários procedimentos sucessivos de pressurização (em torno de 17 kgf/cm<sup>2</sup>) e descompressão súbita. Em seguida, o reator foi carregado com 8 kg de bagaço, fechado e iniciada a injeção de vapor para degasagem (purga dos gases inertes), o que levou aproximadamente 30 s. A válvula de degasagem foi fechada e a pressurização do reator até a pressão desejada foi iniciada. Atingida a pressão desejada, iniciou-se a contagem do tempo de patamar requerido e ao final foi realizada a descompressão súbita do reator (Os dados de operação estão apresentados na Tabela 4.1 do Capítulo Resultados e Discussões). A biomassa pré-tratada é separada do vapor, no ciclone acoplado ao reator, onde é posteriormente coletada. Todo o procedimento operacional do reator é padronizado e descrito no POP PDU 003 (Protocolo Operacional Padrão) do equipamento. A biomassa coletada abaixo do ciclone foi pesada e foram realizadas amostragens de cada experimento para posterior análise no laboratório. Após cada experimento, foi feita a pressurização e despressurização do reator vazio para limpeza do sistema, removendo parte do material que poderia ter ficado na tubulação entre o reator e o ciclone.

O cálculo da severidade aplicada ao sistema de pré-tratamento foi efetuado mediante a equação 3.1, segundo HONGQIANG e HONGZHANG, (2008).

$$R_o = \int_{t_1}^{t_2} \exp\left(\frac{(T-100)}{14,75}\right) \quad (3.1)$$

onde:  $R_o$  é o fator de severidade;  $t_1$  e  $t_2$  representam os tempos inicial e final da reação (min) e  $T$  é a temperatura da reação ( $^{\circ}\text{C}$ ) no tempo  $t$ .

### 3.2.3. Caracterização do Bagaço Pré-tratado

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

A fração sólida insolúvel, constituída por celulose, lignina, hemicelulose residual e cinzas, foi submetida à análise composicional seguindo o mesmo procedimento descrito para o bagaço de cana-de-açúcar (seção 3.2.1).

O pH do bagaço pré-tratado foi medido no líquido obtido após prensagem de 100g do material.

### 3.2.4. Atividade Enzimática

A determinação da atividade enzimática (FPU/mL) do coquetel enzimático utilizado neste trabalho foi realizada mediante metodologia experimental descrita por GHOSE, 1987.

### 3.2.5. Hidrólise Enzimática da Celulose do Bagaço Pré-tratado

O bagaço pré-tratado foi utilizado na hidrólise enzimática exatamente como obtido na etapa de pré-tratamento, ou seja, não foi realizada nenhuma etapa de preparação como, por exemplo, lavagem para remoção de sólidos solúveis, constituídos principalmente de hemicelulose solubilizada na forma de xilose e produtos de degradação. O reator utilizado possui agitação mecânica com pás anguladas em 45°, e o volume de trabalho foi de 500 mL. O procedimento para realização dos ensaios de hidrólise enzimática consistiu em carregar o reator com quantidades suficientes de bagaço pré-tratado, de surfactante Tween 20 (quando necessário), solução tamponante (citrato de sódio 100 mM) e água para resultar nos teores desejados de cada componente. Neste momento, procedia-se com a adição da solução enzimática e o processo era efetivamente iniciado. Ao longo do tempo, alíquotas eram retiradas para acompanhamento da liberação de glicose no meio reacional. Ao final do experimento, a suspensão era filtrada para separação da celulignina residual do caldo hidrolisado.

Todas as amostras eram então submetidas à análise de carboidratos por CLAE. A conversão de celulose em glicose monomérica era, então, calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\eta = \frac{M_{Glicose\ Experimental} - M_{Branco}}{M_{Celulose} * f} * 100\% \quad (3.2)$$

onde:  $M_{Glicose\ Experimental}$  é a massa de glicose presente no caldo hidrolisado;  $M_{Branco}$  é a massa de glicose medida imediatamente antes da adição de enzima;  $M_{Celulose}$  é a massa inicial de celulose presente na fibra do bagaço pré-tratado;  $f$  é o fator de conversão de celulose em glicose ( $f = 180/162 = 1,111$ ).

### 3.2.6. Detoxificação do Caldo Hidrolisado

O processo de detoxificação dos caldos hidrolisados obtidos na etapa de hidrólise consistiu em utilizar 100 mL de caldo, corrigir o pH para aproximadamente 7, em seguida adicionar 2 g de carvão ativado, manter a 50°C por 20 min, com agitação esporádica tampado. Após este período, os caldos foram filtrados em papel de filtro, para separar a fração sólida.

### 3.2.7. Fermentação do Caldo Hidrolisado

#### 3.2.7.1. Fermentação Suplementada com Glicose e Nutrientes.

Os caldos hidrolisados obtidos na etapa de hidrólise foram fermentados em batelada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando-se a cepa liofilizada SA-1 e concentração celular de 33,33g/L. O mosto com pH em torno de 5 foi preparado mediante suplementação dos caldos hidrolisados com ureia (5,32g/L), extrato de levedura (6,8g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,4g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5,6g/L) e glicose, para elevar a concentração do mosto à 160g/L. Os ensaios foram realizados em mesa incubadora rotativa à 32°C e 120rpm. Os ensaios foram monitorados até que os frascos atingissem peso constante, indicando o fim do processo fermentativo, este processo demorou aproximadamente 10 horas. Ao final das fermentações, alíquotas foram retiradas, centrifugadas a 14000rpm e analisadas em CLAE para quantificar açúcares iniciais e residuais, glicerol e etanol. O rendimento da glicose consumida foi calculado utilizando-se a Equação 3.3.

$$\eta_{consumido} = \frac{M_{Etanol}}{(M_{GlicoseInical} - M_{GlicoseFinal}) * 0,511} * 100\% \quad (3.3)$$

onde: M<sub>Etanol</sub> é a massa de etanol obtida após a fermentação; M<sub>Glicose Inicial</sub> é a massa de glicose medida no início do ensaio; e M<sub>Glicose Final</sub> é a massa de glicose que presente após a fermentação.

### 3.2.7.2. Fermentação Suplementada com Melaço.

Os caldos hidrolisados obtidos na etapa de hidrólise foram fermentados em batelada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando-se a cepa liofilizada SA-1 e concentração celular de 33,33g/L. Os mostos foram acrescidos com melaço para elevar a concentração do mosto à 175g/L, sem necessidade de suplementação. Os ensaios foram realizados em mesa incubadora rotativa à 32°C e 120rpm e monitorados até que os frascos atingissem peso constante, indicando o fim do processo fermentativo, sendo que este processo demorou aproximadamente 10 horas. Ao final das fermentações, alíquotas foram retiradas, centrifugadas a 14000rpm e analisadas em HPLC para quantificar açúcares iniciais e residuais e etanol. Os rendimentos em relação aos açúcares consumidos e totais foram, então, calculados utilizando-se as Equações 3.4 e 3.5, respectivamente.

$$\eta_{consumido} = \frac{M_{Etanol}}{(M_{ARTInical} - M_{ARTFinal}) * 0,511} * 100\% \quad (3.4)$$

onde:  $M_{Etanol}$  é a massa de etanol obtida após a fermentação;  $M_{ART Inicial}$  é a massa de sacarose, glicose e frutose medida no início do ensaio; e  $M_{ART Final}$  é a massa de sacarose, glicose e frutose que sobraram após a fermentação. Ao calcular a massa de ART para a sacarose foi considerado o fator de conversão, 1,053, desta em glicose e frutose .

$$\eta_{total} = \frac{M_{Etanol}}{M_{ART Inical} * 0,511} * 100\% \quad (3.5)$$

onde:  $M_{Etanol}$  é a massa de etanol obtida após a fermentação; e  $M_{ART Inicial}$  é a massa de sacarose, glicose e frutose medida no início do ensaio, ou seja a concentração de açúcares fornecida. Ao calcular a massa de ART para a sacarose, foi considerado o fator de conversão, 1,053, desta em glicose e frutose.

### **3.2.8. Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática do Bagaço Pré-tratado**

Para avaliar a influência da matéria-prima no processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana, optou-se por investigar uma condição de hidrólise enzimática otimizada, onde foi avaliada a concentração de glicose, assim como a liberação de inibidores no caldo hidrolítico. Para isso, foram verificadas como algumas variáveis de processo influenciam nesta etapa, através de um planejamento DCCR 2<sup>3</sup> (Delineamento Composto Central Rotacional), onde as três variáveis analisadas foram: teor de sólidos (%TS), Concentração enzimática (FPU/g-cel) e concentração de Surfactante % (g/g-BPT).

### **3.2.9. Análises**

#### **3.2.9.1. Determinação da concentração de glicose**

A concentração de glicose dos caldos hidrolisado inicialmente foi determinada de acordo com o método enzimático Glicose GOD-PAP, descrito por HENRY (1974), o objetivo desta análise era ter uma resposta rápida antes dos caldos serem analisados em CLAE. O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é subsequentemente usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (PAP).

O procedimento para análise de glicose por via enzimática consistiu em preparar o reagente imediatamente antes de sua utilização, de acordo com o seguinte protocolo: misturar 2,5 mL do reativo de cor ①; 2,5 mL do reativo de cor ②, 45 mL de água destilada e 0,15 mL do reativo enzimático. A seguir, 2 mL deste reagente foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 20µmL da amostra a ser analisada, devidamente diluída. Esta mistura foi posta em banho-maria à 37 °C por 10 minutos e, em seguida, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 505 nm. Este valor foi, então, utilizado para o cálculo da concentração mediante curva de calibração feita com padrões de glicose.

### **3.2.9.2. Determinação da concentração de Glicose, Frutose, Glicerol, Ácido Acético e Etanol.**

Esta metodologia foi utilizada para quantificar as substâncias: Glicose, Frutose, Glicerol, Acido Acético e Etanol de vinhos delevedurados . Esses componentes foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (CLAE - Waters), utilizando-se uma coluna Aminex HPX 87H (BioRad) tendo como eluente (fase móvel) uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 M). O equipamento foi operado com temperatura de forno de 50°C, fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e tempo total de análise de 30 minutos, utilizando-se detector de índice de refração (R.I.).

As amostras foram pesadas, diluídas e filtradas com a finalidade de primeiro garantir que estivessem dentro da faixa da curva de calibração e, segundo, para garantir que estivessem livres de sólidos em suspensão.

### **3.2.9.3. Determinação da concentração de Glicose, Frutose, Arabinose e Xilose.**

Esta metodologia foi utilizada para quantificar as substâncias: Glicose, Frutose, Arabinose e Xilose de caldos hidrolisados e amostras de análise composicional. Esses componentes foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (CLAE - Waters), utilizando-se uma coluna Aminex HPX 87P (BioRad) tendo como eluente (fase móvel) água Mili-Q. O equipamento foi operado com temperatura de forno de 65°C, fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e tempo total de análise de 30 minutos, utilizando-se detector de índice de refração (R.I.).

As amostras foram pesadas, diluídas e filtradas com a finalidade de primeiro garantir que estivessem dentro da faixa da curva de calibração e, segundo, para garantir que estivessem livres de sólidos em suspensão.

#### **3.2.9.4. Determinação da concentração de Furfural e HMF.**

Esta metodologia foi utilizada para quantificar as substâncias: Furfural e HMF de caldos hidrolisados e amostras de análise composicional. Esses componentes foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (CLAE - Waters), utilizando-se uma coluna Aminex HPX 87H (BioRad) tendo como eluente (fase móvel uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 M). O equipamento foi operado com temperatura de forno de 65°C, fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e tempo total de análise de 50 minutos, utilizando-se detector UV Waters 2489, com comprimento de onda no valor de 210 nm.

As amostras foram pesadas, diluídas e filtradas com a finalidade de primeiro garantir que estivessem dentro da faixa da curva de calibração e, segundo, para garantir que estivessem livres de sólidos em suspensão.

#### **3.2.10. Análise Estatística dos Resultados.**

A análise estatística do planejamento experimental completo – DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional) da hidrólise enzimática foi realizada com dados experimentais e utilizando o software STATISTICA 12.0, onde foram investigadas as seguintes variáveis: teor de sólidos, concentração enzimática e concentração de surfactante. Para esta análise, foram avaliadas as respostas: concentração de glicose em 48 horas, conversão da celulose em 24 e 48 horas, e concentração dos inibidores HMF, furfural e ácido acético em 48 horas.



## CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Escolha da Condição de Pré-tratamento

A primeira etapa do presente trabalho consistiu em determinar a melhor condição de pré-tratamento. Para isto, foram realizados experimentos de pré-tratamento por explosão a vapor, em reator com capacidade de 65 L instalado no CTC, submetendo-se o bagaço “in natura” a quatro diferentes condições de pré-tratamento. Essas condições foram determinadas fixando-se a pressão em 17 kgf/cm<sup>2</sup> e variando-se o tempo de reação. Para cada condição ensaiada, a severidade aplicada ao sistema reacional foi calculada aplicando-se a Equação 3.1. Os valores obtidos para as severidades, assim como as condições de pré-tratamento são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições e severidades de pré-tratamento por explosão a vapor em escala piloto.

Amostra	Temperatura (°C)	Pressão (kgf/cm <sup>2</sup> )	t <sub>1</sub> (min)	t <sub>2</sub> (min)	Severidade
BPT-A	203,3	17,0	5	8	4,01
BPT-B	203,0	17,0	5	10	4,06
BPT-C	202,2	17,0	3	10	4,05
BPT-D	201,9	17,0	3	12	4,10

t<sub>1</sub>: tempo de aquecimento necessário para se atingir a pressão desejada (rampa); t<sub>2</sub>: tempo no qual o sistema fica sob a pressão desejada (patamar).

Na Tabela 4.1, observa-se que os valores de severidade estão localizados em uma faixa bastante estreita. Contudo, nesses casos, é possível se obter modificações significativas na estrutura final da biomassa pré-tratada, mantendo-se constante a pressão de operação do sistema e manipulando-se apenas o tempo total de reação (t<sub>1</sub> + t<sub>2</sub>). Este fato tem sido cuidadosamente estudado e comprovado no CTC ao longo do desenvolvimento do projeto etanol de celulósico, que está em andamento desde 2007. Por esta razão, esta estreita faixa de severidade tem sido aqui explorada em maiores detalhes.

Em seguida, as caracterizações da biomassa de partida e do material pré-tratado foram determinadas. Para o bagaço “in natura”, os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram calculados diretamente da amostra integral. Para os bagaços pré-tratados (BPTs), os cálculos

foram efetuados em duas etapas: 1) a partir do teor de sólidos insolúveis (SI e/ou fibras) e 2) a partir do teor de sólidos solúveis (SS) presentes nas amostras. Os resultados da análise composicional do bagaço “in natura” (padrão de comparação e material de partida) e dos bagaços pré-tratados estão apresentados nas Tabela 4.2 (sólidos insolúveis) e Tabela 4.3 (sólidos solúveis).

Tabela 4.2: Análise composicional dos bagaços “in natura” e pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos insolúveis.

Amostra	Sólidos Insolúveis (%BPT)	Celulose (%SI)	Hemicelulose (%SI)	Lignina (%SI)
“in natura”	--	40,57	25,09	22,71
BPT-A	75,95	58,32	4,80	31,64
BPT-B	79,64	58,11	4,03	33,04
BPT-C	79,01	58,33	4,81	32,42
BPT-D	81,69	57,83	3,83	33,56

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.2, é possível observar diferenças significativas nos teores de celulose, hemicelulose e lignina quando materiais “in natura” e pré-tratados são comparados. Essas diferenças se devem, principalmente, à majoritária solubilização da hemicelulose presente no bagaço “in natura” após a realização do pré-tratamento, o que reduz, de fato, a massa total de material insolúvel. Por esta razão, pode-se dizer que, na verdade, tais diferenças são de ordem apenas relativa e não absoluta, uma vez que o pré-tratamento praticamente não promove alterações no conteúdo de celulose e lignina.

Tabela 4.3: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos solúveis.

Amostra	Sólidos Solúveis (%BPT)	Glicose (%SS)	HMF (%SS)	Xilose (%SS)	Furfural (%SS)	Ácido Acético (%SS)
BPT-A	24,05	10,84	0,62	58,48	2,65	13,93
BPT-B	20,36	11,94	1,12	49,32	6,39	22,51
BPT-C	20,99	12,88	0,23	58,89	3,13	21,24
BPT-D	18,31	12,39	0,77	45,48	7,69	12,54

Os resultados apresentados na Tabela 4.3 comprovam que grande parte da hemicelulose foi solubilizada durante os pré-tratamentos realizados. Parte da hemicelulose solubilizada foi efetivamente convertida em xilose, embora compostos de degradação como furfural, e a liberação de ácido acético também tenham sido detectados. Além disso, pode-se também observar uma degradação da fração celulose a HMF, embora bem menos expressiva que àquela observada para a hemicelulose. O fenômeno de degradação observado durante o pré-tratamento é definitivamente indesejado, independentemente da fração em questão.

Após realização dos pré-tratamentos, balanços de massa foram elaborados para avaliação da recuperação/degradação da celulose e hemicelulose após esta etapa, fornecendo uma indicação de grau de modificação dessas frações. Na Figura 4.1, são apresentados os balanços de massa da celulose para as quatro condições estudadas no presente trabalho, a recuperação de açúcares está dividida em Fibra e SS (incluindo glicose mono e oligo).

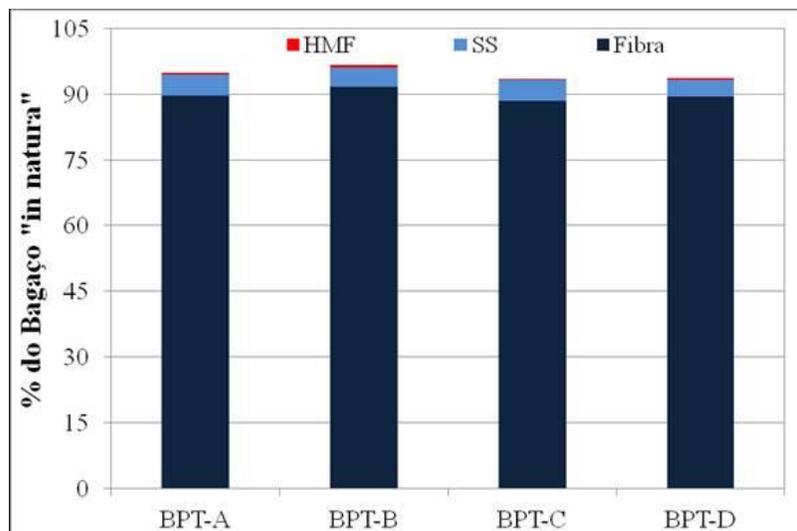


Figura 4.1: Balanço de massa para a celulose após pré-tratamento em escala piloto.

Sabe-se que durante o processo de pré-tratamento de biomassas por explosão a vapor, operado em batelada, como o empregado neste trabalho, pode ocorrer volatilização de alguns produtos de degradação gerados, dependendo, principalmente, da severidade aplicada. Por esta razão, torna-se razoável o fato de que na maioria dos sistemas investigados não é possível realizar balanços de massa com elevada precisão. Além disso, pode-se ainda observar na Figura 4.1 que não ocorreu degradação significativa da fração celulósica, sendo determinados apenas traços de HMF, com recuperação desta fração na fibra em torno de 90% para todos os pré-tratamentos realizados. Esta alta recuperação da celulose na fibra é totalmente desejável, sobretudo quando se considera o conceito de biorrefinaria, onde enquanto a celulose é utilizada para a produção de etanol celulósico, a hemicelulose e a lignina são usadas para outros fins. Na sequência, novos balanços de massa foram realizados, agora para a hemicelulose. Os resultados obtidos estão mostrados Figura 4.2, a recuperação de açúcares está dividida em Fibra e SS (incluindo xilose e arabinose mono e oligo).

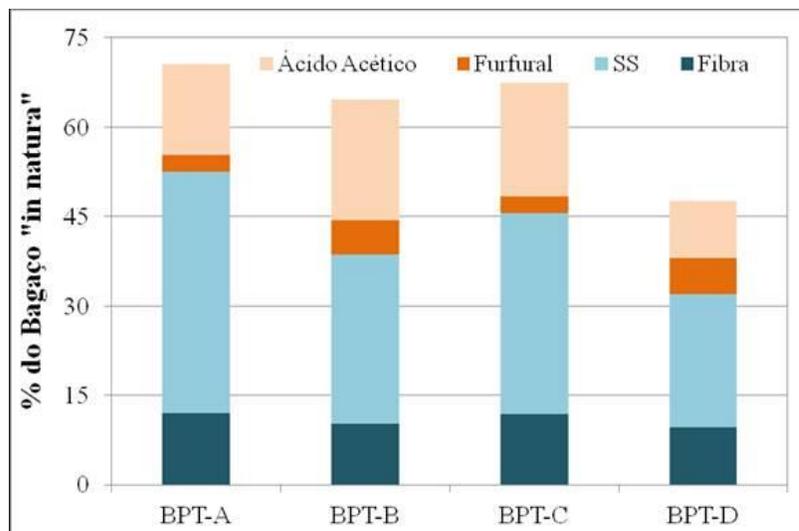


Figura 4.2: Balanço de massa para a hemicelulose após pré-tratamento em escala piloto.

Na Figura 4.2 é possível notar a ocorrência de uma elevada degradação da hemicelulose, para todos os pré-tratamentos realizados, variando entre 15% (BPT-D) e 26% (BPT-B), uma vez que uma baixa recuperação deste componente na fibra e nos sólidos solúveis foi alcançada. O pré-tratamento que propiciou maior recuperação de hemicelulose foi o BPT-A, com 52,5%. Observa-se ainda, na Figura 4.2 que não foi possível obter precisão no fechamento do balanço de massa, devido, possivelmente, a fatores que não foram mensurados neste trabalho como, por exemplo, a volatilização de componentes gerados após pré-tratamento, perda de carga na tubulação do reator, perdas físicas durante a explosão, etc.

Concluída a etapa de pré-tratamento, os bagaços pré-tratados obtidos foram submetidos à hidrólise enzimática em condições previamente estabelecidas (8% e 12% de sólidos totais; carga enzimática de 5FPU/g-celulose de celulase; 0,5% Surfactante/g-TS; pH 4,8; 50°C e 48 horas de reação). O surfactante foi utilizado com o intuito de reduzir a adsorção da enzima na matriz lignocelulósica e assim utilizar uma carga enzimática menor. Para cada condição ensaiada, a conversão do sistema reacional foi calculada utilizando-se a Equação 3.2. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Conversões obtidas nas reações de hidrólise enzimática de bagaços pré-tratados em escala piloto com teores de sólidos de 8% e 12%, carga enzimática de 5FPU/g-celulose, 0,5%Surfactante/-TS e 48 horas totais de reação (experimentos realizados em duplicata).

Amostra	8% de sólidos		12% de sólidos	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
BPT-A	48,56	69,54	37,43	54,25
BPT-B	41,40	58,77	39,06	54,44
BPT-C	40,25	56,57	35,56	53,10
BPT-D	43,60	60,72	36,28	53,18

Na Tabela 4.4, é possível observar que, invariavelmente, as hidrólises realizadas com 8% de sólidos resultaram em valores de conversão superiores àqueles observados para os sistemas operando com 12% de sólidos. Esses resultados podem estar associados à homogeneização facilitada de sistemas com teor de sólidos reduzido, uma vez que, nesta situação, o encontro da enzima com seu substrato específico é favorecido e, assim, o processo catalítico ocorre de modo mais natural e rápido. Além disso, quando se opera sistemas com baixo %TS, os sítios de adsorção da enzima à lignina também são reduzidos e, deste modo, a concentração de enzima atuando no meio reacional tende a se aproximar da concentração real. Isto significa que, quando a adsorção da enzima à lignina é evitada, praticamente toda a enzima presente no meio está efetivamente comprometida com a catálise. Para hidrólises realizadas com 8% de sólidos, o sistema que forneceu o melhor resultado foi o BPT-A, onde se atingiu quase 70% de conversão em 48 horas de reação. Os ensaios realizados com 12% de sólidos, não apresentaram grandes diferenças entre eles, atingindo, na média, em torno de 37% em 24 horas e 54% em 48 horas. Esses valores são considerados bastante satisfatórios, pois nesta situação, tem-se 50% a mais de substrato no reator que os sistemas com 8%. Nesses casos, a produtividade é significativamente melhorada, o que permite que uma maior quantidade de produto final seja produzida por batelada, além de impactar diretamente no tamanho dos equipamentos necessários ao escalonamento deste processo. Os resultados obtidos com 12% de sólidos indicam, portanto, que esta abordagem favorece a busca por um caminho que possibilite a viabilidade técnica e econômica do processo de produção de etanol celulósico.

Após a realização das hidrólises enzimáticas, a fermentabilidade dos caldos hidrolisados obtidos foi ensaiada de modo a se verificar se as condições de pré-tratamento empregadas possibilitariam a obtenção de caldos hidrolisados capazes de serem convertidos em etanol, mediante uso de processo convencional de fermentação. Para tal, um ensaio foi realizado na ausência de caldo hidrolisado (meio sintético/ensaio-referência) e denominado como Branco. Com esses ensaios, seria possível também, averiguar se o aumento do teor de sólidos na etapa de hidrólise acarretaria maior concentração de possíveis compostos inibidores, o que prejudicaria o processo fermentativo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Dados experimentais e rendimentos obtidos em ensaios de fermentação de caldos hidrolisados suplementados com glicose, em *shaker* (frascos agitados) a 32°C, pH 5,0 e tempo total de 10 horas. Concentração inicial de substrato, 160g/L. Meio padrão (“Branco”) e cultivos suplementados com glicose.

Amostra	Glicose Consumida (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento (%)
BPT-A_12%	148,60	0,45	6,61	73,14	91,95
BPT-B_12%	140,62	0,90	6,40	73,88	97,74
BPT-C_12%	143,72	0,42	6,41	73,67	95,76
BPT-D_12%	142,51	1,02	6,73	74,87	97,51
BPT-A_8%	155,16	0,35	7,25	76,7	92,22
BPT-B_8%	147,79	0,71	7,20	68,44	86,02
BPT-C_8%	154,56	1,28	7,22	69,52	83,43
BPT-D_8%	153,25	1,10	6,82	77,34	93,91
Branco	153,97	2,06	9,08	76,26	90,39

Em geral, o desempenho da fermentação dos caldos hidrolíticos atingiram rendimentos similares àquele observado para o Branco (~90%), indicando que os caldos produzidos neste trabalho são adequados à produção de etanol a partir do aproveitamento de biomassa de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que alterações em parâmetros de processo combinados, como, por exemplo, tempo de pré-tratamento (severidade) e teor de sólidos na hidrólise enzimática podem influenciar na produção final de etanol celulósico. Dentre os pré-tratamentos estudados, os melhores resultados foram obtidos para o BPT-A, uma vez que nesta condição foi possível observar alto nível de recuperação global de hemicelulose, com consequente baixa liberação e/ou formação de compostos inibidores como ácido acético e furfural, respectivamente. Para todos os pré-tratamentos realizados, a recuperação global de celulose foi de aproximadamente 95% (Figura 4.1), o que é bastante interessante. Isto indica que esta fração foi majoritariamente preservada em todas as situações estudadas, o que representa uma característica desejável quando se deseja produzir etanol a partir de biomassas. Na etapa de hidrólise, o caldo obtido com o BPT-A também foi aquele no qual os valores mais elevados de conversão de celulose em glicose foram atingidos, tanto para ensaios realizados com 8% quanto com 12%. Para as demais amostras, conversões similares foram atingidas, alcançando-se valor médio de 57% para 8% de sólidos e 54% para 12%. A fermentabilidade de todos os caldos obtidos foi bastante satisfatória, atingindo-se rendimentos semelhantes ao observado para o ensaio em branco, na média, em torno de 90%.

#### **4.2. Determinação da Condição de Hidrólise Enzimática da Celulose.**

Após a escolha do pré-tratamento na seção 4.1, a próxima etapa deste trabalho foi determinar uma condição de hidrólise enzimática, que após o processo combinasse as seguintes características desejáveis para um caldo hidrolítico: alta liberação de glicose com baixa concentração de compostos inibidores para a fermentação, após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Com este propósito, um planejamento experimental completo – DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional) foi realizado investigando as seguintes variáveis: teor de sólidos, concentração enzimática e concentração de surfactante, sendo definido o tempo de hidrólise em 48 horas.

A relação entre as variáveis estudadas e a viabilidade econômica desta etapa do processo é grande. Quando se avalia o teor de sólidos é possível observar que quanto maior ele for, menor o tamanho do reator, e conseqüentemente o investimento em equipamentos será reduzido. Para a concentração enzimática e de surfactante, quanto menor a quantidade necessária destes insumos menor serão os custos envolvidos na operação desta etapa e impactando diretamente no custo final de produção do etanol.

O planejamento dos experimentos está apresentado nas Tabela 4.6 e 4.7.

Tabela 4.6: Valores utilizados no DCCR para as três variáveis.

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
%TS	1	8	8,81	10	11,19	12
C. Enz. (FPU/g-cel)	2	4,32	5	6	7	7,68
% Surfactante (g/g-TS)	3	0	0,30	0,75	1,20	1,5

É importante destacar que os limites de operação de cada uma das variáveis estudadas neste planejamento experimental foram definidos tendo-se em mente sempre a questão da viabilidade técnico-econômica do processo, e que por esta razão não foram utilizadas altas concentrações de enzima e surfactante. A escolha do limite superior do teor de sólidos foi definida pela limitação do reator utilizado.

Tabela 4.7: Matriz de planejamento completo codificado para a hidrólise enzimática.

Ensaio	%TS	C. Enz. (FPU/g-cel)	% Surfactante (g/g-TS)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

As conversões obtidas nos experimentos estão apresentadas na Figura 4.3.

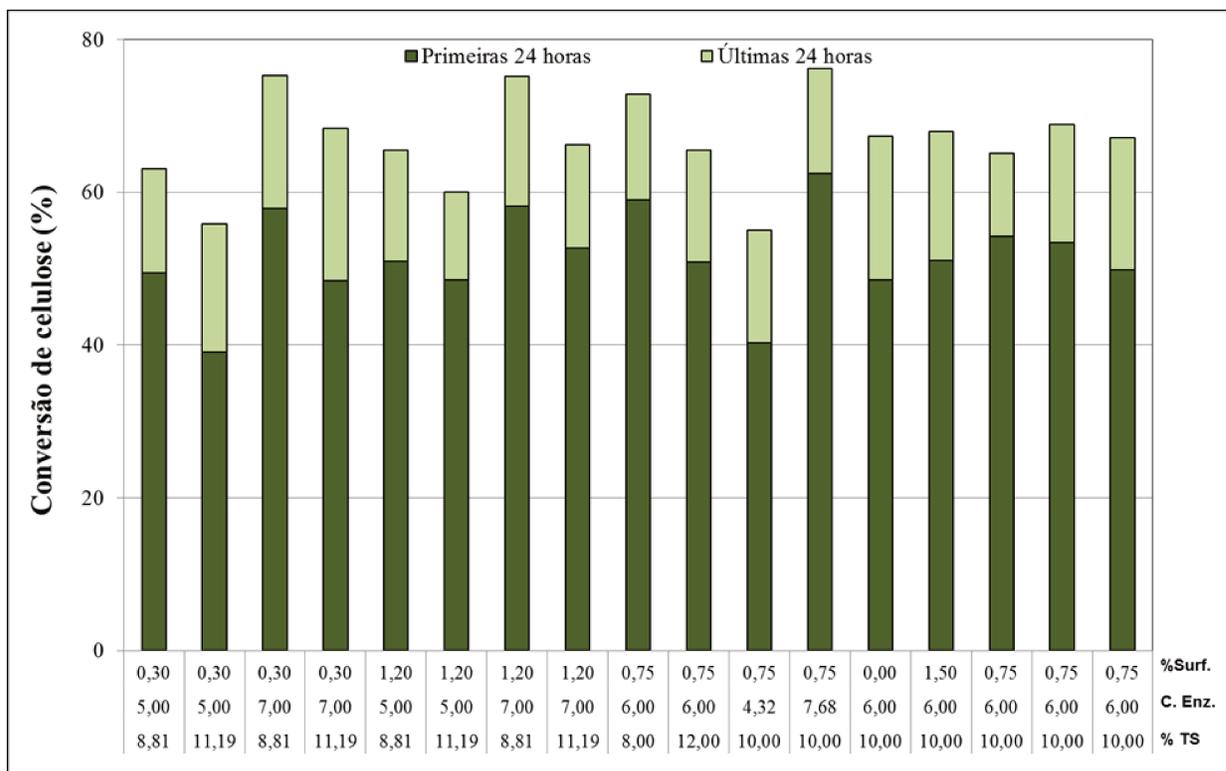


Figura 4.3: Conversões obtidas nos experimentos de hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima Cellic CTec2. Condições experimentais: pH 4,8 (solução tampão citrato de sódio 100mM), 50°C e tempo total de 48 horas.

Na Figura 4.3, é possível observar que o melhor resultado obtido foi aquele com a mais alta concentração de enzima, com teor de sólidos e concentração de surfactante na média do planejamento. De modo geral, é possível dizer que os resultados obtidos foram satisfatórios uma vez que foram alcançadas conversões superiores a 60% na maioria dos casos. Entretanto, como houve uma variação no teor de sólidos nos ensaios, a concentração de glicose presente no caldo hidrolisado apresenta-se como uma base mais consistente para seleção do melhor resultado, ou seja, aquele que efetivamente tem maior quantidade de glicose para ser fermentada. A Figura 4.4 mostrada, a seguir, apresenta os dados de concentração de glicose para todas as condições ensaiadas.

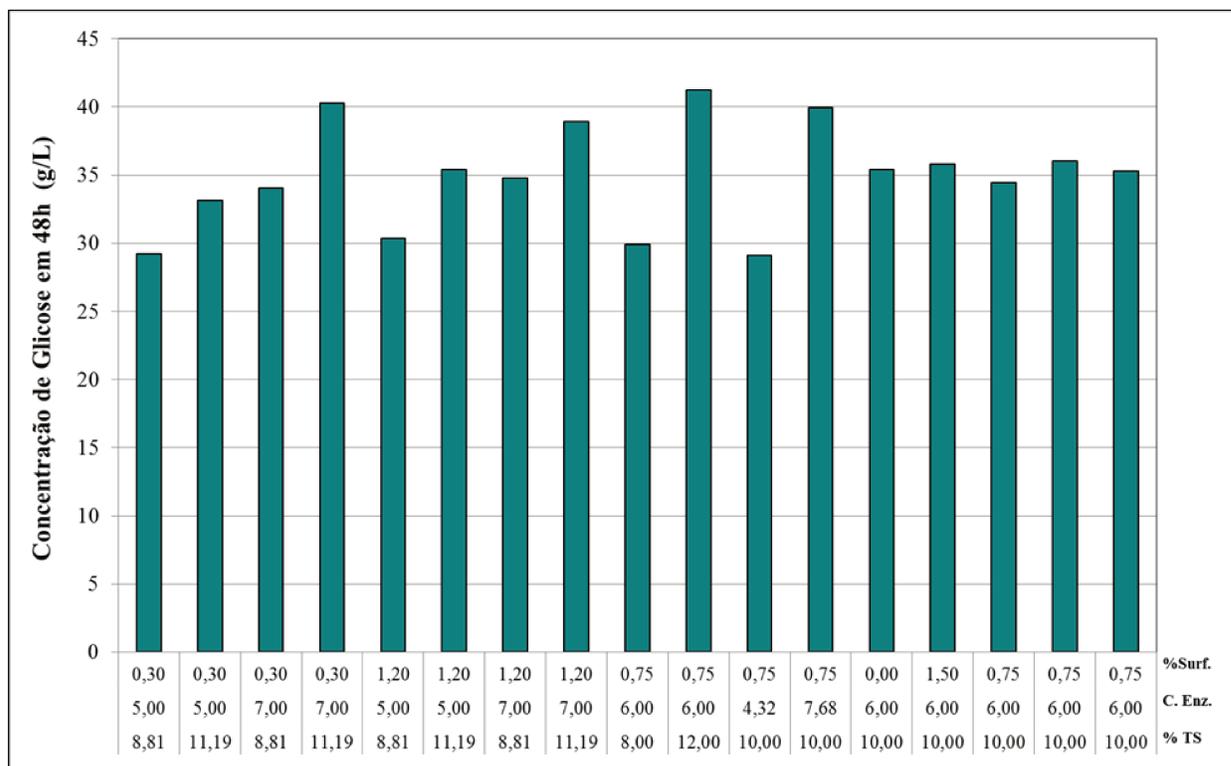


Figura 4.4: Concentrações de glicose alcançadas em 48 horas nos experimentos do DCCR da hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima Cellic CTec2.

Avaliando-se a Figura 4.4, observa-se que os experimentos que forneceram maior concentração de glicose não foram necessariamente os mesmos que apresentaram as maiores conversões. Visivelmente, a concentração de glicose nos ensaios está diretamente associada ao teor de sólidos no reator, enquanto a conversão tem relação mais estreita com a carga enzimática.

Um ponto importante considerado neste trabalho é o desenvolvimento de um processo que combine a liberação de glicose com baixa concentração de compostos inibidores para a fermentação. Estes inibidores podem ser divididos em três grupos principais: ácidos orgânicos, derivados furanos (Furfural e HMF) e compostos fenólicos. Na Tabela 4.8, estão apresentadas as concentrações de três compostos avaliados neste estudo.

Tabela 4.8: Concentrações de HMF, Furfural e Ácido Acético encontradas nos caldos hidrolisados finais dos experimentos do DCCR.

Ensaio	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Ácido Acético (g/L)
1	0,52	0,49	3,75
2	0,61	0,62	4,91
3	0,50	0,53	3,90
4	0,62	0,66	4,79
5	0,54	0,59	4,43
6	0,65	0,72	5,09
7	0,58	0,58	4,17
8	0,57	0,66	4,88
9	0,46	0,47	3,38
10	0,71	0,76	5,20
11	0,56	0,57	4,41
12	0,59	0,66	4,90
13	0,61	0,60	4,56
14	0,57	0,58	4,78
15	0,59	0,63	4,27
16	0,57	0,61	4,78
17	0,54	0,58	4,47

Ao observar as concentrações apresentadas na Tabela 4.8, observa-se valores inferiores a 0,80 g/L dos compostos HMF e furfural, que de acordo com TEODORO et al., (2013) valor que não apresenta influência significativa sobre a fermentação. Para o ácido acético, tem-se a concentração variando entre 3,38 e 5,20 g/L, sendo estes valores considerados com forte influência sobre a fermentação.

Para verificar a relação entre as variáveis do processo (teor de sólidos, concentração de enzima e teor de surfactante) e as respostas obtidas em 48 horas de reação (conversão e as concentrações de glicose, ácido acético, furfural e HMF) foram realizadas análises estatísticas utilizando o software STATISTICA 12.0. Essas análises foram realizadas em duas etapas, uma tendo em vista a obtenção de glicose (conversão e concentração), e a outra avaliando a quantidade de inibidores presentes no caldo hidrolisado, seções 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente.

#### 4.2.1. Análise Estatística da Conversão e Concentração de Glicose dos Caldos Hidrolisados.

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando o erro puro. Para dizer se a variável é significativa ou não, foram utilizados os parâmetros estatísticos t e p. O nível de confiança para essas análises foi de 90,0%, o que corresponde a um valor de  $p < 0,10$ . O valor de t mostra o quão grande é o valor do efeito em relação ao seu desvio padrão. Através dos resultados obtidos para a conversão foram calculados os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4. 9.

Tabela 4. 9: Coeficientes de regressão para a conversão obtida na hidrólise enzimática.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	67,14	1,06	63,26	<b>0,0002*</b>	64,04	70,24
%TS (L)	-3,00	0,99	-6,02	<b>0,0265*</b>	-8,92	-3,09
%TS (Q)	0,47	1,09	0,86	0,4823	-2,27	4,15
C. Enz. (L)	5,58	0,99	11,19	<b>0,0079*</b>	8,25	14,08
C. Enz. (Q)	-0,80	1,09	-1,46	0,2824	-4,81	1,61
% Surfactante(L)	0,40	0,99	0,79	0,5111	-2,12	3,70
% Surfactante (Q)	-0,09	1,09	-0,17	0,8820	-3,39	3,02
1 * 2	-0,41	1,303	-0,63	0,5926	-4,63	2,98
1 * 3	-0,05	1,30	-0,08	0,9414	-3,91	3,69
2 * 3	-1,11	1,30	-1,70	0,2312	-6,02	1,59

\*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Analisando a Tabela 4. 9, observa-se que apenas os termos lineares das variáveis %TS e C. Enz. foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 90%. Sendo assim os demais efeitos e as interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 4. 10. Para que um modelo seja considerado estatisticamente significativo e possa ser usado para fins preditivos, o valor de F calculado para verificar a significância da regressão deve ser maior do que o tabelado, e p-valor  $\leq 0,10$ .

De acordo com a análise de variância (ANOVA) da Tabela 4. 10 observa-se que o valor do teste F calculado é superior ao tabelado, e que o p-valor é inferior a 0,0001. Assim, o modelo obtido é estatisticamente significativo para a conversão obtida na hidrólise enzimática.

Tabela 4. 10: Análise de variância (ANOVA) para a conversão obtida na hidrólise enzimática.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	548,184	2	274,0920	72,589	<0,0001
<b>Resíduos</b>	52,863	14	3,776		
<b>TOTAL</b>	601,047	16			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 91,20%

$F_{2,14;0,10}=2,179$

A conversão da hidrólise enzimática pode ser descrita pela Equação 4.1. Os valores de teor de sólidos (TS) e concentração de enzima (C. Enz.) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$\text{Conversão (\%)} = 66,81 - 3,01 * \text{TS} + 5,58 * \text{C. Enz.} \quad (4.1)$$

As superfícies de resposta, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas na Figura 4.5.

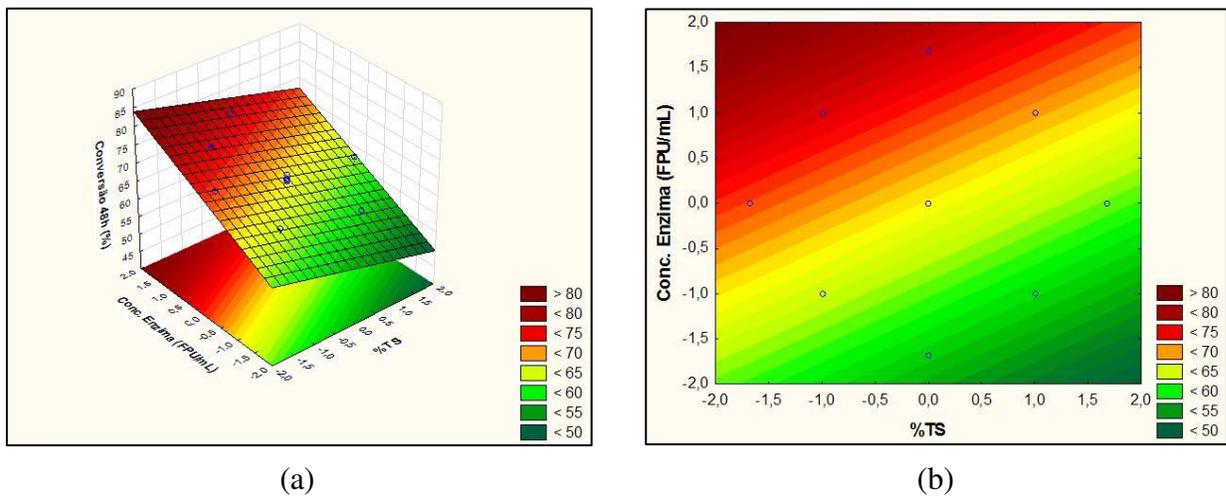


Figura 4.5: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a conversão obtida na hidrólise enzimática em função da concentração de enzima e teor de sólidos (a) e (b).

Analisando-se a Figura 4.5, nota-se a influência das variáveis, teor de sólidos e concentração de enzimas, na hidrólise enzimática, com relações inversamente proporcionais sobre o resultado final. O aumento da concentração enzimática aumenta a conversão. Já o aumento do teor de sólidos diminui a conversão. Observando a Figura 4.5 (b), onde a interação entre essas variáveis está demonstrada, é possível prever que conversões superiores a 70% podem ser alcançadas quando se usa o valor codificado igual a 1 para ambas as variáveis.

Como já discutido anteriormente, a concentração de glicose presente no caldo hidrolisado apresenta-se como uma base mais consistente para seleção do melhor resultado, uma vez que, ela representa efetivamente que ensaio tem maior quantidade de glicose para ser fermentada, e isto está diretamente relacionado ao teor de sólidos nos ensaios.

Deste modo, a análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando os mesmos parâmetros que para a conversão, e com os resultados obtidos para a concentração de glicose foram calculados os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Coeficientes de regressão para a concentração e glicose presente no caldo hidrolisado.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	35,30	0,45	77,97	<b>0,0002*</b>	33,98	36,63
%TS (L)	2,82	0,43	13,24	<b>0,0057*</b>	4,39	6,88
%TS (Q)	-0,05	0,47	-0,20	0,8616	-1,46	1,28
C. Enz. (L)	2,79	0,43	13,09	<b>0,0058*</b>	4,33	6,81
C. Enz. (Q)	-0,43	0,47	-1,82	0,2112	-2,22	0,52
% Surfactante(L)	0,25	0,43	1,19	0,3550	-0,73	1,75
% Surfactante (Q)	-0,04	0,47	-0,15	0,8930	-1,44	1,30
1 * 2	0,18	0,56	0,65	0,5812	-1,26	1,99
1 * 3	-0,11	0,56	-0,41	0,7219	-1,85	1,40
2 * 3	-0,50	0,56	-1,80	0,2130	-2,63	0,62

\*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Analisando a Tabela 4.11, observa-se que assim como para a conversão, apenas os termos lineares das variáveis %TS e C. Enz. foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 90%. Logo, os demais efeitos e as interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

A análise da variância (ANOVA) é mostrada na Tabela 4.12. Como já dito, para que um modelo seja considerado estatisticamente significativo e possa ser usado para fins preditivos, o valor de F calculado para verificar a significância da regressão deve ser maior do que o tabelado, e  $p\text{-valor} \leq 0,10$ . A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.12 mostra que o valor do teste F calculado é superior ao tabelado, e que o p-valor é inferior a 0,0001. Sendo assim, o modelo obtido é estatisticamente significativo para a conversão obtida na hidrólise enzimática.

Tabela 4.12: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose presente no caldo hidrolisado.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	p-valor
Regressão	214,093	2	107,047	103,787	<0,0001
Resíduos	14,440	14	1,031		
<b>TOTAL</b>	<b>228,533</b>	<b>16</b>			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 93,68%

$F_{2,14;0,10}=2,179$

A concentração de glicose presente no caldo hidrolisado pode ser descrita pela Equação 4.2. Os valores de teor de sólidos (TS) e concentração e Enzima (C. Enz.) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$C. \text{ Glicose (g/L)} = 34,89 + 2,82 * TS + 2,79 * C. \text{ Enz.} \quad (4.2)$$

As superfícies de resposta, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas na Figura 4.6.

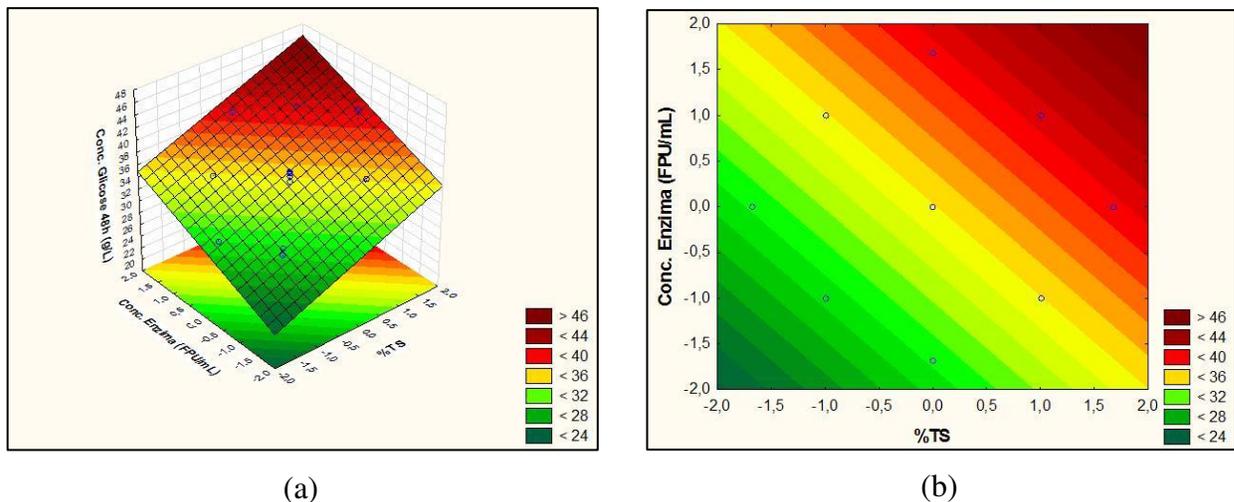


Figura 4.6: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração e glicose presente no caldo hidrolisado em função da concentração de enzima e teor de sólidos (a) e (b).

Analisando-se a Figura 4.6, se verifica que a influência das variáveis, teor de sólidos e concentração de enzimas, na hidrólise enzimática são diretamente proporcionais sobre o resultado final, uma vez que ao se aumentar o valor de ambas, maiores concentrações de glicose no caldo hidrolisado final são obtidas. Novamente focando a análise na Figura 4.6 (b), onde a interação entre essas variáveis está demonstrada, é possível prever que concentrações superiores a 40 g/L podem ser alcançadas quando se usa o valor codificado igual a 1 para ambas as variáveis.

Assim como para os resultados apresentados para a conversão, a concentração de surfactante não foi estatisticamente significativa para os níveis estudados para a concentração de glicose. Tendo-se em mente a viabilidade técnico-econômica do processo, não existe a necessidade de adição deste insumo no processo, já que o mesmo não promove mudança no resultado final.

Os resultados apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6 demonstram claramente que a concentração de glicose nos ensaios está diretamente associada ao teor de sólidos no reator enquanto a conversão tem relação mais estreita com a carga enzimática, sendo assim, estes pontos serão considerados na definição da melhor condição para a hidrólise enzimática.

#### **4.2.1.1. Validação Experimental dos Modelos Estatísticos Determinados para Conversão e Concentração de Glicose dos Caldos Hidrolisados.**

A partir das análises da superfície de resposta, foi possível determinar as condições de processo em que se obtêm simultaneamente aumento na concentração de glicose e elevado rendimento de processo. Tais condições de processo são apresentadas na Tabela 4. 13, valores em que as variáveis proporcionam as características desejadas do processo, ou seja:

- i) Rendimento do processo deve ser superior a 70% e, obviamente, inferior a 100%
- ii) A concentração de glicose no caldo deve ser tal, que seja possível obter uma alta conversão quando se utiliza um teor de sólidos mais elevado.

Tabela 4. 13: Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para a validação dos modelos.

Variáveis	Condição experimental	Valor codificado
%TS	12	1,68
C. Enz. (FPU/g-cel)	6	0
% Surfactante (g/g-TS)	0	-1,68

Na Tabela 4. 14 encontram-se os resultados preditos e observados obtidos pelo ensaio de validação experimental. Para a concentração de glicose, o resultado experimental assemelha-se ao resultado predito. Porém para a conversão, observa-se maior imprecisão do modelo na predição dos dados experimentais. Estes erros de predição devem-se principalmente à simplicidade dos modelos estatísticos, sendo em valores absolutos iguais a 12% para a conversão e a 7% para a concentração de glicose.

Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios. Tais resultados mostram que a utilização do planejamento experimental promove a otimização de mais de uma resposta, estabelecendo condições que garantam o resultado desejado para o processo final.

Tabela 4. 14: Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo de processo.

Variável de resposta	Resultado Predito <sup>(*)</sup>	Resultado experimental
Conversão (%)	61,75	69,62
Concentração de glicose (g/L)	39,63	42,30

(\*) Modelos reparametrizados, constituídos apenas dos parâmetros estatisticamente significativos.

#### 4.2.2. Análise Estatística das Concentrações de Ácido Acético, Furfural e HMF dos Caldos Hidrolisados.

Como já exposto anteriormente, o compromisso deste trabalho é desenvolvimento de um processo que combine a liberação de glicose com baixa concentração de compostos inibidores para a fermentação. Por esta razão, a concentração dos principais compostos foi determinada e nesta etapa será realizada a análise dos efeitos principais e de interação das variáveis considerando o erro puro, os demais parâmetros serão os mesmo utilizados na análise estatística para a conversão e concentração de glicose. Em posse das concentrações de ácido acético, furfural e HMF (Tabela 4.8) foram calculados os coeficientes de regressão para cada composto, e os mesmos estão apresentados nas Tabelas 4.15, 4.16 e 4.17.

Tabela 4.15: Coeficientes de regressão para a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	4,51	0,15	30,46	<b>0,001*</b>	4,08	4,94
%TS (L)	0,47	0,14	6,82	<b>0,021*</b>	0,54	1,36
%TS (Q)	-0,09	0,15	-1,15	0,370	-0,62	0,27
C. Enz. (L)	0,03	0,14	0,40	0,726	-0,35	0,46
C. Enz. (Q)	0,04	0,15	0,54	0,644	-0,36	0,53
% Surfactante(L)	0,12	0,14	1,67	0,236	-0,17	0,64
% Surfactante (Q)	0,05	0,15	0,61	0,605	-0,35	0,54
1 * 2	-0,03	0,18	-0,30	0,791	-0,59	0,48
1 * 3	-0,08	0,18	-0,94	0,448	-0,70	0,36
2 * 3	-0,06	0,18	-0,69	0,563	-0,66	0,41

\*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 4.16: Coeficientes de regressão para a concentração de furfural presente no caldo hidrolisado.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	0,61	0,01	41,84	<b>0,001*</b>	0,56	0,65
%TS (L)	0,07	0,01	10,30	<b>0,009*</b>	0,10	0,18
%TS (Q)	0,00	0,02	0,38	0,740	-0,04	0,05
C. Enz. (L)	0,01	0,01	1,73	0,225	-0,02	0,06
C. Enz. (Q)	0,00	0,02	0,38	0,740	-0,04	0,05
% Surfactante(L)	0,02	0,01	2,33	0,145	-0,01	0,07
% Surfactante (Q)	-0,01	0,02	-0,80	0,508	-0,06	0,03
1 * 2	-0,01	0,02	-0,70	0,555	-0,06	0,04
1 * 3	-0,01	0,02	-0,70	0,555	-0,06	0,04
2 * 3	-0,02	0,02	-2,11	0,170	-0,09	0,01

\*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 4.17: Coeficientes de regressão para a concentração de HMF presente no caldo hidrolisado.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(2)	p-valor	Estimativas por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	0,57	0,01	39,13	<b>0,001*</b>	0,53	0,61
%TS (L)	0,05	0,01	7,85	<b>0,016*</b>	0,07	0,15
%TS (Q)	0,00	0,02	0,55	0,638	-0,04	0,05
C. Enz. (L)	0,00	0,01	0,00	0,997	-0,04	0,04
C. Enz. (Q)	0,00	0,02	0,08	0,945	-0,04	0,04
% Surfactante(L)	0,00	0,01	0,25	0,829	-0,04	0,04
% Surfactante (Q)	0,01	0,02	0,79	0,514	-0,03	0,06
1 * 2	-0,01	0,02	-1,26	0,333	-0,07	0,03
1 * 3	-0,01	0,02	-1,55	0,262	-0,08	0,02
2 * 3	0,00	0,02	-0,42	0,714	-0,06	0,04

\*Valores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Analisando as Tabelas 4.15, 4.16 e 4.17, nota-se que apenas o termo linear para a variável teor de sólidos, %TS, influencia significativamente a concentração dos compostos avaliados, para o nível de significância deste estudo, 90%. Deste modo, os demais efeitos e as interações foram eliminados do modelo e considerados erros aleatórios experimentais.

Para avaliar se os modelos podem ser considerados estatisticamente significativos foi realizada a análise da variância (ANOVA) para todos os compostos, e estão apresentadas nas Tabelas 4.18, 4.19 e 4.20. Vale a pena ser ressaltado que, para um modelo ser usado para fins preditivos, o valor de F calculado para verificar a significância da regressão deve ser maior do que o tabelado, e o p-valor  $\leq 0,10$ .

Tabela 4.18: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	p-valor
Regressão	3,075	1	3,075	55,515	<0,0001
Resíduos	0,831	15	0,055		
<b>TOTAL</b>	<b>3,906</b>	<b>16</b>			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 78,73%

$F_{1;15;0,10}=2,302$

Tabela 4.19: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de furfural presente no caldo hidrolisado.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	p-valor
Regressão	0,0671	1	0,0671	49,279	<0,0001
Resíduos	0,0204	15	0,0014		
<b>TOTAL</b>	<b>0,0876</b>	<b>16</b>			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 76,66%

$F_{1;15;0,10}=2,302$

Tabela 4.20: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de HMF presente no caldo hidrolisado.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>cal</sub>	p-valor
<b>Regressão</b>	0,0391	1	0,0391	40,806	<0,0001
<b>Resíduos</b>	0,0144	15	0,0010		
<b>TOTAL</b>	0,0534	16			

% variação explicada (R<sup>2</sup>) = 73,12%

F<sub>1;15;0,10</sub>=2,302

De acordo com as análises de variância (ANOVA) apresentadas nas Tabelas 4.18, 4.19 e 4.20 observa-se que o valor do teste F calculado é superior ao tabelado, e que o p-valor é inferior a 0,0001 em todos os casos. Sendo assim, todos os modelos obtidos são estatisticamente significativos para determinar a concentração destes compostos no caldo hidrolisado após o processo de hidrólise enzimática.

Logo, as concentrações destes compostos presentes no caldo hidrolisado podem ser descritas pelas Equações 4.3, 4.4 e 4.5. Os valores de teor de sólidos (TS) são apresentados na equação com seus valores codificados.

$$C. \text{ Ác. Acético (g/L)} = 4,51 + 0,48 * TS \quad (4.3)$$

$$C. \text{ Furfural (g/L)} = 0,61 + 0,07 * TS \quad (4.4)$$

$$C. \text{ HMF (g/L)} = 0,59 + 0,05 * TS \quad (4.5)$$

Os modelos apresentados sustentam que a concentração destes compostos será maior quanto mais elevado for o teor de sólidos utilizado na hidrólise enzimática.

### **4.2.3. Detoxificação dos Caldos Hidrolisados obtidos no Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática.**

Como observado na seção 4.2.2, a concentração dos inibidores tem ligação direta com o teor de sólidos no sistema reacional. Deste modo, quando se leva em consideração um processo economicamente viável, a utilização de teores de sólidos elevados apresenta-se como algo necessário, sendo também fundamental, realizar uma investigação que leve a uma redução na concentração destes compostos indesejados no caldo hidrolisado. Logo, o objetivo desta etapa é investigar uma estratégia para a detoxificação dos caldos obtidos no DCCR da hidrólise e por meio de nova caracterização destes avaliar o resultado obtido.

Neste contexto, optou-se por um processo que em parte já é utilizado e conhecido pelas usinas, só que para uma finalidade diferente, uma vez que, a calagem é realizada durante o processo de produção de açúcar. Com base, neste processo o caldo hidrolisado foi neutralizado com hidróxido de cálcio,  $\text{Ca(OH)}_2$ , com o objetivo de eliminar os ácidos orgânicos, que podem complexar e tornarem-se insolúveis facilitando a remoção por decantação e/ou filtração, e em seguida este caldo foi tratado com carvão ativado.

Apesar de a utilização do carvão ativado ser conhecida como uma operação de alto custo, o mesmo de acordo com CARVALHO et al., (2005) possui uma alta capacidade de absorver componentes sem afetar os níveis de açúcares presentes no caldo hidrolisado.

A detoxificação será avaliada a partir da concentração do ácido acético, que além de ser o principal composto inibidor da fermentação apresenta maior concentração no caldo, e da glicose determinada em HPLC. Os resultados encontram-se na Tabela 4.21.

Tabela 4.21: Concentrações de glicose e compostos inibidores da fermentação nos caldos hidrolisados sem/com detoxificação.

<b>Amostra</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Ácido Acético (g/L)</b>	<b>Furfural (g/L)</b>	<b>HMF (g/L)</b>
Caldo 1	29,23	3,75	0,49	0,52
Caldo 1 - Detox	29,72	3,59	N.A.	N.A.
Caldo 2	33,15	4,91	0,62	0,61
Caldo 2 - Detox	32,56	4,48	N.A.	N.A.
Caldo 3	34,02	3,90	0,53	0,50
Caldo 3 - Detox	33,09	3,51	N.A.	N.A.
Caldo 4	40,27	4,79	0,66	0,62
Caldo 4 - Detox	40,86	4,64	N.A.	N.A.
Caldo 5	30,36	4,43	0,59	0,54
Caldo 5 - Detox	28,42	4,27	N.A.	N.A.
Caldo 6	35,43	5,09	0,72	0,65
Caldo 6 - Detox	34,36	5,54	N.A.	N.A.
Caldo 7	34,75	4,17	0,58	0,58
Caldo 7 - Detox	33,23	4,69	N.A.	N.A.
Caldo 8	38,94	4,88	0,66	0,57
Caldo 8 - Detox	39,29	4,44	N.A.	N.A.
Caldo 9	29,91	3,38	0,47	0,46
Caldo 9 - Detox	29,39	3,49	N.A.	N.A.
Caldo 10	41,22	5,20	0,76	0,71
Caldo 10 - Detox	41,06	4,55	N.A.	N.A.
Caldo 11	29,08	4,41	0,57	0,56
Caldo 11 - Detox	30,19	4,81	N.A.	N.A.
Caldo 12	39,91	4,90	0,66	0,59
Caldo 12 - Detox	36,26	4,57	N.A.	N.A.
Caldo 13	35,40	4,56	0,60	0,61
Caldo 13 - Detox	34,53	4,27	N.A.	N.A.
Caldo 14	35,79	4,78	0,58	0,57
Caldo 14 - Detox	33,28	4,22	N.A.	N.A.
Caldo 15	34,45	4,27	0,63	0,59
Caldo 15 - Detox	34,23	3,77	N.A.	N.A.
Caldo 16	36,02	4,78	0,61	0,57
Caldo 16 - Detox	35,77	4,89	N.A.	N.A.
Caldo 17	35,30	4,47	0,58	0,54
Caldo 17 - Detox	35,27	3,78	N.A.	N.A.

\*N.A.: Não analisado.

Na Tabela 4.21 é possível observar que o processo de detoxificação realizado não foi capaz de reduzir significativamente a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado, e que não houve perda expressiva na concentração de glicose. Pode ser que este processo seja eficiente para outros componentes não avaliados neste estudo, e que podem ou não interferir na fermentação. Uma sugestão para um próximo estudo é buscar estratégias alternativas para remoção destes inibidores da fermentação, assim como, definir outros subprodutos gerados no pré-tratamento, entre eles alguns conhecidos como, ácido fórmico e ácido levunílico, para que suas concentrações sejam avaliadas com o objetivo de verificar se estão em níveis capazes de promover efeitos inibitórios na fermentação.

#### **4.2.4. Fermentação dos Caldos Hidrolisados obtidos no Planejamento Experimental da Hidrólise Enzimática.**

Nesta seção, a fermentabilidade dos caldos obtidos foi testada de modo a se verificar se estes eram capazes de serem convertidos em etanol após a realização das hidrólises enzimática e detoxificação dos mesmos.

Para tal, foram utilizados açúcares do melaço de cana como principal fonte de carbono e glicose do caldo hidrolisado detoxificado. O caldo hidrolisado também foi utilizado como diluente, em substituição à água comumente utilizada nos processos industriais, os ensaios foram realizados em dois grupos, e para cada um foi realizado um cultivo padrão (Branco), com água como diluente do melaço, pois assim as influências do caldo no melaço, e o comportamento da levedura nesses mostos puderam ser avaliados durante os experimentos.

A Tabela 4.22 apresenta a composição do melaço utilizado nos ensaios e a Tabela 4.23 apresenta os resultados dos ensaios de fermentação.

Tabela 4.22: Composição do melaço utilizado nos experimentos de fermentabilidade.

Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
498,44	60,94	61,96	1,98	2,18	2,43

Tabela 4.23: Dados experimentais e rendimentos obtidos em ensaios de fermentação de caldos hidrolisados suplementados com melaço, em regime batelada a 32°C, pH 5,0 volume de reação 180 mL e tempo de 10 horas. Concentração inicial de substrato aproximadamente 175g/L.

Ensaio	TS (%)	ART <sub>total</sub> (g/L)	ART <sub>consumido</sub> (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento ART <sub>consumido</sub> (%)	Rendimento ART <sub>total</sub> (%)
1*	8,81	167,45	125,35	53,71	83,85	62,77
2*	11,19	181,26	111,95	47,27	82,62	51,03
3**	8,81	181,31	141,69	56,32	77,79	60,79
4*	11,19	175,23	113,80	49,48	85,09	55,26
5**	8,81	180,22	143,79	58,14	79,13	63,13
6**	11,19	184,01	121,25	49,78	80,34	52,94
7*	8,81	179,90	144,60	56,91	77,02	61,91
8**	11,19	170,92	113,73	50,70	87,24	58,05
9**	8	178,56	138,52	58,91	83,23	64,57
10*	12	167,78	100,43	46,67	90,94	54,43
11*	10	176,35	130,80	55,00	82,28	61,03
12*	10	177,45	135,41	55,48	80,18	61,18
13*	10	175,71	130,87	54,03	80,80	60,18
14**	10	173,23	134,44	56,41	82,11	63,72
15**	10	183,25	135,99	55,27	79,53	59,02
16**	10	178,43	130,97	55,86	83,47	61,26
17*	10	174,95	122,40	43,99	70,33	49,21
Branco - 1	--	171,10	144,85	61,03	82,45	69,80
Branco - 2	--	181,75	155,63	58,66	73,77	63,17

\* Ensaio realizado com o Branco - 1; \*\* Ensaio realizado com o Branco - 2

Analisando a Tabela 4.23, a principal observação refere-se à grande quantidade de ART residual no mosto após 10 horas de fermentação para todos os ensaios. Estes dados não sugerem efeito de inibição pelo substrato, uma vez que concentrações de ART na faixa de 160-180g/L são consideradas ideais para cultivos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Possivelmente, a sobra significativa de açúcares no mosto ao final do processo deve-se à presença de substâncias potencialmente inibidoras do metabolismo das leveduras presentes no BPT, que foram solubilizadas na hidrólise e que permaneceram no caldo após o processo de detoxificação.

Pode-se observar que do ensaio 1 ao 10, onde para os ensaios ímpares o teor de sólidos é menor que para os ensaios pares, quando se observa os resultados referentes ao rendimento total, nota-se que quando o teor de sólidos é maior o rendimento é menor. Para os ensaios do 11 ao 17, onde o teor de sólidos é o mesmo para todos os ensaios, os rendimentos encontram-se em torno da média 61%, com exceção do ensaio 17.

Assim como nos ensaios realizados com caldos hidrolisados, para os ensaios padrão Branco - 1 e Branco - 2, aproximadamente 15% do ART inicial não foram consumidos no processo fermentativo. No entanto, rendimentos obtidos nestes ensaios podem revelar algum desvio da rota prioritária de produção de etanol pelas leveduras para a produção de subprodutos como, por exemplo, glicerol e ácido acético, que não foram mensurados.

É importante ainda ressaltar que nestes ensaios foram utilizadas leveduras liofilizadas, e apenas um ciclo fermentativo está sendo avaliado e estas poderiam não estar adaptadas ao meio, uma vez que, o melaço além de açúcares (ART) possui uma alta carga osmótica devido a sua composição. Outro fator que se pode levar em consideração é a viabilidade celular que não foi avaliada, podendo ser mais um dos motivos para explicar a quantidade de açúcares residuais.

Sendo assim, como os resultados obtidos com caldo hidrolisados apresentaram grande semelhança com os ensaios padrão, pode ser que os problemas identificados para rendimentos inferiores a 90% não tenham relação direta com a presença do caldo na composição do mosto.

### **4.3. Análise da Influência da Variabilidade da Matéria-Prima no Processo de Produção de Etanol.**

Processos em geral podem sofrer influência de acordo com a matéria-prima utilizada. Por esta razão, um dos objetivos deste trabalho foi investigar como a matéria-prima poderia influenciar o processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana. Como a cana-de-açúcar é uma planta, sabe-se que fatores edafoclimáticos (condições de solo e clima), a variedade e a sazonalidade, podem influenciar a sua composição química e/ou estrutural e, conseqüentemente, a composição do bagaço da cana.

A composição do bagaço pré-tratado depende da composição do “in natura”, além disso, pode ser influenciada por variáveis de processamento da cana, por exemplo, pela forma de extração do caldo (moenda e difusor), assim como os parâmetros do pré-tratamento. A combinação desses fatores, a qual se denomina, neste trabalho, de variabilidade da matéria-prima pode interferir no resultado final da produção de etanol celulósico e por isso foi objeto de estudo desta Dissertação.

Contudo, não é possível fixar ou isolar essas variáveis para determinação do seu real impacto sobre o processo. Deste modo, na presente etapa a influência da variabilidade da matéria-prima foi avaliada considerando majoritariamente a época sazonal de colheita e as informações da região onde a cana foi colhida.

Para atingir esse objetivo foram coletados bagaço de cana “in natura” em duas safras seguidas (10/11 e 11/12) nos seguintes períodos: final, início, meio e final. As coletas foram realizadas na Usina Iracema (Grupo São Martinho), localizada no município de Iracemópolis, Estado de São Paulo, que possui uma capacidade de moagem de 3 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, provenientes de uma área cultivada, pela usina, de aproximadamente 29.000 hectares, sendo o restante obtido de fornecedores.

Esta cana é produzida em duas regiões, a primeira em torno da usina onde ocorrem solos derivados de argilitos/siltitos da Formação Corumbataí, com diques de diabásio, formando solos predominantemente de textura argilosa, em torno de 55 % do total da usina, também ocorre em menor proporção solos de textura média e também, em pequena quantidade, solos de textura arenosa, derivados da Formação Itararé. A usina também cultiva cana-de-açúcar na região de

Itirapina, em solos derivados de arenitos, da Formação Botucatu e Pirambóia. São solos de textura arenosa, e ocupam em torno de 20 % da área cultivada pela usina. Quanto à aptidão destes solos para produzir cana-de-açúcar, em torno de 29 % tem potencial produtivo alto, 28 % alto a médio, 11 % médio, 16 % médio a baixo, e, 16% tem potencial produtivo baixo.

A região é considerada climaticamente apta para a cultura da cana-de-açúcar. Comparando com as demais regiões é a que possui menor deficiência hídrica, indicando que a cana-de-açúcar encontra condições ótimas para seu desenvolvimento e certo grau de adversidade para sua maturação, requerendo um plantel varietal adequado e/ou emprego de maturadores químicos, principalmente no início de safra.

Para qualquer usina nem sempre é possível moer cana-de-açúcar na sua melhor fase, por exemplo para a amostragem do bagaço coletado em out/2010, identificou-se que, naquele momento, a usina estava moendo uma mistura de variedades, das quais 67 % são variedades cultivadas para colheita no fim da safra.

Sabendo as diversas variáveis que podem influenciar na qualidade da matéria-prima, neste trabalho, utilizou-se para avaliar esta variabilidade na produção de etanol celulósico as condições de processo (pré-tratamento e hidrólise enzimática) conforme definidas nas seções 4.1 e 4.2 respectivamente, ou seja, pré-tratamento na condição A ( $17 \text{ kgf/cm}^2$ ,  $t_1= 5 \text{ min}$  e  $t_2= 8 \text{ min}$ ) e hidrólise enzimática com 12% de sólidos e 6 FPU/g-celulose.

Definidos os parâmetros que serão estudados, a Tabela 4.24 apresenta a composição dos bagaços “in natura” coletados em diferentes períodos da safra, em relação ao percentual de celulose, hemicelulose e lignina presentes na fibra.

Tabela 4.24: Análise composicional dos bagaços “in natura”.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Out/10	40,57	25,09	22,71
Mai/11	40,62	28,12	21,25
Ago/11	41,51	21,87	20,65
Out/11	39,38	24,51	19,58

Como se pode observar não foram evidenciadas diferenças significativas na composição em relação à celulose e lignina. O valor médio obtido para celulose foi de 40,52% e para a lignina foi 21,05%. No caso das hemiceluloses, se pode observar variação entre as coletas de maio e agosto, 28,12% e 21,87% respectivamente. Os percentuais de hemicelulose para o período de outubro em ambas as safras ficaram próximo do valor médio total que foi de 24,89%. Para todos os componentes, os valores médios estão dentro da faixa determinada para bagaços de diferentes variedades de cana-de-açúcar, conforme estudo realizado no CTC intitulado “Armazenagem e manuseio de bagaço e palha de cana, Safra 07 / 08”.

A Tabela 4.25 apresenta a composição dos bagaços pré-tratados, em relação ao percentual de sólido insolúvel no BPT e aos seus principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina.

Tabela 4.25: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos insolúveis.

Amostra	Sólidos Insolúveis (%BPT)	Celulose (%SI)	Hemicelulose (%SI)	Lignina (%SI)
BPT (Out/10)	75,95	58,32	4,80	31,64
BPT (Mai/11)	78,29	52,63	7,01	30,66
BPT(Ago/11)	77,20	52,73	6,18	28,16
BPT (Out/11)	77,74	50,59	6,16	29,30

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.25 para o ano de 2011, não foram observadas diferenças significativas para a celulose, hemicelulose e lignina, e o valor médio obtido para cada um dos compostos foi de 51,98%, 6,45% e 29,37% com desvio padrão de 1,22%, 0,49% e 1,25%, respectivamente. Comparando estes resultados com a composição do BPT obtido em out/10, se pode observar uma redução nas frações de celulose e lignina, e aumento da hemicelulose. Esta diferença pode estar relacionada com uma maior presença de impurezas inorgânicas que aumentam a capacidade tamponante da biomassa e consequentemente reduz o efeito do ácido acético gerado durante o pré-tratamento (autocatalítico) que atua na hidrólise e solubilização da hemicelulose.

Contudo, para uma melhor avaliação destes resultados, na Tabela 4.26 estão apresentadas a composição dos compostos que foram solubilizados durante o pré-tratamento, uma vez que, o teor de sólidos insolúveis e teor de sólidos solúveis presentes nas amostras são complementares.

Tabela 4.26: Análise composicional dos bagaços pré-tratados por explosão a vapor em escala piloto com base no teor de sólidos solúveis.

Amostra	Sólidos Solúveis (%BPT)	Glicose (%SS)	HMF (%SS)	Xilose (%SS)	Furfural (%SS)	Ácido Acético (%SS)
BPT (Out/10)	24,05	10,84	0,62	58,48	2,65	13,93
BPT (Mai/11)	21,71	9,15	1,67	46,35	1,85	13,62
BPT(Ago/11)	22,80	8,09	3,87	45,79	1,57	12,84
BPT (Out/11)	22,26	9,95	4,58	37,39	2,80	14,98

Os resultados apresentados na Tabela 4.26 comprovam que grande parte da hemicelulose foi solubilizada durante os pré-tratamentos realizados, e que no decorrer do ano de 2011 a solubilização desta fração foi inferior à encontrada para out/10 em aproximadamente 25%. Estes resultados corroboram com o maior percentual de celulose presente na fibra para este mesmo período conforme dados da Tabela 4.25. É possível ainda observar a presença de compostos de degradação da xilose como furfural e ácido acético. A degradação da fração celulose a HMF, embora bem menos expressiva que àquela observada para a hemicelulose. O fenômeno de degradação observado durante o pré-tratamento é definitivamente indesejado, independentemente da fração em questão.

Nas Figuras 4.7 e 4.8, estão apresentados os balanços de massa da celulose e hemicelulose, respectivamente, para todos os períodos estudados. Estes balanços de massa permitem avaliar a recuperação/degradação da celulose e hemicelulose após esta etapa, fornecendo uma indicação de grau de modificação dessas frações.

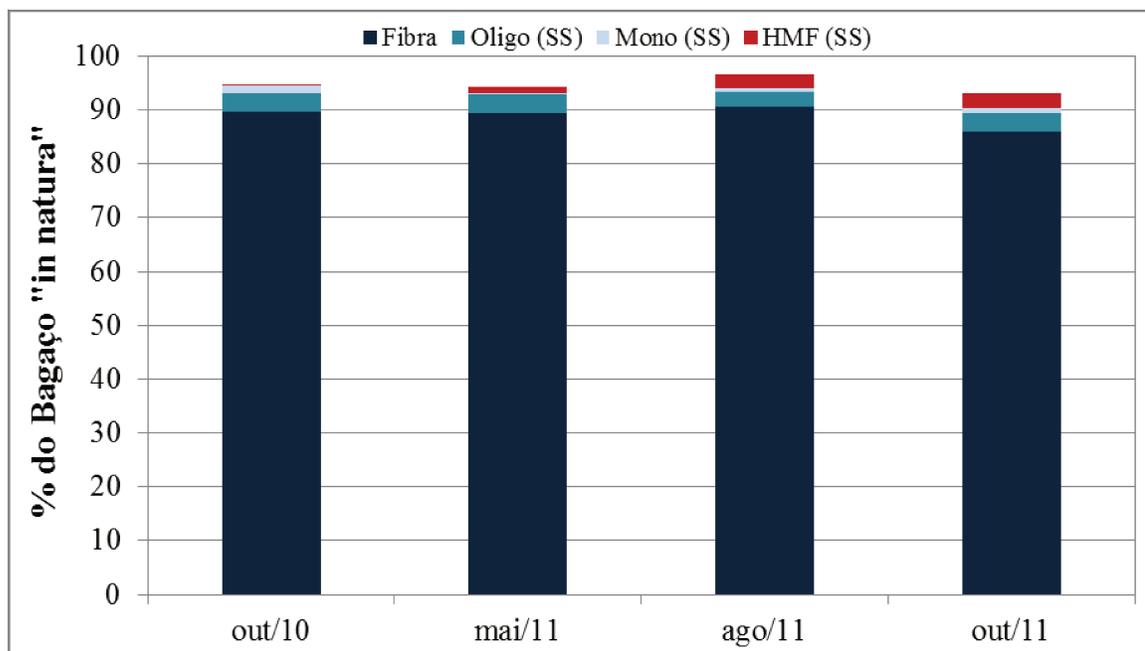


Figura 4.7: Balanço de massa para a celulose após pré-tratamento em escala piloto.

Inicialmente, é importante lembrar que, como já ressaltado na seção 4.1, durante o processo de pré-tratamento de biomassas por explosão a vapor, operado em batelada, pode ocorrer volatilização de alguns produtos de degradação gerados, de forma que, o fato de não ser possível realizar balanços de massa com elevada precisão, é aceitável.

Nos balanços apresentados na Figura 4.7, não foram evidenciadas diferenças significativas na recuperação da celulose para os períodos de coleta avaliados. O valor médio para recuperação de glicose solúvel, somando as frações mono e oligo, foi de 4,17% com desvio padrão 0,47%, e o valor para o rendimento de celulose na fibra foi 88,88% com desvio padrão 2,02%. Os valores obtidos podem ser considerados satisfatórios, uma vez que, aproximadamente 90% da celulose foi preservada, e poderá ser utilizada para a obtenção de etanol celulósico.

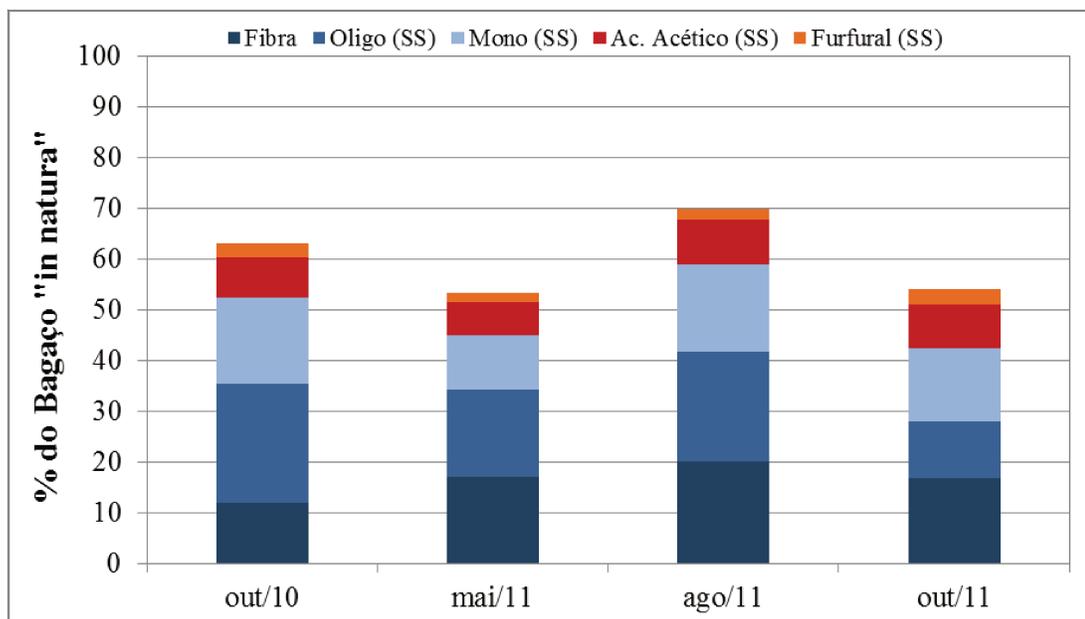


Figura 4.8: Balanço de massa para a hemicelulose após pré-tratamento em escala piloto.

Na Figura 4.8, o valor médio para a recuperação de xilose solúvel, considerando todo o período estudado, foi de 33,19%, com desvio padrão de 7,54%. Para o rendimento de hemicelulose na fibra, o valor médio alcançado foi 16,25% e desvio de 3,40%.

Como os dados apresentados nas Tabelas 4.25 e 4.26 apresentavam uma homogeneidade para os resultados obtidos nas coletas realizadas em 2011, possivelmente o desvio observado para os resultados da Figura 4.8 se deve à variação da hemicelulose presente no bagaço “in natura”, para maio e agosto de 2011, conforme Tabela 4.24, que interfere na comparação para a recuperação desta fração ao longo do tempo, uma vez que, em maio o denominador é maior e consequentemente uma menor recuperação é obtida. O inverso deste comportamento é observado para agosto.

Tendo em vista que a composição do bagaço “in natura” foi semelhante para outubro de 2010 e 2011, o maior percentual de hemicelulose no bagaço pré-tratado em out/11, como apresentado anteriormente (Tabela 4.25), está de acordo com a menor solubilização e maior rendimento na fibra (sólido insolúvel) para esse período de coleta, como se pode observar na Figura 4.8, onde foram apresentadas as recuperações de xilose solubilizada e os rendimentos de hemiceluloses após o pré-tratamento, ambos em relação à hemicelulose presente no bagaço “in natura”.

Na sequência, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática, mediante condição definida na seção 4.2.1.1 (12% TS e 6FPU/g-Celulose de Cellic CTec 2) com os bagaços pré-tratados. Na Figura 4.9, estão apresentados os rendimentos de hidrólise, assim como a concentração de glicose no caldo obtido após a realização do ensaio.

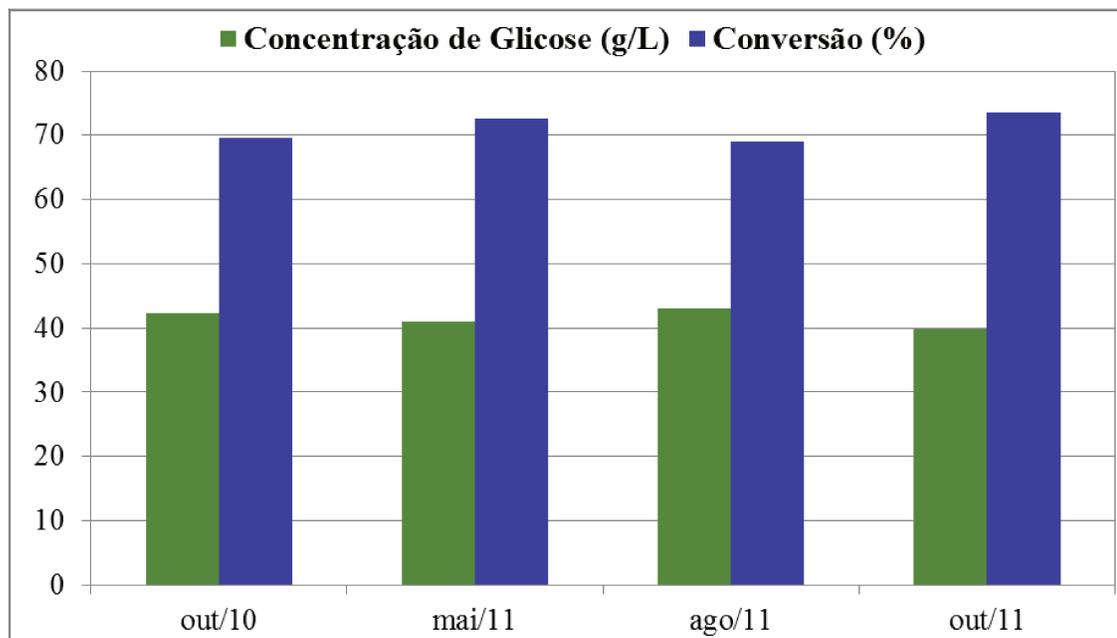


Figura 4.9: Conversões e concentrações de glicose obtidas nos experimentos de hidrólise enzimática, para determinar a variabilidade da matéria prima. Condições experimentais: 12% TS, 6FPU/g-celulose (Cellic CTec 2), pH 5,0; 50°C e 48h.

Na Figura 4.9, o valor médio observado para a conversão foi de 73,59% com desvio padrão de 2,21%, para a concentração de glicose no caldo hidrolisado a média foi 39,95% com desvio de 1,40%. Estes resultados mostram que a sazonalidade do período de coleta analisado não influenciou significativamente na composição do caldo hidrolisado obtido.

Considerando que o objetivo de qualquer processo é que o mesmo seja robusto com relação à matéria-prima utilizada, ou seja, se alcançar mesmo desempenho independentemente da matéria-prima utilizada, este resultado pode ser considerado satisfatório, uma vez que, as variações na entrada do processo, ou seja, a composição do bagaço “in natura” não interfere no resultado final, a composição do caldo hidrolisado obtido.

## CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A condição de pré-tratamento A (pressão de 17 kgf/cm<sup>2</sup>, t<sub>1</sub> = 5 min e t<sub>2</sub> = 8 min) foi definida como a melhor dentre as condições investigadas com base nas alterações dos parâmetros de processo combinados (tempo de pré-tratamento e teor de sólidos na hidrólise enzimática) e, para esta condição, nos resultados foi possível observar alto nível de recuperação global de hemiceluloses, com consequente baixa liberação e/ou formação de compostos inibidores como ácido acético e furfural, respectivamente. Em todos os pré-tratamentos realizados, a recuperação global de celulose foi de aproximadamente 95%, o que indica que esta fração foi preservada em todas as situações estudadas, uma característica desejável quando se deseja produzir etanol a partir de biomassas. Na hidrólise enzimática, o caldo obtido com o BPT-A foi aquele com conversão de celulose em glicose mais elevada, tanto para ensaios realizados com 8% quanto com 12%. Para as demais BPTs, conversões similares foram atingidas. A fermentabilidade de todos os caldos obtidos foi avaliada com meio sintético e foi satisfatória, atingindo-se rendimentos semelhantes ao observado para o ensaio em branco, na média, em torno de 90%.

A investigação da hidrólise enzimática por metodologia estatística evidenciou que a concentração de glicose na hidrólise está diretamente associada ao teor de sólidos no reator enquanto a conversão de celulose em glicose tem relação mais estreita com a carga enzimática. Foi também observado que a concentração de inibidores está diretamente relacionada com o teor de sólidos, consequentemente justificando a necessidade da etapa de detoxificação dos caldos. A validação dos modelos determinados pelo planejamento experimental para conversão e concentração de glicose demonstra a vantagem de utilizar esta ferramenta para a otimização de processos em busca de maior produtividade. Determinando-se a melhor condição de hidrólise enzimática dentro da faixa investigada, sendo esta, teor de sólidos de 12% e carga enzimática de 6 FPU/g-celulose.

Apesar de o processo de detoxificação investigado neste trabalho não reduzir significativamente a concentração de ácido acético presente no caldo hidrolisado, deve-se ressaltar que não houve perda expressiva na concentração de glicose e que este método era baseado numa operação unitária já existente no ambiente industrial, usina, e que pode ser que mesmo não removendo o ácido acético, este método pode ter sido eficiente para remover outros

compostos não avaliados que poderiam interagir sinergicamente com o ácido acético para inibir a etapa de fermentação. Os resultados obtidos com caldo hidrolisado corroboram com esta hipótese, uma vez que, grande semelhança com os ensaios padrão foi observada, indicando que os rendimentos de fermentação inferiores a 90% não têm relação direta com a presença de inibidores no caldo hidrolisado utilizado na composição do mosto.

Finalmente, foi possível concluir, como o objetivo principal deste trabalho, que as variações na entrada do processo, ou seja, a composição do bagaço “in natura” não interfere no resultado final: a composição do caldo hidrolisado obtido. Esta é a principal contribuição deste trabalho demonstrando que este é um processo com características robustas, ou seja, que seu resultado não é influenciado pelas flutuações nas características da matéria-prima utilizada.

### **5.1. Sugestões Para Trabalhos Futuros**

Com base nesses experimentos, foi verificada a necessidade de várias ações que deveriam ser estudadas em todo o processo para sua otimização, tais como:

- Estudar diferentes condições de pré-tratamento com intuito de se diminuir ou minimizar a concentração dos inibidores na biomassa pré-tratada;
- Estudar hidrólise enzimática com maior teor de sólidos, com o intuito de reduzir o investimento em equipamentos para esta etapa;
- Estudar a utilização de outras leveduras industriais, principalmente de final de safra, que podem ser mais robustas frente aos inibidores;
- Avaliar o efeito dos inibidores na fermentação;
- Estudar fermentação dos açúcares de 5 carbonos;
- Estudar métodos de detoxificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 4851–61, 2010.
- BALLESTEROS, I. et al. Ethanol Production From Steam-Explosion Pretreated Wheat Straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 129, p. 496–508, 2006.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, v. 8, n. 7, p. 1155–63, 2008.
- BNDES E CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 316p., 2008.
- CARA, C. et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, v. 99, n. 6, p. 1869–76, 2008.
- CARDONA, C. A; QUINTERO, J. A; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 4754–66, 2010.
- CARDONA, C. A; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, v. 98, n. 12, p. 2415–57, 2007.
- CARVALHEIRO, F. et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3-4, p. 1215–1223, 2005.
- CARVALHO, R. J. et al. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. *Revista Analytica*, n. 18, p. 48–55, 2005.
- CGEE. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 536p., 2009.
- CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource technology*, v. 98, n. 10, p. 1947–50, 2007.
- CHANDEL, A. K.; SILVÉRIO, S.; SINGH, O. V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. 2011.

CUNHA, H. C. M. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: Avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos. Lorena: Faculdade de Engenharia Química de Lorena. 2005, 190p. Tese (Doutorado).

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

FOX, J. M. et al. Initial- and processive-cut products reveal cellobiohydrolase rate limitations and the role of companion enzymes. *Biochemistry*, v. 51, n. 1, p. 442–52, 2012.

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. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2009, 169P. Dissertação (Mestrado).

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, n. 1, p. 78–88, 2006.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010.

GLASSER, W. G.; WRIGHT, R. S. Steam-assisted biomass fraction. II Fraction behavior of various biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 14, n. 3, p. 219–235, 1998.

GU, T. Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production. New York: Springer Dordrecht Heidelberg. 2013, 158p.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. VAN; FAAIJ, A. P. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, n. 4, p. 384–410, 2005.

HARRIS, P. V et al. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current opinion in chemical biology*, v. 19C, p. 162–170, 2014.

HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, v. 100, n. 1, p. 10–8, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science (New York, N.Y.)*, v. 315, n. 5813, p. 804–7, 2007.

- HONGQIANG, L.; HONGZHANG, C. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 12, p. 1447–1451, 2008.
- HUANG, H.-J. et al. A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, v. 62, n. 1, p. 1–21, 2008.
- IGARASHI, K. et al. Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. *Science (New York, N.Y.)*, v. 333, n. 6047, p. 1279–82, 2011.
- IPCC. Sustainable Development and Equity. In: *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change*. 116p., 2014.
- JALAK, J. et al. Endo-exo synergism in cellulose hydrolysis revisited. *The Journal of biological chemistry*, v. 287, n. 34, p. 28802–15, 2012.
- JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars : challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 1, n. 2, p. 119–134, 2007.
- KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? *Bioresource technology*, v. 100, n. 18, p. 4193–202, 2009.
- LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource technology*, v. 81, n. 1, p. 33–44, 2002.
- LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 1081–1099, 2005.
- LIU, C.; SUN, R. Cellulose. In: *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. 1. ed. Elsevier, 2012. p. 131–167.
- LU, F.; RALPH, J. Lignin. In: *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. 1. ed. Elsevier, 2012. p. 169–207.
- MANSFIELD, S.; MOONEY, C.; SADDLER, J. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology progress*, v. 15, n. 5, p. 804–816, 1999.
- MARTÍN, C.; MARCET, M.; THOMSEN, A. B. Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresources*, v. 3, p. 670–683, 2008.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MORAES, G. S. Influência da linhagem da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose. São Carlos: Faculdade de Engenharia Química, UFSCar, 2013, 102p. Dissertação (Mestrado).

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, v. 96, n. 6, p. 673–86, 2005a.

MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, v. 96, n. 18, p. 1986–93, 2005b.

OLIVA, J. M. et al. Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 105, p. 141–153, 2003.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates . I: inhibition and detoxication. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17–24, 2000.

PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, n. 19, p. 5256–5265, 2008.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Curitiba: Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, 2007, 142p. Dissertação (Mestrado).

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2010, 447P. Tese (Doutorado).

RAMOS, L. P. THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

REN, J.; SUN, R. Hemicelluloses. In: *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. 1. ed. Elsevier, 2012. p. 73–130.

- RESCH, M. G. et al. Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energy & Environmental Science*, v. 6, n. 6, p. 1858, 2013.
- ROCHA, G. J. M. et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresource technology*, v. 111, p. 447–52, 2012.
- RODRÍGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v. 61, n. 2, p. 143–152, 2004.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, n. 7206, p. 841–5, 2008.
- SANTOS, F. A. et al. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SILVA, V. F. N. DA. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. 2009, 113p. Dissertação (Mestrado).
- SINGH, A. et al. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 5003–12, 2010.
- SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. 18p. 2008.
- SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O Setor Sucroalcooleiro e o domínio tecnológico. 29p. 2007.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2007.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource technology*, v. 101, n. 13, p. 4744–53, 2010.
- TEODORO, J. C. et al. Avaliação do efeito dos inibidores presentes no caldo hidrolisado na fermentação utilizando a cepa SA1. 4p. 2013.
- VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, 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, n. 6, p. 1458–80, 2012.

VAN MARIS, A. J. A et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 90, n. 4, p. 391–418, 2006.

VARGA, E.; RÉCZEY, K.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 113-116, p. 509–23, 2004.

WYMAN, C. E. et al. Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. *Bioresource technology*, v. 102, n. 24, p. 11052–62, 2011.

XU, Q. et al. Improving activity of minicellulosomes by integration of intra- and intermolecular synergies. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, n. 1, p. 126, 2013.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, n. 1, p. 26–40, 2008.

YU, Z. et al. A real explosion: the requirement of steam explosion pretreatment. *Bioresource technology*, v. 121, p. 335–41, 2012.