



ALAN DE SIQUEIRA BUTZKE

**“PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM CO₂ SUPERCRÍTICO VISANDO
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA”**

***“SUGARCANE BAGASSE PRETREATMENT WITH SUPERCRITICAL CARBON
DIOXIDE AIMING ENZYMATIC HYDROLYSIS”***

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ

ALAN DE SIQUEIRA BUTZKE

“PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA COM CO₂ SUPERCRÍTICO VISANDO
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA”

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Silva

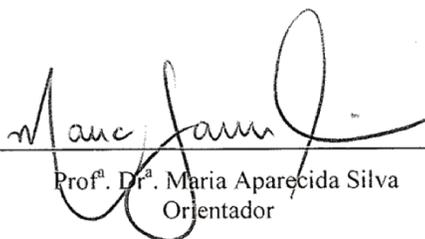
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Mariana Altenhofen da Silva

***“SUGARCANE BAGASSE PRETREATMENT WITH SUPERCRITICAL CARBON
DIOXIDE AIMING ENZYMATIC HYDROLYSIS”***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Master's Degree Dissertation presented to the Chemical Engineering Postgraduation Programme of the School of Chemical Engineering of the University of Campinas to obtain the M.Sc. grade in Chemical Engineering.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA DEFENDIDA PELO ALUNO ALAN DE SIQUEIRA BUTZKE, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. MARIA APARECIDA SILVA.



Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Silva
Orientador

CAMPINAS

2014

iii

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

B985p Butzke, Alan de Siqueira, 1986-
Pré-tratamento de bagaço de cana com CO₂ supercrítico visando hidrólise enzimática / Alan de Siqueira Butzke. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Aparecida Silva.
Coorientador: Mariana Altenhofen da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bagaço de cana. 2. Pré-tratamento. 3. Fluido supercrítico. 4. Celulose. 5. Glicose. I. Silva, Maria Aparecida, 1955-. II. Silva, Mariana Altenhofen da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Sugarcane bagasse pretreatment with supercritical carbon dioxide aiming enzymatic hydrolysis

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane bagasse

Pretreatment

Supercritical fluid

Cellulose

Glucose

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Maria Aparecida Silva [Orientador]

Francisco Maugeri Filho

Theo Guenter Kieckbusch

Fátima Aparecida de Almeida Costa

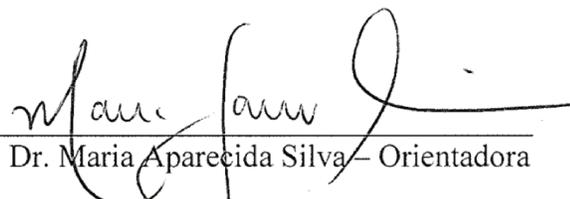
Oswaldir Pereira Taranto

Data de defesa: 03-10-2014

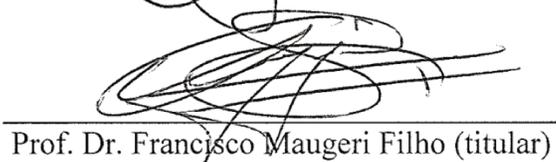
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de aprovação

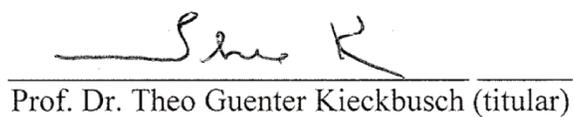
Dissertação de Mestrado defendida por Alan de Siqueira Butzke e aprovada em 03 de Outubro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Maria Aparecida Silva – Orientadora



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (titular)



Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch (titular)

Dedico este trabalho à minha família e minha namorada por me aconselharem, acreditarem e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Enio Butzke e Maria Auxiliadora G. Ch. S. Butzke, e meus irmãos Alex S. Butzke e Aline S. Butzke pelo apoio incondicional e incentivo em todas as minhas escolhas e desafios enfrentados durante toda a minha vida.

À minha namorada Caroline L. Martins, agradeço pelo amor, apoio, confiança durante toda esta etapa e pela paciência por todas as noites mal dormidas ou que te deixei sozinha para escrever.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Silva e coorientadora Prof^a. Dr^a. Mariana Altenhofen da Silva, pelo apoio, ensinamentos, confiança e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert, pela pronta disposição em ajudar ao ceder o Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB/FEA) para a realização dos experimentos deste trabalho.

À Fátima Costa e Priscila Carvalho e aos integrantes do LRAC Adilson Brandão, Hugo Teixeira, Lucélia Silva por toda a ajuda para a realização dos experimentos e disposição em tirar todas as minhas dúvidas.

Ao Laboratório de Óleos e Gorduras (LOG/FEA) pelo auxílio nas análises de extrativos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, a Unicamp e ao programa de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química pela oportunidade.

Aos meus queridos colegas de laboratório Juliana Albarelli, Mateus Guimarães, Natalia Prezoti e Kelly Hofsetz, pela amizade, companhia, ajuda e pelos momentos de confraternização.

Ao meu amigo Fabiano Bisinella Scheufele por ter me ensinado os caminhos da pesquisa, orientado durante a graduação e por ter me inspirado a seguir na pós-graduação.

Aos meus amigos de longa data Wilson Junior dos Santos e Karine Zanella, por toda a ajuda que precisei para a realização deste trabalho e que sem eles não estaria na Unicamp.

Aos meus amigos Fernando Silva, Giovana Genevro, Bruno Borborema, Wilson Ferrari, Ronald Prada e Paula Catalina Vásquez, por todas as conversas, companhias e principalmente suas amizades.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, os meus sinceros agradecimentos.

***“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.”***
Aldo Novak

RESUMO

A utilização de biomassa para a produção de etanol de segunda geração é de grande importância para o setor energético mundial, no entanto o uso do bagaço de cana excedente nas usinas sucro-alcooleiras depende de um pré-tratamento para criar condições necessárias para a hidrólise enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição estrutural das frações de bagaço e a influência da umidade, temperatura e pressão na conversão em açúcares antes e após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico. Os experimentos de caracterização e hidrólise enzimática das frações de bagaço foram desenhados por um planejamento experimental fatorial completo 2³ com triplicata no ponto central. A remoção de hemicelulose no pré-tratamento aumentou consideravelmente o teor de celulose nas frações de fibra (retida na peneira 48 mesh da série Tyler) e de medula. Verificou-se para condição de 60°C e 250 bar, um aumento máximo de aproximadamente 50 % (umidade de 0 % em base seca) e de 30 % (umidade de 100 % em base seca) no teor de celulose nas frações de fibra e medula, respectivamente. O melhor resultado da conversão em glicose da fração de fibra (7,7 g/L) foi para um teor de umidade igual a 0 % (base seca) em 24 horas de hidrólise enzimática, para a condição de 40°C e 100 bar no pré-tratamento, com aumento de 16 % em relação à fração fibra sem pré-tratamento no mesmo tempo. O melhor resultado da conversão em glicose da fração de medula (8,2 g/L), foi para um teor de umidade igual a 100 % (base seca), para 60°C e 100 bar, em 48 horas de hidrólise enzimática com um aumento de 16 % em relação à fração de medula sem pré-tratamento no mesmo tempo. Análises de difratometria de raios X mostraram alterações na cristalinidade da celulose para ambas as frações e a determinação da área superficial mostrou um aumento na quantidade de poros após o pré-tratamento. Verificou-se também a ausência do composto inibidor hidroximetilfurfural (HMF) nas frações de fibra e medula.

Palavras-chave: Bagaço de cana, pré-tratamento, fluido supercrítico, celulose, glicose.

ABSTRACT

The use of biomass for second generation ethanol production is very important to the global energy sector, however, the use of sugarcane bagasse surplus in the sugar and alcohol plants depends on a pretreatment to create necessary conditions for enzymatic hydrolysis. The aim of this study was to evaluate the structural composition of bagasse fractions and moisture, temperature and pressure influence in sugars conversion before and after pretreatment with supercritical CO₂. The physical characterization and enzymatic hydrolysis experiments of bagasse fractions were designed by a 2³ full factorial design with three replications at the center point. The removal of hemicellulose by the pretreatment increased the cellulose content of fiber (retained in the sieve of 48 mesh Tyler series) and pith fractions. It was found that for 60°C and 250 bar, a increase of approximately 50 % (0 % moisture on a dry basis) and 30 % (moisture of 100 % on dry basis) in cellulose content for fiber and pith fractions, respectively. The best result of glucose conversion for fiber fraction (7,7 g/L) was for moisture content equal to 0 % (dry basis) after 24 hours of enzymatic hydrolysis, for 40°C and 100 bar, with an increase of 16 % compared to the fiber fraction without pretreatment for the same period. The best result of glucose conversion for pith fraction (8.2 g/L) was for moisture content of 100 % (dry basis) after 48 hours of enzymatic hydrolysis, for 60°C and 100 bar, with an increase of 16 % compared to the pith fraction without pretreatment at the same interval. X-ray diffraction analysis exhibited crystallinity changes of cellulose for both fractions and surface area revealed an increase in the pores number after pretreatment. It was also presented the absence of inhibitor compound hydroxymethylfurfural (HMF) for fiber and pith fractions.

Keywords: Sugarcane bagasse, pretreatment, supercritical fluid, cellulose, glucose.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 03 |
| 2.1 Produção de energia e etanol..... | 03 |
| 2.1.1 Produção mundial de energia e etanol..... | 04 |
| 2.1.2 Produção nacional de energia e etanol | 06 |
| 2.2 Biomassa lignocelulósica | 12 |
| 2.2.1 Celulose..... | 14 |
| 2.2.2 Hemicelulose..... | 18 |
| 2.2.3 Lignina | 20 |
| 2.2.4 Extrativos | 23 |
| 2.3 Pré-tratamento da biomassa..... | 23 |
| 2.3.1 Principais efeitos do pré-tratamento..... | 25 |
| 2.3.1.1 Área superficial específica..... | 26 |
| 2.3.1.2 Efeito da lignina..... | 27 |
| 2.3.1.3 Efeito da hemicelulose..... | 28 |
| 2.3.1.4 Cristalinidade | 29 |
| 2.3.2 Tipos de pré-tratamento | 30 |
| 2.3.3 Inibidores..... | 32 |
| 2.4 Explosão com CO ₂ supercrítico | 33 |
| 2.4.1 Efeito da temperatura | 34 |
| 2.4.2 Efeito da pressão | 35 |

| | | |
|--|---|----|
| 2.4.3 | Efeito da umidade | 36 |
| 2.4.4 | Efeito do tempo de retenção..... | 37 |
| 2.4.5 | Remoção e impacto do CO ₂ supercrítico..... | 38 |
| 2.5 | Hidrólise enzimática..... | 39 |
| CAPÍTULO 3 MATERIAL E MÉTODOS | | 43 |
| 3.1 | Material..... | 43 |
| 3.1.1 | Fração fina..... | 44 |
| 3.1.2 | Fração P..... | 44 |
| 3.2 | Métodos | 45 |
| 3.2.1 | Caracterização do material..... | 45 |
| 3.2.1.1 | Teor de umidade | 46 |
| 3.2.1.2 | Composição estrutural | 46 |
| 3.2.1.3 | Análise de área superficial..... | 47 |
| 3.2.1.4 | Difração de raios X..... | 48 |
| 3.2.2 | Pré-tratamento com CO ₂ supercrítico | 48 |
| 3.2.2.1 | Ensaio experimentais..... | 51 |
| 3.2.3 | Hidrólise enzimática..... | 53 |
| 3.2.3.1 | Inibidor..... | 55 |
| 3.2.4 | Tratamento estatístico dos dados | 55 |
| CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | | 57 |
| 4.1 | Condições do pré-tratamento | 57 |
| 4.2 | Caracterização estrutural das frações fina e P..... | 58 |
| 4.2.1 | Composição estrutural da fração fina após pré-tratamento..... | 61 |
| 4.2.2 | Composição estrutural da fração P após pré-tratamento..... | 69 |

| | |
|--|-----|
| 4.3 Hidrólise enzimática..... | 79 |
| 4.3.1 Hidrólise enzimática da fração fina..... | 80 |
| 4.3.1.1 Hidrólise enzimática da fração fina em 24 horas..... | 82 |
| 4.3.2 Hidrólise enzimática da fração P..... | 90 |
| 4.3.2.1 Hidrólise enzimática da fração P para 24 horas..... | 93 |
| 4.4 Cristalinidade..... | 102 |
| 4.4.1 Cristalinidade da fração fina..... | 103 |
| 4.4.2 Cristalinidade da fração P..... | 104 |
| 4.4.3 Índice de cristalinidade nas frações fina e P..... | 106 |
| 4.5 Área superficial..... | 109 |
| 4.6 Inibidores..... | 110 |
| CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES..... | 113 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 117 |
| ANEXO A..... | 127 |
| APÊNDICE A..... | 129 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 2.1 | Principais produtores mundiais de etanol. | 5 |
| Figura 2.2 | Principais fontes energéticas nacionais. | 7 |
| Figura 2.3 | Produção nacional de cana-de-açúcar, etanol e açúcar. | 8 |
| Figura 2.4 | Evolução da importação versus exportação de álcool etílico no Brasil. | 9 |
| Figura 2.5 | Evolução da produção versus consumo de álcool etílico no Brasil. | 10 |
| Figura 2.6 | Arranjo estrutural das moléculas na formação da parede celular. | 13 |
| Figura 2.7 | Formação da ligação celobiose, através da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose. | 14 |
| Figura 2.8 | Representação da estrutura linear da celulose, formada pelas unidades de celobiose | 15 |
| Figura 2.9 | Formação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose. | 16 |
| Figura 2.10 | Representação da região cristalina da celulose. | 16 |
| Figura 2.11 | Representação das celulosas cristalina e paracristalina na microfibrila. | 17 |
| Figura 2.12 | Representação esquemática da microfibrila. | 17 |
| Figura 2.13 | Principais estruturas de hemiceluloses das paredes celulares das plantas. | 18 |
| Figura 2.14 | Ligação das cadeias de glucuronoarabinoxilanos por meio dos resíduos de ácido ferúlico e arabinose. | 19 |
| Figura 2.15 | Autofluorescência da parede celular da cana-de-açúcar. | 20 |
| Figura 2.16 | Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina. | 21 |
| Figura 2.17 | Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H). | 21 |
| Figura 2.18 | Representação da estrutura química da lignina. | 22 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 3.1 | Amostra de fração fina. | 44 |
| Figura 3.2 | Amostra de fração P. | 45 |
| Figura 3.3 | Equipamento de Extração Supercrítica. | 49 |
| Figura 3.4 | Módulo de alimentação do solvente e/ou cossolvente. | 50 |
| Figura 3.5 | Módulo de separação. | 50 |
| Figura 4.1 | Variável significativa do teor de celulose para fração fina. | 64 |
| Figura 4.2 | Gráfico das médias marginais para o teor de celulose da fração fina. | 65 |
| Figura 4.3 | Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de celulose da fração fina. | 66 |
| Figura 4.4 | Valores previstos versus valores observados do teor de celulose da fração fina. | 67 |
| Figura 4.5 | Superfície de resposta do teor de celulose para fração fina. | 69 |
| Figura 4.6 | Variáveis significativas do teor de celulose para fração P. | 73 |
| Figura 4.7 | Gráfico das médias marginais para o teor de celulose da fração P. | 74 |
| Figura 4.8 | Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de celulose da fração P. | 75 |
| Figura 4.9 | Valores previstos versus valores observados do teor de celulose da fração P. | 76 |
| Figura 4.10 | Superfície de resposta do teor de celulose para fração P. | 78 |
| Figura 4.11 | Curva de concentração de glicose <i>versus</i> tempo da fração fina | 80 |
| Figura 4.12 | Variáveis significativas na conversão da celulose da fração fina. | 85 |
| Figura 4.13 | Gráfico das médias marginais para a conversão em glicose da fração fina. | 86 |
| Figura 4.14 | Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da conversão em glicose da fração fina. | 87 |
| Figura 4.15 | Valores previstos versus valores observados da conversão em glicose da fração fina. | 88 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 4.16 | Superfície de resposta da conversão em glicose para fração fina. | 90 |
| Figura 4.17 | Curva de concentração de glicose <i>versus</i> tempo da fração P | 91 |
| Figura 4.18 | Variáveis significativas na conversão da celulose da fração P. | 96 |
| Figura 4.19 | Gráfico das médias marginais para a conversão em glicose da fração P. | 97 |
| Figura 4.20 | Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da conversão em glicose da fração P. | 98 |
| Figura 4.21 | Valores previstos <i>versus</i> valores observados da conversão em glicose da fração P. | 99 |
| Figura 4.22 | Superfície de resposta da conversão em glicose para fração P. | 101 |
| Figura 4.23 | Difratograma das amostras de fração fina sem pré-tratamento - H12F; e com pré-tratamento - H7F (Umidade = 0%; Temperatura = 60°C; Pressão = 250 bar). | 103 |
| Figura 4.24 | Difratograma das amostras de fração fina sem pré-tratamento - H12F; e com pré-tratamento – H1F (Umidade = 0%; Temperatura = 40°C; Pressão = 100 bar). | 104 |
| Figura 4.25 | Difratograma das amostras de fração P sem pré-tratamento - H12P; e com pré-tratamento – H1P (Umidade = 0%; Temperatura = 40°C; Pressão = 100 bar). | 105 |
| Figura 4.26 | Difratograma das amostras de fração P sem pré-tratamento - H12P; e com pré-tratamento – H8P (Umidade = 100%; Temperatura = 60°C; Pressão = 250 bar). | 105 |
| Figura A.1A | Distribuição F para $\alpha = 0,95$ (1 de 2). | 127 |
| Figura A.2A | Distribuição F para $\alpha = 0,95$ (2 de 2). | 128 |
| Figura A1 | Curva de concentração de ART <i>versus</i> tempo da fração fina. | 129 |
| Figura A2 | Curva de concentração de ART <i>versus</i> tempo da fração P. | 130 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabela 2.1 | Oferta de energia por fonte nos anos de 1973 e 2011. | 4 |
| Tabela 2.2 | Produção mundial de etanol em 2013. | 6 |
| Tabela 2.3 | Maiores estados produtores na safra de 2013/14. | 10 |
| Tabela 3.1 | Metodologias utilizadas para análises de composição das frações de bagaço. | 47 |
| Tabela 3.2 | Matriz do planejamento experimental. | 52 |
| Tabela 4.1 | Especificação dos níveis avaliados nas frações fina e P do bagaço. | 57 |
| Tabela 4.2 | Matriz do planejamento experimental 2^3 completo com triplicata no ponto central. | 58 |
| Tabela 4.3 | Composição estrutural das frações de bagaço. | 59 |
| Tabela 4.4 | Análise química do bagaço integral, fração fina e P do bagaço de cana. | 60 |
| Tabela 4.5 | Resultados da composição estrutural da fração fina após o pré-tratamento supercrítico. | 61 |
| Tabela 4.6 | Efeitos e coeficientes estimados do teor de celulose para fração fina. | 63 |
| Tabela 4.7 | Análise da variância do teor de celulose da fração fina. | 68 |
| Tabela 4.8 | Resultados da composição estrutural da fração P após o pré-tratamento supercrítico. | 70 |
| Tabela 4.9 | Efeitos e coeficientes estimados do teor de celulose para fração P. | 72 |
| Tabela 4.10 | Análise da variância do teor de celulose da fração P. | 77 |
| Tabela 4.11 | Matriz do planejamento experimental 2^3 completo com triplicata no ponto central. | 83 |
| Tabela 4.12 | Efeitos e coeficientes estimados da conversão em glicose para fração fina. | 84 |
| Tabela 4.13 | Análise da variância da conversão em glicose da fração fina. | 89 |
| Tabela 4.14 | Matriz do planejamento experimental 2^3 completo com triplicata no ponto central. | 94 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tabela 4.15 | Efeitos e coeficientes estimados da conversão em glicose para fração P. | 95 |
| Tabela 4.16 | Análise da variância da conversão em glicose da fração P. | 100 |
| Tabela 4.17 | Índice de cristalinidade da fração fina antes e após pré-tratamento. | 107 |
| Tabela 4.18 | Índice de cristalinidade da fração P antes e após pré-tratamento. | 107 |
| Tabela 4.19 | Concentração de HMF (g/L) após 72 horas de hidrólise enzimática. | 110 |
| Tabela A1 | Concentração de ART da fração fina após hidrólise enzimática. | 129 |
| Tabela A2 | Concentração de ART da fração P após hidrólise enzimática. | 130 |
| Tabela A3 | Concentração de glicose da fração fina após hidrólise enzimática. | 131 |
| Tabela A4 | Concentração de glicose da fração P após hidrólise enzimática. | 132 |
| Tabela A5 | Conversão em glicose da fração fina após hidrólise enzimática. | 133 |
| Tabela A6 | Conversão em glicose da fração P após hidrólise enzimática. | 134 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O aumento no consumo mundial de combustíveis e a possibilidade de redução na oferta de combustíveis derivados do petróleo têm levado ao intenso estudo de fontes de energias sustentáveis alternativas, como por exemplo, o etanol. A tecnologia para a produção de etanol por meio fermentativo a partir da sacarose da cana-de-açúcar está consolidada, porém existe a possibilidade em aumentar a produção de etanol ao se utilizar do resíduo deste processo, que é o bagaço de cana.

A cana-de-açúcar é a biomassa utilizada para a produção de etanol no Brasil, maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior na produção de etanol do mundo. O grande volume processado de cana-de-açúcar gera uma grande quantidade de bagaço de cana nas usinas. Este bagaço atualmente é utilizado na cogeração de energia elétrica, por meio de sua queima em caldeiras. No entanto este e outros materiais lignocelulósicos podem ser hidrolisados para obtenção de açúcares fermentescíveis em etanol, este processo é conhecido como etanol de segunda geração.

A biomassa lignocelulósica é constituída de uma rede complexa que se divide em três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Esta rede dificulta o ataque das enzimas sobre a biomassa lignocelulósica, obtendo-se baixas conversões de celulose em glicose na hidrólise. Sendo assim, é necessário um pré-tratamento para modificar a estrutura celular da biomassa lignocelulósica e torná-la suscetível a um aumento na taxa de conversão na hidrólise.

Diversos são os pré-tratamentos empregados no estudo da conversão de biomassas lignocelulósicas, e sua escolha deve ser feita com base na composição e nos produtos desejados. Cada pré-tratamento apresenta vantagens e desvantagens, dependendo da matéria-prima, com efeitos diretos na área superficial, porosidade, modificação da estrutura da lignina, remoção da lignina, despolimerização da hemicelulose, remoção da hemicelulose e redução da cristalinidade da celulose. Estes efeitos resultam das técnicas de pré-tratamento, que podem ser físicas, químicas, biológicas ou uma combinação entre estes. Os pré-tratamentos mais empregados são os alcalinos e ácidos. Porém, dependendo do tipo

de pré-tratamento há a formação de compostos intermediários como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) entre outros, que podem vir a inibir o processo fermentativo para obtenção do etanol.

Fluidos supercríticos, como o CO₂ supercrítico, vêm sendo empregados para pré-tratar biomassas lignocelulósicas. As vantagens no uso de CO₂ como fluido supercrítico são as baixas pressão e temperatura necessária para atingir o estado supercrítico, facilidade na operação dos equipamentos, menores quantidades degradadas de celulose, hemicelulose e lignina, além de não ser nocivo ao meio ambiente e apresentar um baixo custo para sua obtenção.

O objetivo desta dissertação é verificar o efeito do pré-tratamento com CO₂ supercrítico na conversão da celulose em glicose para duas frações de bagaço de cana-de-açúcar submetidas à hidrólise enzimática: fração fina, obtida da separação do bagaço em classificador pneumático, e fração P, que corresponde à fração medular do bagaço rica em células de parênquima. O objetivo secundário é avaliar os efeitos que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico possui na alteração da composição estrutural e o impacto na composição morfológica das frações do bagaço.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será abordado o panorama mundial de energia desde a década de 70 até o ano de 2013. No item 2.1 será abordada a matriz energética a nível mundial e nacional nos últimos anos, assim como, a produção de etanol como fonte de energia. Então, será apresentada no item 2.2 a definição de biomassa lignocelulósica, assim como, os principais componentes que fazem parte da sua composição estrutural (celulose, hemicelulose, lignina e extrativos).

No item 2.3 será apresentada a função do pré-tratamento e os principais efeitos resultantes desta etapa na biomassa lignocelulósica. Também serão abordados os diversos tipos de pré-tratamentos aos quais a biomassa lignocelulósica pode ser submetida. Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos e até mesmo biológicos. O item 2.4 apresentará o pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico e os principais efeitos na biomassa. Por fim, no item 2.5 é apresentada a hidrólise enzimática, etapa necessária para converter a celulose da biomassa lignocelulósica em glicose.

2.1 Produção de energia e etanol

Com a produção de energia aumentando a cada ano e sabendo que a disponibilidade de certas fontes energéticas são limitadas tanto quantitativamente ou geograficamente, é importante conhecer as fontes energéticas alternativas para que o mundo não seja refém de fontes energéticas não renováveis. Deste modo, o primeiro subitem tratará da matriz energética mundial, especialmente do etanol como fonte energética, enquanto o segundo subitem exibirá o cenário da matriz energética a nível nacional, com destaque para o etanol, seguido de uma visão mais aprofundado da produção, consumo etc., nos principais estados e no país.

2.1.1 Produção mundial de energia e etanol

A constante busca por novas fontes energéticas para aumentar a matriz energética tem chamado a atenção de muitos países, sejam eles desenvolvidos ou não. A oferta energética total em 2011¹ foi de aproximadamente 13.113 milhões de toneladas equivalente de petróleo – tep (IEA, 2013), que corresponde à quantidade de energia liberada na queima de uma tonelada de petróleo. A combustão de aproximadamente 13.113 milhões de tep libera aproximadamente 152.504.190 GWh. As maiores fontes de energia do mundo em toneladas equivalente de petróleo ainda são provenientes do petróleo e carvão mineral, com percentuais de 31,5 % e 28,8 %, respectivamente.

A Tabela 2.1 compara os percentuais das ofertas de energia por fonte em 1973 e 2011. Apesar da diminuição no percentual do petróleo, houve um aumento de cerca de 47% na oferta de energia do petróleo, de 2.810 milhões de tep em 1973 para 4.131 milhões de tep em 2011. Do mesmo modo, houve um aumento substancial na oferta de energia de fontes renováveis de aproximadamente 103%, para o mesmo intervalo.

Tabela 2.1 - Oferta de energia por fonte nos anos de 1973 e 2011.

| | 1973 | 2011 |
|---|-------------|-------------|
| Petróleo (%) | 46,0 | 31,5 |
| Carvão Mineral (%) | 24,6 | 28,8 |
| Gás Natural (%) | 16 | 21,3 |
| Fontes Renováveis (%) | 10,6 | 10,0 |
| Nuclear (%) | 0,9 | 5,1 |
| Hidráulica (%) | 1,8 | 2,3 |
| Outras (%) | 0,1 | 1,0 |
| Total (milhões de toneladas equivalente de petróleo) | 6.109 | 13.113 |

Fonte: IEA (2013).

¹ Até agosto de 2014, estes eram os dados disponíveis no site do IEA.

A importância no uso de outras tecnologias alternativas para a obtenção de energia elétrica ou combustível para o setor de transporte se baseia na possibilidade de redução no uso de derivados de petróleo, assim como na diminuição do lançamento de gases promotores do efeito estufa (LEITE, 2010). Uma das alternativas encontradas para atender a demanda energética mundial está no uso de biomassa para a produção de biocombustíveis, como por exemplo, o etanol. As matérias-primas utilizadas no processo de obtenção do etanol são divididas em três categorias: matérias contendo sacarose (cana-de-açúcar, beterraba etc.), matérias amiláceas (milho, trigo etc.) e biomassa lignocelulósica (bagaço da cana-de-açúcar, madeira etc.) (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; SOCCOL et al., 2010).

A seleção da matéria-prima para a produção de etanol depende das culturas disponíveis em cada país. As matérias-primas mais comuns usadas para produção de etanol de primeira geração são o milho, a mandioca, o trigo e a cana de açúcar. Brasil (cana-de-açúcar) e Estados Unidos (milho) aparecem como os maiores produtores de etanol do mundo (RFA, 2014), com produção na ordem de bilhões de litros. A Figura 2.1 apresenta dados de produção referente aos anos entre 2006 e 2013.

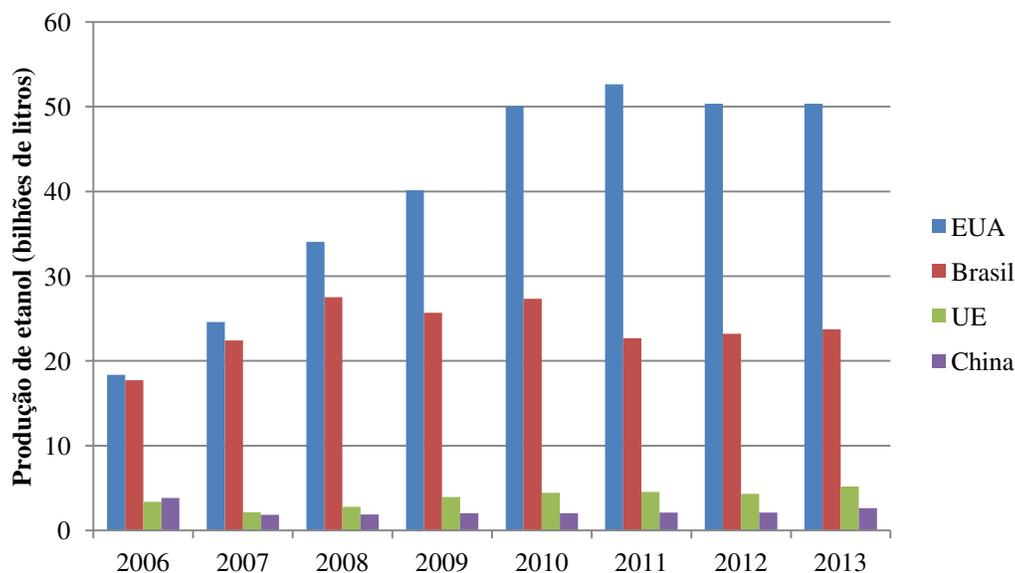


Figura 2.1 - Principais produtores mundiais de etanol. Fonte: RFA (2014) e UNICA (2014).

A Tabela 2.2 apresenta os dados referentes à produção de etanol para o ano de 2012, para os principais produtores de etanol.

Tabela 2.2 - Produção mundial de etanol em 2013.

| Volume (milhões m³) | |
|---------------------------------------|-------|
| EUA | 50,35 |
| Brasil | 23,21 |
| Europa | 5,19 |
| China | 2,64 |
| Índia | 2,06 |
| Canadá | 1,98 |
| Outros | 2,75 |

Fonte: RFA (2014).

Brasil e os Estados Unidos detêm quase a totalidade da produção mundial de etanol (84%). A vantagem do Brasil em relação aos demais produtores de etanol combustível está no uso de uma cultura que não entra em conflito com culturas destinadas à alimentação como é o caso do milho, trigo entre outros.

2.1.2 Produção nacional de energia e etanol

No Brasil há uma grande diversificação das fontes energéticas, sendo as principais o petróleo, gás natural, hidráulica, lenha comercial e produtos de cana, conforme apresentado na Figura 2.2.

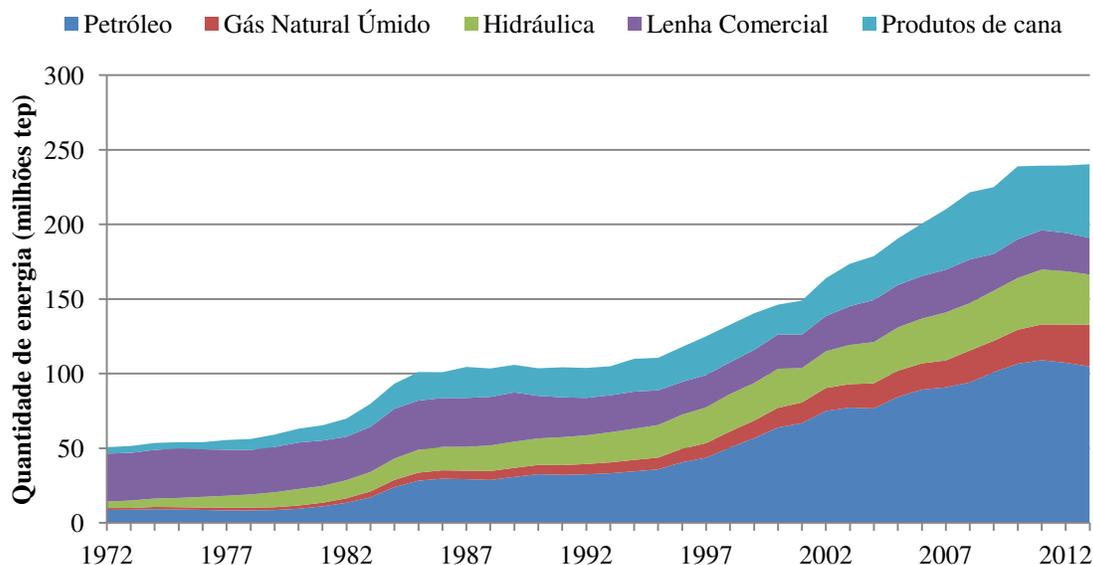


Figura 2.2 - Principais fontes energéticas nacionais. Fonte: MME (2014).

Nota-se que há quarenta anos a principal fonte de energia no país era a queima de lenha comercial. Atualmente, a principal fonte para obtenção de energia elétrica no país é proveniente das usinas hidroelétricas, enquanto os principais combustíveis são provenientes do petróleo e da cana-de-açúcar.

A tendência é que o aumento da produção e consumo de combustíveis renováveis como o etanol, diminua a dependência dos combustíveis fósseis como o petróleo e não renováveis como o carvão mineral.

O Brasil possui posição de destaque em relação aos países desenvolvidos na obtenção de combustíveis alternativos, principalmente quando a matéria-prima utilizada é a cana-de-açúcar (CORTEZ, 2010). A cana-de-açúcar é produzida em mais de 100 países (UNICA, 2014), sendo o Brasil o maior produtor com aproximadamente um terço de toda a produção mundial. Na safra 2013/14 a produção nacional de cana-de-açúcar foi de 659 milhões de toneladas, com uma produção de etanol de 28 milhões de m³ e 38 milhões de toneladas de açúcar (MAPA, 2014).

O mercado sucroalcooleiro teve uma queda na safra de 2011/12 como mostra a Figura 2.3, o que acarretou a diminuição da oferta de etanol e açúcar. Porém, as safras seguintes já mostraram a recuperação do mercado nacional.

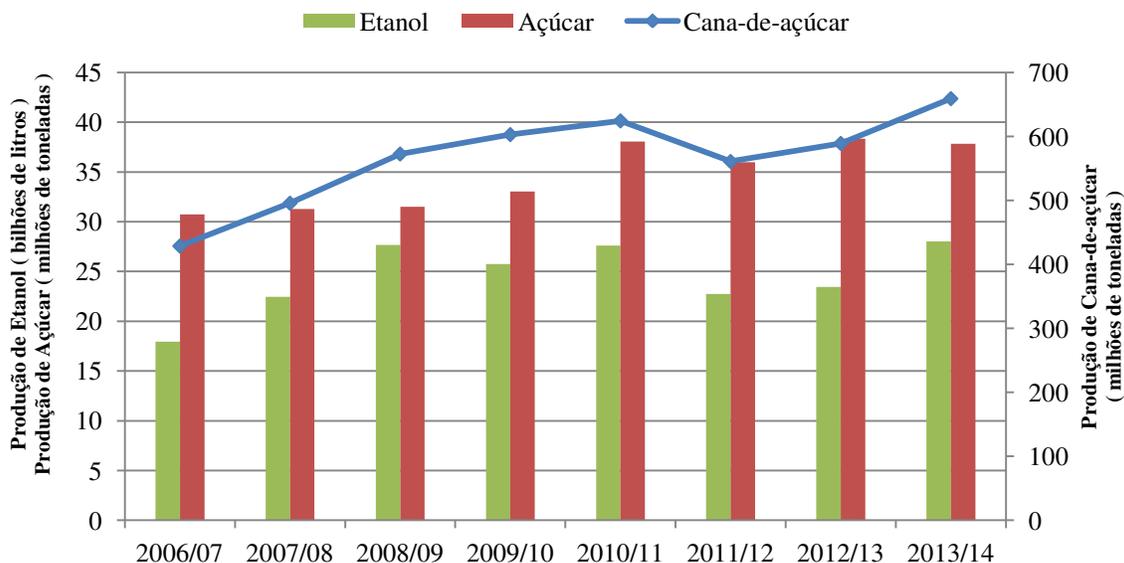


Figura 2.3 - Produção nacional de cana-de-açúcar, etanol e açúcar. Fonte: MAPA (2014).

Tamanha produção é reflexo dos incentivos ao setor, às significativas reduções nos custos e os aumentos nas eficiências das principais etapas do processo envolvidas na obtenção do etanol (teor de sacarose, fermentação, eficiência e produtividade) (CORTEZ, 2010).

Em face ao aumento da produtividade, verifica-se um aumento na exportação de etanol a partir de 2004, ao passo que, a importação de etanol vista na década de 90 foi praticamente nula a partir de 2002. Com exceção dos últimos quatro anos, quando se fez necessária a importação devido a uma queda na produção e o aumento no consumo, conforme Figura 2.4.

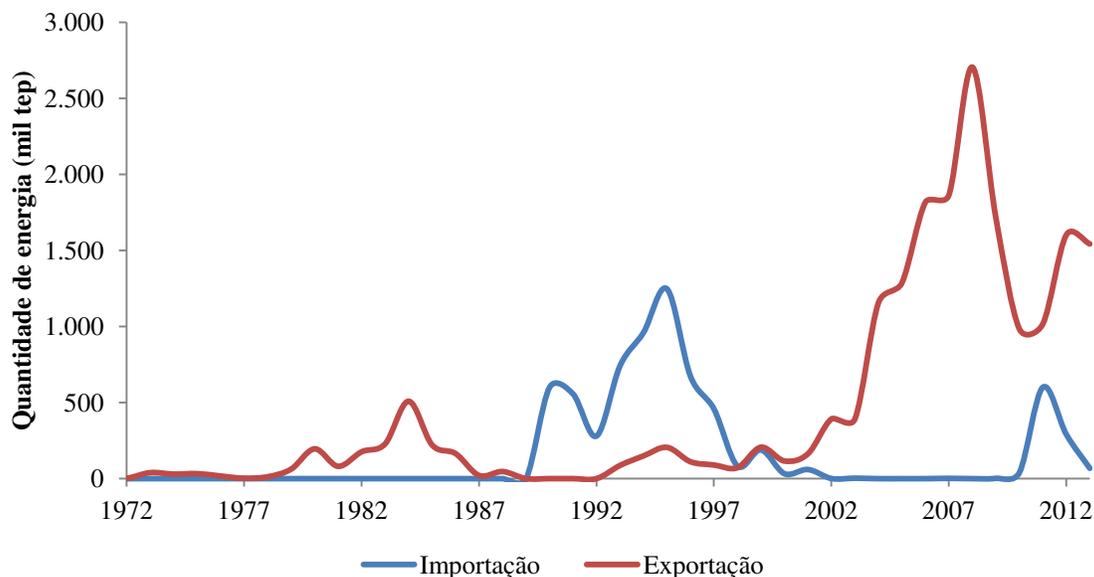


Figura 2.4 - Evolução da importação versus exportação de álcool etílico no Brasil.

Fonte: MME (2014).

Segundo Cortez (2010), o crescente aumento na produção e a redução para US\$ 0,20/L no custo de produção do etanol colocam o Brasil em uma posição de destaque no cenário mundial, porém esta liderança é ameaçada por outros países, os quais alcançaram custos de produção bem próximos do valor brasileiro, enquanto outros países investem pesadamente na obtenção de etanol por meio de materiais lignocelulósicos.

É possível observar na Figura 2.5 que a produção de etanol cada vez maior (Figura 2.3) é acompanhada de maior consumo de etanol no país.

A expansão da produção de etanol pelo setor sucroalcooleiro no Brasil depende da aplicação de estratégias que impulsionem o setor. São elas o aumento na eficiência das tecnologias de primeira geração, aumento da cogeração de eletricidade com o uso do bagaço da cana de açúcar, eliminação da colheita manual, aceleração da mecanização nas áreas com declividade menor do que 12%, orientação na expansão da área de cultivo da cana, formação de *cluster* para facilitar o escoamento da produção e reduzir custos, introdução de tecnologias de segunda geração para a produção de etanol, estímulo à

alcooquímica etc., podendo aumentar a eficiência das usinas atuais de 75% para 88% (GOLDEMBERG, 2010; LEITE, 2010).

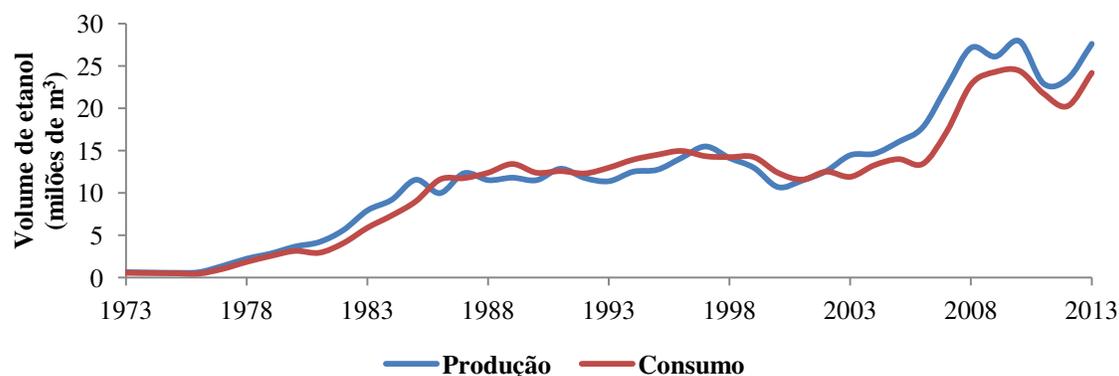


Figura 2.5 - Evolução da produção versus consumo de álcool etílico no Brasil. Fonte: MME (2014).

Os maiores produtores de cana, açúcar e etanol se encontram na região centro-sul do país, conforme apresentado na Tabela 2.3, em que o estado de São Paulo é o maior produtor com cerca 56%, 64% e 51%, respectivamente.

Tabela 2.3 - Maiores estados produtores de cana-de-açúcar, açúcar e etanol na safra de 2013/14.

| Estados | Cana | Açúcar | Etanol |
|---------------------------|-----------------|-----------------|----------|
| | (mil toneladas) | (mil toneladas) | (mil m³) |
| São Paulo | 367.450 | 23.963 | 13.944 |
| Goiás | 62.018 | 1.891 | 3.879 |
| Minas Gerais | 61.042 | 3.411 | 2.657 |
| Paraná | 42.216 | 492 | 1.488 |
| Mato Grosso do Sul | 41.496 | 614 | 2.231 |
| Brasil | 653.444 | 37.709 | 27.537 |

Fonte: UNICA (2014).

O balanço energético (razão da energia contida num dado volume de álcool para a energia usada na sua preparação) na produção do etanol pode chegar a 10:1 utilizando a cana, enquanto o etanol americano (milho) é de apenas 1,3:1. Esta diferença pode ser explicada pelo uso do bagaço para a cogeração de energia elétrica por meio da queima do mesmo (GOLDEMBERG, 2010), podendo ser ampliada com o desenvolvimento da tecnologia do etanol de segunda geração e uso da palha para cogeração.

O caldo de sacarose representa apenas um terço do conteúdo energético da cana de açúcar. Os outros dois terços estão divididos igualmente no bagaço e nas pontas e folhas da cana de açúcar (GOLDEMBERG, 2010). Do ponto de vista ambiental, a troca do petróleo pelo etanol combustível é interessante, pois se verifica uma redução significativa das emissões dos gases de efeito estufa.

O Brasil entre os anos de 1975 e 2000 deixou de emitir cerca de 403 milhões de toneladas de CO₂ para a atmosfera, em função do uso de etanol como combustível (BERTELLI, 2006).

Assim, o setor sucroalcooleiro do Brasil encontra um novo mercado por meio da comercialização de créditos de carbono para os países desenvolvidos. Segundo DW (2012), os países industrializados precisam reduzir suas emissões de gases do efeito estufa em relação aos níveis de 1990 até 2020.

As usinas de açúcar e álcool já contribuem para a redução de emissões de gases do efeito estufa, por meio de uma energia limpa, como o álcool e a energia elétrica através do aproveitamento do bagaço da cana. Deste modo, além de render lucros com a produção de açúcar e álcool e energia elétrica, ela poderá contribuir com a redução dos gases do efeito estufa, e ainda se beneficiar do mecanismo de troca de emissões previsto no Protocolo de Kyoto.

Nas usinas sucroalcooleiras existe a grande disponibilidade de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana. Atualmente, o bagaço de cana das usinas sucroalcooleiras é utilizado para a produção de energia elétrica a partir de sistemas de cogeração. O bagaço é utilizado como combustível de queima nas caldeiras para a produção de vapor, em seguida este vapor é direcionado para uma turbina produzindo trabalho e então convertido em energia elétrica (ALBARELLI, 2013).

A energia elétrica produzida é utilizada internamente nas usinas para acionamento de equipamentos, suprimindo a demanda energética na planta. Porém, o uso de equipamentos com melhor eficiência na queima permite a geração de excedente de energia, que pode ser comercializado no mercado por meio de contratos entre a usina e a concessionária de distribuição da região. Essa autossuficiência e a possibilidade de comercialização dos excedentes gera um capital para a indústria (WALTER; ENSINAS, 2010).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo que a região centro-sul produz 98% de toda a cana-de-açúcar do país (MAPA, 2014). Porém, apenas um terço da planta é utilizada para a produção de açúcar e etanol, os outros dois terços correspondem aos resíduos de colheita e de processo (palhas e bagaço da cana).

Este material lignocelulósico apresenta um grande potencial para a obtenção de etanol de segunda geração, visto que estudos mostram a possibilidade de um aumento substancial na produção total de etanol sem aumento no uso de terras necessárias para o plantio da cana-de-açúcar (SOCCOL et al., 2010).

A produção de etanol de segunda geração se dá pela utilização de materiais lignocelulósicos, os quais podem ser divididos em cinco grupos: resíduos agrícolas, madeira, resíduos de materiais celulósicos, biomassa herbácea e resíduos sólidos gerados nas cidades. Apesar de inúmeros estudos na área, o principal fator limitante na obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos está no grau de complexidade inerente ao tratamento das matérias primas (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.2 Biomassa lignocelulósica

Biomassa é todo material orgânico de origem vegetal, que armazena energia solar através da reação de fotossíntese, e material orgânico animal. São exemplos de biomassa resíduos orgânicos, florestais, vegetais, industriais e detritos de animais, sendo de grande interesse os resíduos agrícolas como a casca de arroz, a serragem, palhas de milho, bagaço da cana-de-açúcar entre outros.

Segundo Cortez et al. (2009), do ponto de vista energético, a biomassa é todo recurso renovável oriundo dos resíduos citados anteriormente que podem ser utilizados para geração de fontes alternativas de energia. A biomassa de origem vegetal, também chamada de biomassa lignocelulósica é, segundo Sánchez e Cardona (2008), a biomassa renovável mais abundante no planeta com uma produção anual de 1×10^{10} Mt.

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são a celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes minoritários, os quais variam dependendo da biomassa. A hemicelulose e celulose são polissacarídeos e, portanto, fontes potenciais de açúcares fermentáveis. A Figura 2.6 esquematiza como estas moléculas se arranjam para formar a parede celular das biomassas.

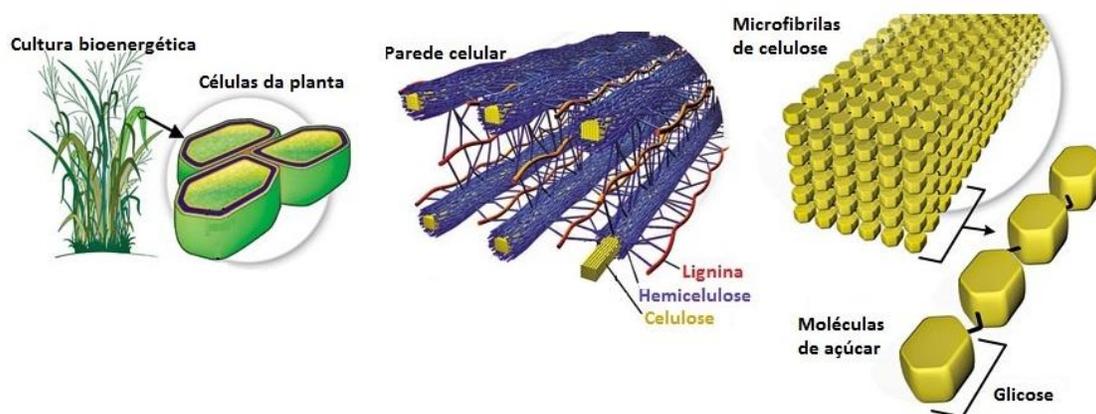


Figura 2.6 - Arranjo estrutural das moléculas na formação da parede celular. Fonte: (RITTER, 2008).

2.2.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo insolúvel em água, estimada como sendo o composto orgânico mais abundante no planeta, e o principal componente das fibras vegetais, sendo um dos constituintes da parede celular. Este polissacarídeo é formado por unidades de celobiose que, por sua vez, é formada por duas moléculas de glicose, monossacarídeo de ocorrência natural, por meio de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (HARMSSEN et al., 2010; KUMAR et al., 2009; MARTINS, 2005) conforme mostrado na Figura 2.7.

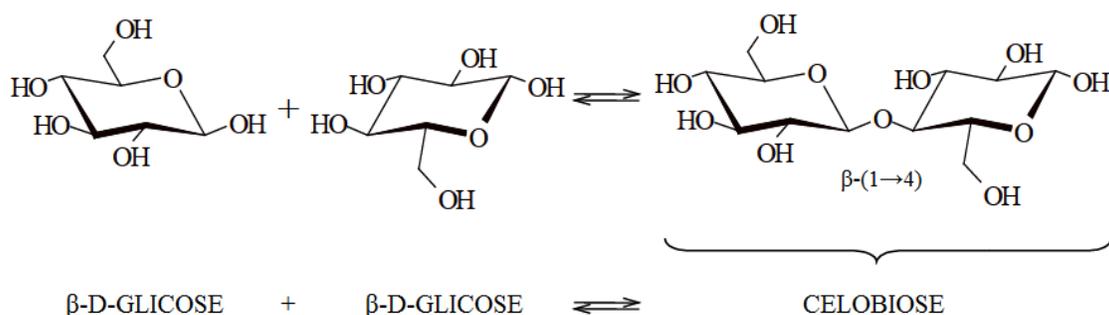


Figura 2.7 - Formação da ligação celobiose, através da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose. Fonte: MARTINS (2005).

Cadeias de celulose são formadas simultaneamente de forma ordenada, buscando um arranjo supramolecular que confira maior estabilidade ao agregado, e portanto, menor energia potencial. Este arranjo depende de uma rede de ligações de hidrogênio cuja otimização provoca uma rotação de 180° da segunda unidade de glicose em relação à primeira, e assim por diante. Portanto, a celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose (Figura 2.8), enquanto a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (MARTINS, 2005).

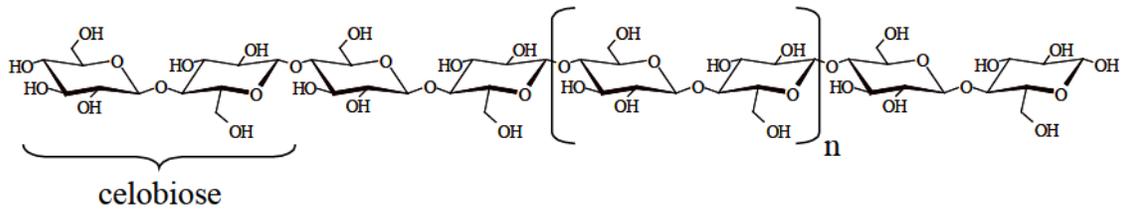


Figura 2.8 - Representação da estrutura linear da celulose, formada pelas unidades de celobiose. Fonte: MARTINS (2005).

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é avaliado por meio do grau de polimerização. Este representa o número de monômeros de glicose que formam cada cadeia polimérica. O grau de polimerização da celulose varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento que as fibras possam ter sofrido e o seu envelhecimento (MARTINS, 2005).

O grau de polimerização da celulose pode chegar a 17.000 monômeros de glicose, dependendo da biomassa. Os polímeros de celulose se ligam entre si através das ligações de hidrogênio formando estruturas cristalinas e não cristalinas. A solubilidade da celulose é afetada por diversas condições, como altas temperaturas, presença de ácidos concentrados, soluções alcalinas ou solventes (HARMSEN et al., 2010).

A estrutura supramolecular da celulose (Figura 2.9) apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas (MARTINS, 2005).

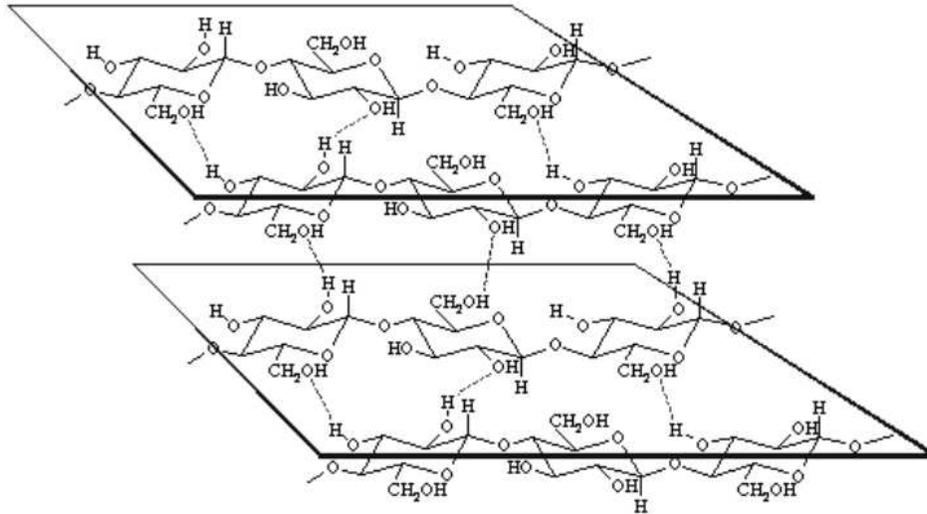


Figura 2.9 - Formação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose. Fonte: MARTINS (2005).

As longas cadeias de celulose são ligadas por pontes de hidrogênio e ligações de van der Waals, o que faz com que a celulose seja agrupada em microfibrilas (KUMAR et al., 2009). A fibra de celulose é composta de milhões de microfibrilas, contendo uma região cristalina formada de microcristais em arranjo linear rígido (Figura 2.10) e uma região paracristalina, que é uma massa amorfa e flexível de celulose (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013), conforme Figura 2.11.

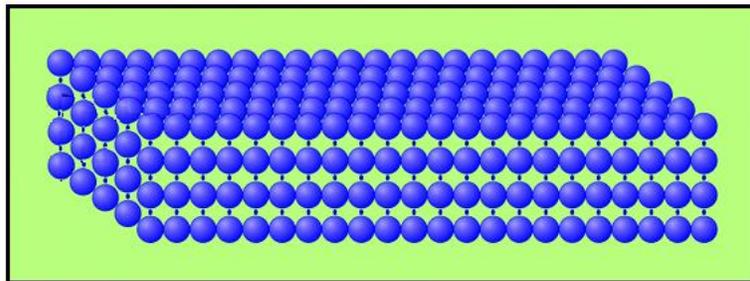


Figura 2.10 - Representação da região cristalina da celulose. Adaptado de Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol (2013).

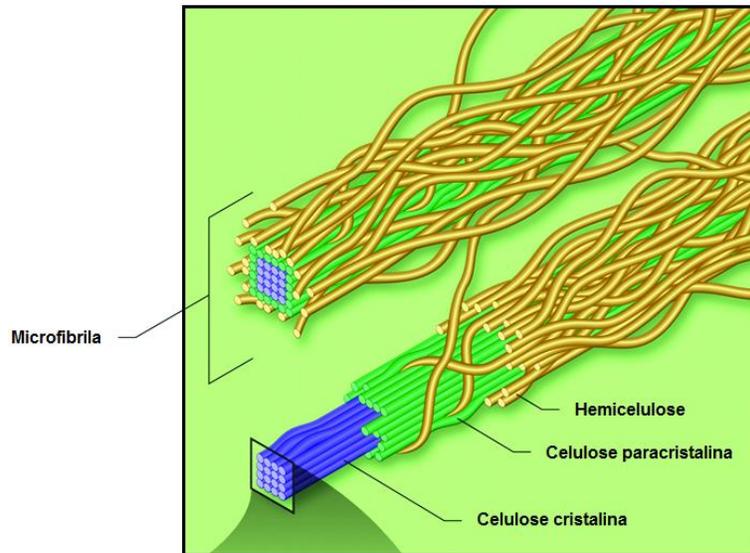


Figura 2.11 - Representação das celulosas cristalina e paracristalina na microfibrila. Adaptado de Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol (2013).

As moléculas de celulose se organizam paralelamente formando uma microfibrila extremamente longa e resistente. Em sua superfície, moléculas de hemicelulose recobrem a celulose formando um complexo celulose-hemicelulose (BUCKERIDGE et al., 2010) conforme Figura 2.12.

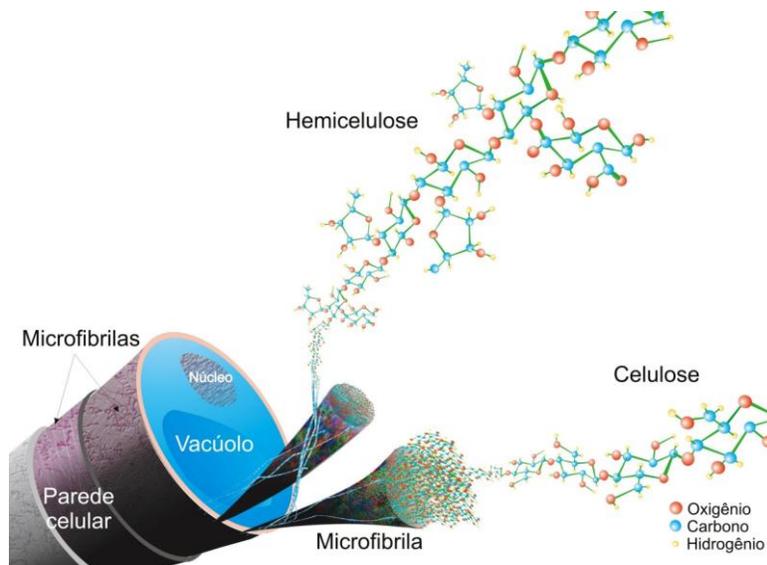


Figura 2.12 - Representação esquemática da microfibrila. Fonte: BUCKERIDGE et al. (2010).

2.2.2 Hemicelulose

As moléculas de hemicelulose são estruturas complexas facilmente hidrolisáveis, apresentam uma massa molecular pequena quando comparadas a diferentes polímeros, são formados por pentoses, hexoses e ácidos. Estes podem ser a xilose, arabinose, manose, glicose, galactose, ácido ferúlico entre outros. A grande maioria das plantas apresenta o xiloglucano como principal hemicelulose (Figura 2.13). A função da hemicelulose é conectar a lignina e a celulose, conferindo rigidez ao complexo celulose-hemicelulose-lignina (BUCKERIDGE et al., 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

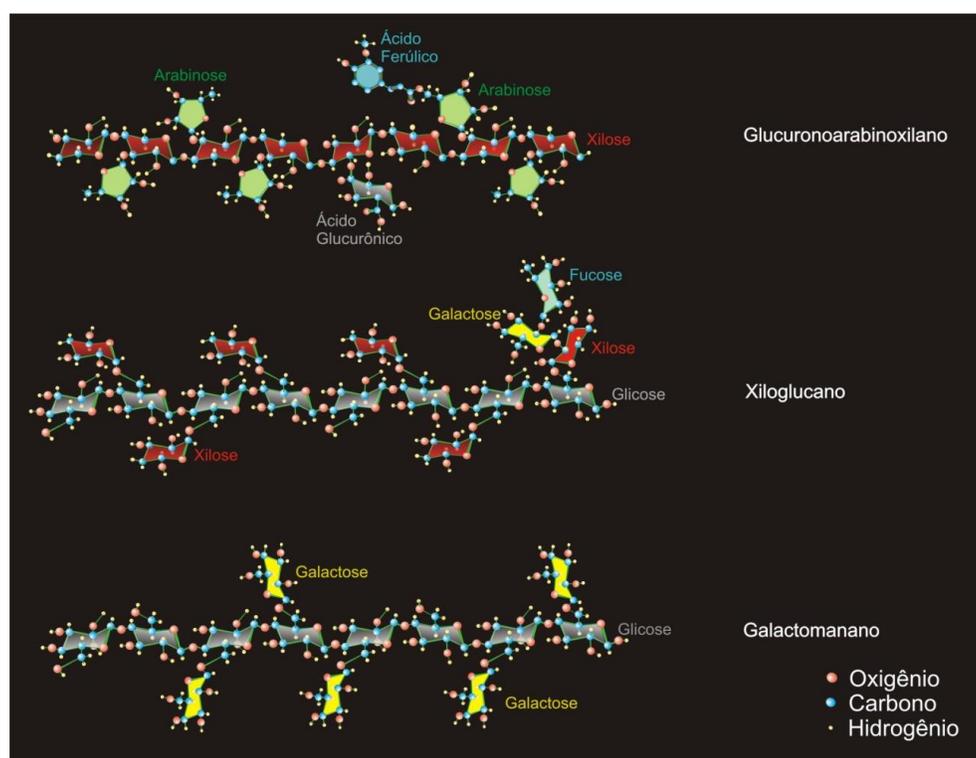


Figura 2.13 - Principais estruturas de hemiceluloses das paredes celulares das plantas.

Fonte: BUCKERIDGE et al. (2010).

A hemicelulose é composta por vários polissacarídeos, principalmente as xilanas, com ligações do tipo β (1 \rightarrow 4) que apresentam um grau de polimerização de aproximadamente de 150 a 200 monômeros (HARMSSEN et al., 2010).

Na Figura 2.13 é possível ver os principais monômeros que constroem as moléculas de hemicelulose. A cana-de-açúcar tem como sua principal hemicelulose o glucuronoarabinoxilano (GAX), além de xiloglucano e manano em proporções menores (BUCKERIDGE et al., 2010).

A solubilização da hemicelulose na água começa a partir de 150°C (GARROTE et al., 1999), porém outros fatores além da temperatura afetam a solubilização, como a umidade e pH (BUCKERIDGE et al., 2010). A presença de resíduos de ácido ferúlico esterificados e resíduos de arabinose formam uma ramificação que ligam as cadeias de GAX (BUCKERIDGE et al., 2010), conforme mostrado na Figura 2.14, criando uma barreira rígida que impede o ataque eficaz da enzimas hidrolíticas.

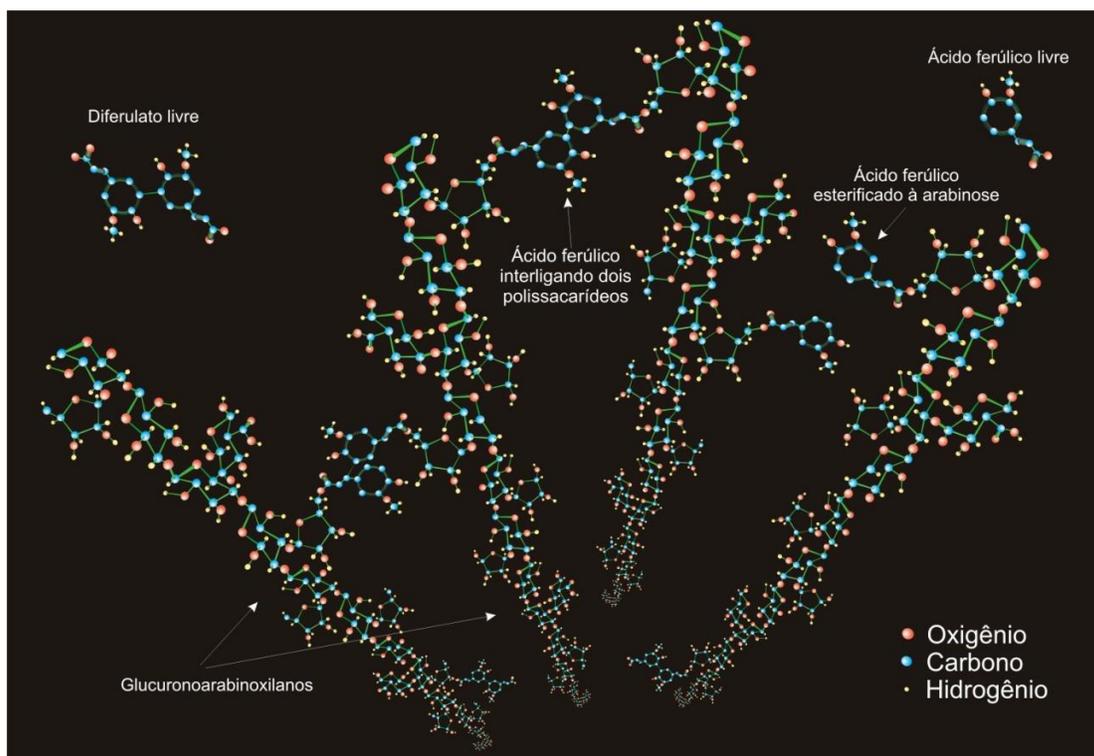


Figura 2.14 - Ligação das cadeias de glucuronoarabinoxilanos por meio dos resíduos de ácido ferúlico e arabinose. Fonte: BUCKERIDGE et al. (2010).

Quando examinada em microscópio de fluorescência esta barreira rígida formada pela ligação entre as cadeias de GAX apresentam autofluorescência (BUCKERIDGE et al., 2010), conforme verificado na Figura 2.15.

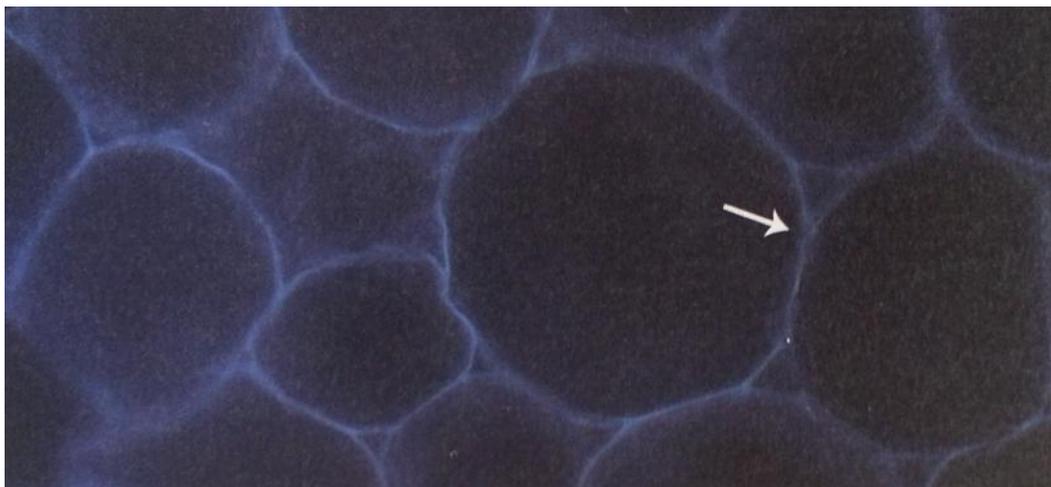


Figura 2.15 - Autofluorescência da parede celular da cana-de-açúcar. Fonte: BUCKERIDGE et al. (2010).

2.2.3 Lignina

Segundo Kumar et al. (2009), a lignina é uma grande estrutura molecular complexa contendo polímeros reticulados de monômeros fenólicos. Depois da celulose e hemicelulose, a lignina é um dos polímeros mais abundantes na natureza (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

Os monômeros que podem compor a lignina são guaiacila, siringila e p-hidroxifenila. As ligações que ligam os monômeros fenólicos na lignina são alquil-alkil-éter, alquil-aril-éter e aril-aril-éter (KUMAR et al., 2009).

Segundo Barbosa (2008), a lignina é classificada de acordo com a quantidade relativa dos monômeros guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H), que são derivadas dos álcoois coniferílico, sinapílico e cumarílico, conforme Figura 2.16 e Figura 2.17.

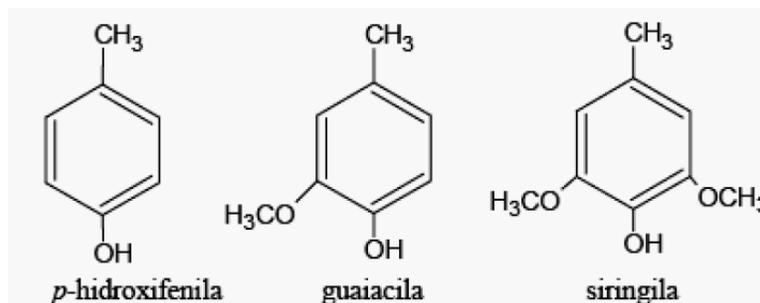


Figura 2.16 - Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina. Fonte: CAMARGO (2003).

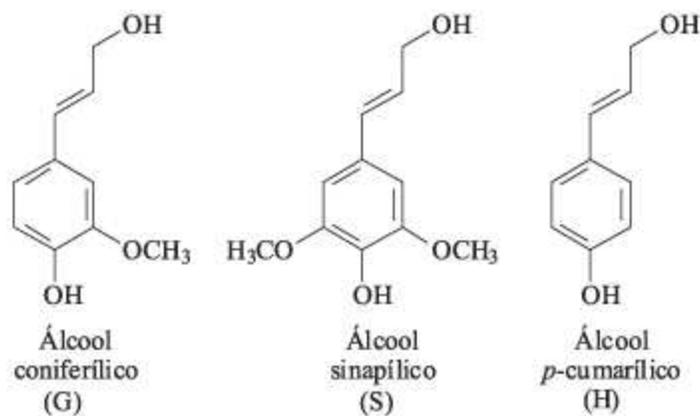


Figura 2.17 - Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H). Fonte: BARBOSA et al. (2008).

A lignina tem como principal papel, fornecer o suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques de microrganismos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

Segundo Hendriks e Zeeman (2008), a lignina apresenta a maior complexidade entre os polímeros naturais, é composta por uma rede tridimensional insolúvel em água, e é o composto responsável pela resistência ao impacto, compressão e flexão da biomassa lignocelulósica. A Figura 2.18 ilustra um exemplo de lignina.

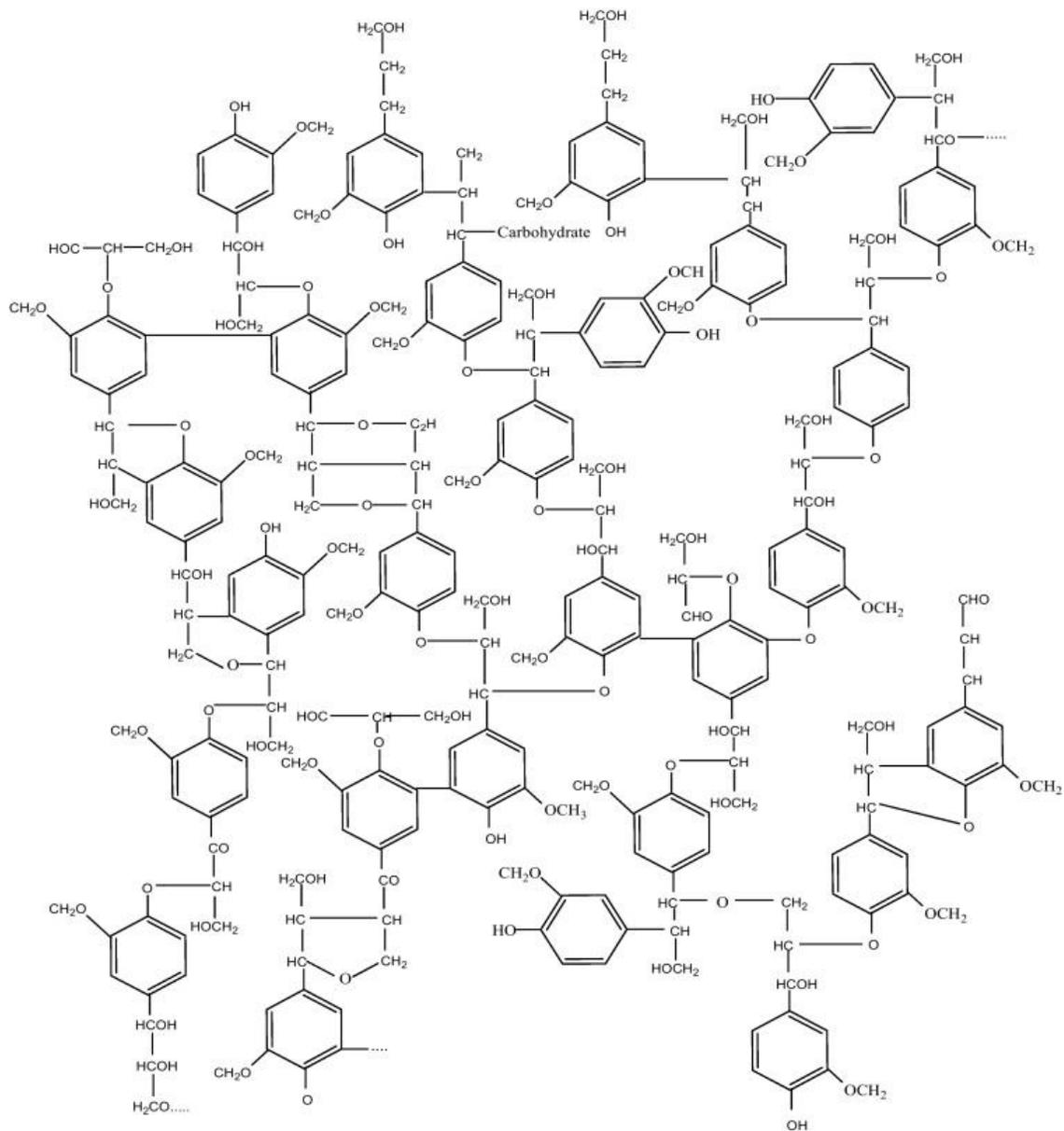


Figura 2.18 - Representação da estrutura química da lignina. Fonte: MOHAMMED et al. (2011).

As ligações éster, éter e pontes de hidrogênio são as responsáveis pelas ligações interpoliméricas entre a celulose, hemicelulose e lignina (HARMSSEN et al., 2010).

2.2.4 Extrativos

Os extrativos em uma biomassa lignocelulósica correspondem aos compostos presentes no material lignocelulósico com exceção da celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. Hames (2009) define os extrativos como sendo todos os compostos da planta que não são parte da estrutura da parede celular e que podem ser extraídos pela água ou solventes orgânicos.

Os extrativos de uma planta contém uma mistura complexa e não uniforme de compostos orgânicos de baixa massa molecular, todos com propriedades químicas diferentes, tais como os açúcares não estruturais, aminoácidos, sais, lípidos, ceras, terpenos, flavonóides, esteróis e clorofila (KUCHELMEISTER; BAUER, 2014).

Sluiter et al. (2010) verificaram que a presença de certos compostos extrativos pode reduzir a acessibilidade à celulose e à hemicelulose, causando uma hidrólise incompleta. Alguns extrativos são insolúveis em ácido e podem precipitar junto com a lignina elevando o teor de lignina pelo método Klason (método no qual os polissacarídeos são removidos e a lignina é liberada como resíduo pela hidrólise ácida).

A biomassa com maior quantidade de açúcares livres não estruturais (por exemplo, cana de açúcar) deve ser sujeita a uma etapa de extração com água, seguido de uma extração com etanol. Isto assegura que esses açúcares não serão determinados em conjunto com os açúcares liberados pela hidrólise da celulose e hemicelulose causando um teor de carboidrato estrutural elevado. A quantificação do material não estrutural é difícil devido ao grande número de compostos individuais com concentrações baixas, com exceção da sacarose (SLUITER, J. B. et al., 2010).

2.3 Pré-tratamento da biomassa

Para obtenção dos açúcares necessários à fermentação em etanol é vital que os polissacarídeos celulose e hemicelulose sejam quebrados em monossacarídeos como hexoses e pentoses (SOCCOL et al., 2010). A hidrólise dos polissacarídeos em

monossacarídeos é possível pelo emprego de ácidos ou enzimas, sendo o último o mais utilizado (CARDONA et al., 2010). No entanto a biomassa lignocelulósica consiste em uma rede complexa e se divide em três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, os quais variam dependendo da biomassa. Deste modo, se faz necessário o uso de um pré-tratamento na biomassa lignocelulósica a fim de aumentar a taxa de conversão na hidrólise.

O pré-tratamento é reconhecido como a etapa mais onerosa do processo da conversão da biomassa em açúcares, sendo vital a importância da escolha correta de acordo com o material lignocelulósico. A escolha do pré-tratamento depende principalmente da fração de hemicelulose, celulose e lignina, assim como os produtos desejados (HARMSSEN et al., 2010).

O principal objetivo do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica consiste em criar condições para que a biomassa seja suscetível à conversão em açúcares fermentáveis pelo ataque enzimático de maneira mais eficiente. Esta suscetibilidade é dada pela alteração da estrutura celular da biomassa, para que sejam alcançadas maiores taxas de hidrólise da celulose e hemicelulose, ou mesmo, a remoção da lignina e a ruptura da estrutura cristalina (GAO et al., 2010; HARMSSEN et al., 2010).

Segundo Harmsen et al. (2010), a remoção da lignina nos primeiros estágios do processo é extremamente atraente, pois ela dificulta a ação das enzimas na conversão em açúcares e pode ser recuperada como um coproduto devido ao seu alto valor agregado.

Diversos artigos destacam a importância da utilização da lignina para outras aplicações e não apenas para conversão em energia pela sua queima. Segundo Setua et al. (2000), a incorporação da lignina é utilizada na borracha de acrilonitrilo butadieno (NBR) para aprimorar as propriedades físico-mecânicas.

A lignina é um ótimo reforço como carga em borracha nitrílica dependendo do tratamento químico empregado. A adição da lignina modificada resultou em uma melhor estabilidade térmica na borracha vulcanizada quando comparada com a resina fenólica ou de negro de fumo. A lignina tem a capacidade de substituir o negro de fumo em aplicações onde a resistência mecânica da NBR é a principal preocupação (SETUA et al., 2000).

Adesivos à base de lignina apresentam um grande potencial para aplicações de engenharia, devido à sua adequação ambiental e de viabilidade econômica e técnica. A lignina como um aglomerante pode ser utilizada na produção de adesivos para madeira em produtos de painel (GHAFAR; FAN, 2014).

Lignina pode também ser incorporada no preparo de resinas epóxi, um dos mais importantes polímeros termofixos. A aplicação da lignina em resinas epóxi fenólicas funciona como um agente de reticulação (STEWART, 2008). Inúmeras são as aplicações que vem sendo estudadas, além das mencionadas anteriormente, como ligantes na argamassa (NADIF et al., 2002), aditivos para plásticos biodegradáveis (STEWART, 2008), copolímeros de poliuretano (KELLEY et al., 1989) entre outros.

2.3.1 Principais efeitos do pré-tratamento

Dependendo da técnica aplicada no pré-tratamento, a biomassa sofre efeitos físicos, químicos ou biológicos característicos que são responsáveis pelo aumento da conversão, posteriormente, na hidrólise enzimática. Estes efeitos facilitam a ação da enzima sobre a biomassa lignocelulósica.

Os principais efeitos do pré-tratamento na biomassa, são o aumento da área superficial e da porosidade, modificação da estrutura da lignina, remoção da lignina, despolimerização da hemicelulose, remoção da hemicelulose e redução da cristalinidade da celulose.

Cada pré-tratamento apresenta uma série de vantagens e desvantagens nestes efeitos, assim, devido à ampla gama de pré-tratamentos estudados, é necessária uma avaliação (econômica e dos produtos formados) mais detalhada na escolha de acordo com a matéria-prima (SOCCOL et al., 2010).

2.3.1.1 Área superficial específica

A digestibilidade enzimática de materiais lignocelulósicos está intimamente ligada ao volume de poros presentes na biomassa (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Quanto maior for a área acessível ao ataque enzimático, maior será a conversão na hidrólise enzimática. O aumento do volume de poros na biomassa se deve à remoção de outros componentes do material lignocelulósico, por exemplo, a lignina e hemicelulose.

Deste modo, o efeito da área superficial disponível não depende somente da porosidade do material, mas também de outros fatores como a cristalinidade da celulose e do modo em que a lignina e hemicelulose estão arrançadas.

São duas as áreas superficiais que devem ser observadas: interna e externa. A área superficial interna depende da estrutura capilar formada pelas fibras celulósicas, enquanto a área superficial externa está relacionada com o tamanho e forma das partículas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

No entanto a área superficial interna das fibras celulósicas secas é menor do que a área superficial externa. Uma solução para o aumento da área superficial interna consiste no intumescimento do material lignocelulósico por meio da adição de água ou solventes (FAN et al., 1980).

Segundo Taherzadeh e Karimi (2008), a secagem das fibras pode resultar no colapso e no encolhimento dos capilares, conseqüentemente reduzindo a área superficial disponível. A presença de água tem um efeito significativo sobre a área de superfície específica da celulose natural e pode aumentar a cristalinidade de celulose, devido a uma re-cristalização de parte da celulose.

A velocidade de hidrólise é mais elevada no início seguido de um decaimento nas fases posteriores. A área superficial sofre mudanças durante a hidrólise enzimática, com um aumento acentuado no início da hidrólise. No entanto a área superficial da celulose não é um fator limitante para a hidrólise da celulose pura. Uma das razões pela qual a velocidade diminui pode ser devido à dificuldade de hidrolisar parte da celulose cristalina. Portanto,

após a hidrólise da parte amorfa da celulose a tendência é que se verifique uma menor taxa de hidrólise (FAN et al., 1980).

2.3.1.2 Efeito da lignina

A lignina é responsável pela integridade física do material lignocelulósico e pela sustentação ao se ligar com a celulose e hemicelulose. A recalcitrância dos materiais lignocelulósicos depende da distribuição, teor de lignina e dos tipos de lignina na biomassa limitando a acessibilidade da enzima na degradação enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Segundo Ramos et al. (1992), a lignina guaiacil é encontrada em madeiras de árvores coníferas apresenta uma recalcitrância maior do que as madeiras encontradas em árvores folhosas, as quais possuem composição de ligninas do tipo guaiacil e siringil. A lignina guaiacil restringe o acesso da enzima e a capacidade da biomassa em absorver água mais do que a lignina siringil.

O uso da engenharia genética para modificação das plantas é uma solução para aumentar a acessibilidade das enzimas em biomassas lignocelulósicas para a produção de biocombustíveis, assim como, diminuir os custos associados com o pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

O enfoque da engenharia genética em criar enzimas capazes de hidrolisar a celulose e hemicelulose simultaneamente de forma eficiente, pode vir a equilibrar a baixa eficiência na sacarificação atual devido à presença da lignina ou até mesmo diminuir a quantidade de enzimas necessárias para a hidrólise enzimática (STICKLEN, 2008).

Segundo Hisano et al. (2009), diversos trabalhos encontrados na literatura contêm estudos para modificar ou diminuir a quantidade da lignina em biomassas como alfafa, milho, festuca (gramínea) etc., por causa da recalcitrância encontrada nestas biomassas.

Como a engenharia genética cumpre um papel importante na modificação da lignina, a disponibilidade ou a criação de um sistema de transformação altamente eficiente para os materiais lignocelulósicos é um pré-requisito importante para a manipulação bem

sucedida dos genes de lignina para modificar a qualidade ou quantidade de biomassa (GRESSEL, 2008).

Segundo Chen e Dixon (2007), para a biomassa de alfafa, menores teores de lignina apresentaram os maiores níveis totais de carboidratos para a biomassa não tratada, compensação refletida pela redução do nível de lignina na biomassa. A quantidade de carboidratos liberados pelo pré-tratamento ácido apresentou um aumento proporcional à redução dos níveis de lignina.

Chen e Dixon (2007) verificaram que para a alfafa transgênica, a redução genética no teor de lignina superou a recalcitrância da parede celular da biomassa. O desafio na produção de etanol é que a biomassa tem de ser submetida a um tratamento prévio, muitas vezes inviável, para aumentar a acessibilidade das enzimas na biomassa. Porém, verificou-se que para diversas linhagens transgênicas de alfafa as maiores conversões em açúcares se deram nas amostras não pré-tratadas, sendo possível reduzir ou eliminar a etapa de pré-tratamento da biomassa a partir de plantas transgênicas com baixo teor de lignina, reduzindo, assim, o custo de produção de biocombustíveis.

2.3.1.3 Efeito da hemicelulose

A hemicelulose é um polisacarídeo presente nos materiais lignocelulósicos, a qual se liga à lignina e celulose formando uma rede complexa que protege a celulose de um ataque enzimático, impossibilitando uma conversão em açúcares eficiente. Existem enzimas específicas para remover ou hidrolisar este polissacarídeo, porém esta especificidade impede a solubilização da celulose, essencial para conversão em glicose. Inúmeros são os pré-tratamentos extensivamente estudados a fim de remover a hemicelulose para obter-se um aumento no rendimento da hidrólise enzimática. Geralmente estes pré-tratamentos removem também parte da lignina, aumentando a porosidade e consequentemente a taxa de conversão da hidrólise (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Portanto, geralmente é uma soma de fatores que eleva o rendimento na hidrólise enzimática, sendo mais viável utilizar pré-tratamentos que removam a hemicelulose do que usar uma combinação de enzimas que consigam atacar a hemicelulose e celulose.

2.3.1.4 Cristalinidade

A celulose é composta de microfibrilas que possuem regiões cristalinas e amorfas. A quantidade relativa de regiões cristalina e amorfa dita o grau de cristalinidade da celulose. Cerca de 70 % da celulose total encontra-se na forma cristalina (CHUM et al., 1985). Segundo Fan et al. (1980), a parte amorfa da celulose é facilmente hidrolisada quando submetida a tal processo, no entanto a parte cristalina é muito mais resistente ao ataque enzimático. Assim, quanto maior a cristalinidade da celulose, maior será a resistência da enzima para hidrolisar a celulose.

No entanto dependendo dos fatores analisados, é possível encontrar na literatura experimentos em que foi verificado maior digestibilidade enzimática para celulosas mais cristalinas (KIM; HOLTZAPPLE, 2006), e não necessariamente este aumento influencia a taxa de conversão na hidrólise. Segundo Taherzadeh e Karimi (2008), diversos trabalhos indicam que a cristalinidade é um importante fator na digestibilidade de materiais lignocelulósicos, porém este não é o único fator que afeta a hidrólise enzimática destes materiais.

As etapas de pré-tratamento tem como objetivo reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a quantidade de poros, para que seja possível melhorar a sua conversão enzimática (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Segundo Zheng et al. (1995), o pré-tratamento de um material celulósico com CO₂ supercrítico contribui com a diminuição da cristalinidade. No entanto Narayanaswamy et al. (2011) verificaram que esta afirmação nem sempre é válida, visto que para a palha de milho não houve mudanças em sua cristalinidade. Porém, o fato de não diminuir a cristalinidade da celulose da palha de milho não foi suficiente, para que isso afetasse negativamente a conversão da celulose em glicose após o pré-tratamento supercrítico.

De acordo com Puri (1984) e Thompson et al. (1992), devido à complexidade da biomassa lignocelulósica tem-se que a digestibilidade da biomassa lignocelulósica não pode ser determinada apenas por sua cristalinidade, mas por uma série de outros fatores envolvidos, ao contrário do que relatado no trabalho para celulose pura de Zheng et al. (1995).

Na hidrólise enzimática, etapa subsequente ao pré-tratamento, a cristalinidade tende a aumentar nas amostras, pois na hidrólise as regiões amorfas de celulose, parte da hemicelulose e lignina são hidrolisadas aumentando assim a porcentagem relativa da região cristalina (CAO; TAN, 2002; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Deste modo, conclui-se que a diminuição da cristalinidade do material lignocelulósico pelo pré-tratamento pode contribuir para um aumento da conversão em glicose, e que a falta de uma diminuição na cristalinidade não é suficiente para indicar uma menor conversão em glicose, pois a conversão em glicose não depende somente na mudança desta variável.

2.3.2 Tipos de pré-tratamento

Os pré-tratamentos podem ser divididos em três categorias: físico, químico e biológico. Cada pré-tratamento possui sua particularidade e seu uso está ligado às características presentes na biomassa lignocelulósica estudada. De um modo geral, o pré-tratamento para uma determinada biomassa lignocelulósica é selecionado a fim de maximizar algum efeito, como priorizar a remoção da hemicelulose, alteração da estrutura da lignina, alteração da cristalinidade da celulose etc., ou mesmo minimizar algum efeito indesejável como um pré-tratamento com baixo impacto ambiental ou selecionar um pré-tratamento para que minimize ou até mesmo não forme compostos inibidores.

Os principais processos físicos como a moagem e trituração da biomassa têm como principal finalidade facilitar o seu manuseio e aumentar a área superficial da biomassa, porém o alto consumo energético empregado ainda pode inviabilizar o processo (HARMSEN et al., 2010). De Vrije et al. (2002) e Alinia et al. (2010) verificaram um aumento eficaz na taxa de hidrólise à medida que os tamanhos de partículas diminuam, quando combinados ou não a pré-tratamentos físico e químico.

Os processos químicos têm como principal característica a ruptura da estrutura da biomassa. Hidrólise por ácido diluído e concentrado, soluções alcalinas, solventes orgânicos, deslignificação oxidativa, tratamento com água quente e líquidos iônicos são alguns dos pré-tratamentos utilizados (HARMSEN et al., 2010). Os pré-tratamentos químicos têm como principais objetivos, a remoção da lignina e o aumento na taxa de conversão em açúcares. Segundo Hamelinck et al. (2005) e De Vrije et al. (2002), o pré-tratamento alcalino consegue remover praticamente toda a lignina e parte da hemicelulose. O pré-tratamento alcalino apresenta um custo inferior ao tratamento ácido obtendo taxas de recuperação de xilose de 60 a 75% (HAMELINCK et al., 2005), porém assim como o pré-tratamento ácido, ainda é inviável em escala industrial (CARDONA et al., 2010).

Os processos biológicos utilizam microrganismos que são usados na degradação da hemicelulose e lignina, mas necessitam de um tempo de residência alto devido à sua baixa taxa de hidrólise biológica. A principal vantagem no uso de microrganismos está na baixa necessidade de energia e condições de operações brandas (HARMSEN et al., 2010).

As combinações dos métodos físico-químicos podem ser explosão a vapor, explosão com gás carbônico, explosão da fibra com amônia (AFEX), pré-tratamento mecânico e alcalino entre outros.

O pré-tratamento combinado mecânico e alcalino remove a lignina, enquanto a celulose e parte da hemicelulose permanecem na fração sólida. Em temperaturas moderadas, este processo previne a formação de compostos degradantes e produtos oxidativos, apresentando-se como alternativa aos processos químicos devido à sua maior taxa de conversão (HARMSEN et al., 2010).

As técnicas de explosão consistem no aquecimento e compressão da biomassa, seguido de uma descompressão súbita, em que a hemicelulose será degradada e a lignina será rompida. Pode haver a formação de compostos que inibem o processo *downstream* (GARCÍA-APARICIO et al., 2006).

2.3.3 Inibidores

A decomposição térmica da biomassa (hemicelulose, celulose e lignina) começa aproximadamente a 180° C, porém dependendo do pré-tratamento da biomassa (ácido, alcalino ou solvente) e sua severidade são formados compostos intermediários, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) etc. (HARMSEN et al., 2010; KABEL et al., 2007).

Estes compostos podem ser produtos de degradação com efeitos inibitórios (tóxicos) no processo de fermentação. O nível de toxicidade depende das condições fisiológicas da célula, concentração de oxigênio dissolvido e pH do meio. A degradação das pentoses formam furfural, enquanto as hexoses formam HMF que afetam o crescimento e a respiração celular. A degradação da lignina libera uma enorme variedade de compostos tóxicos à fermentação: aromáticos, poliaromáticos, fenólicos e aldeídos. Os ácidos fenólicos apresentam toxicidade maiores do que o furfural e HMF, mesmo em baixas concentrações. Estes compostos fenólicos causam a perda da integridade das membranas celulares dos organismos de fermentação, reduzindo o crescimento celular e a assimilação dos açúcares (HARMSEN et al., 2010).

Extrativos oriundos da estrutura lignocelulósica incluem as resinas, taninos e terpenos, os quais apresentam toxicidades menores que os anteriores. Metais pesados podem aparecer como compostos inibitórios no processo de fermentação, devido à corrosão de equipamentos. Os principais fatores que influenciam a formação destes inibidores são o pré-tratamento da biomassa, a temperatura do processo e o tempo de residência (HARMSEN et al., 2010).

O pré-tratamento com CO₂ supercrítico é uma alternativa interessante para biomassa. Ao contrário de pré-tratamentos severos, o pré-tratamento supercrítico não produz compostos inibitórios, uma vez que ocorre em baixas temperaturas (SRINIVASAN; JU, 2010), pois a temperatura necessária para a decomposição térmica da celulose, hemicelulose e lignina começa em torno de 180°C.

2.4 Explosão com CO₂ supercrítico

Para melhor entender a explosão supercrítica, será apresentado primeiramente a definição de um fluido supercrítico. Segundo Taylor (1996), o estado supercrítico de um fluido é a região em que o fluido encontra-se acima da pressão crítica e temperatura crítica. Esta região possui apenas uma fase e o fluido adquire algumas propriedades intermediárias entre gases e líquidos.

O fluido supercrítico apresenta uma densidade relativamente alta (próxima dos líquidos) a alta pressão, o que proporciona um bom poder de solvatação. Os baixos valores de viscosidade e altos valores de difusividade (ambos próximos dos gases) combinados com o poder de solvatação e tensão superficial próxima de zero, permite uma melhor penetração do fluido no interior da matriz (AZEVEDO, 2005; TAYLOR, 1996).

Uma variação das técnicas de explosão está na utilização de fluidos supercríticos. O pré-tratamento de explosão com gás carbônico supercrítico é vantajoso sobre vários aspectos: o CO₂ atinge a faixa supercrítica a baixas pressões (73,75 bar) e temperaturas (31,1°C) facilitando a operação dos equipamentos (GAO et al., 2010; KIM; HONG, 2001; TAYLOR, 1996), além da vantagem da hemicelulose não se degradar em temperaturas baixas quando comparadas à temperatura da explosão a vapor (KIM; HONG, 2001) ou para a temperatura do pré-tratamento térmico, eliminando o problema de formação de inibidores e degradação da lignina (SANTOS et al., 2011).

Zheng et al. (1995) compararam, para celulose pura, o efeito de explosões sub e supercríticas do CO₂ com aumento de temperatura. Para explosão subcrítica não houve melhora na conversão em açúcares, ficando bem próxima do controle, enquanto com o aumento da temperatura houve um aumento da conversão na explosão supercrítica.

A não melhora na explosão subcrítica se deve à baixa difusividade do fluido de CO₂ subcrítico, sendo mais difícil a penetração das moléculas de CO₂ nos microporos da celulose. Deste modo, a menor quantidade do fluido presente nos microporos diminuiu consideravelmente o efeito de explosão causado na despressurização do sistema.

O uso do CO₂ supercrítico é interessante também pelos aspectos econômico-financeiros e ambientais, pois é atóxico e não deixa resíduo na matéria-prima após o processo de pré-tratamento, possui alta disponibilidade e substitui o uso de solventes orgânicos evitando custos na recuperação e de descontaminação no produto (AZEVEDO, 2005; BARNABÉ, 2008; GAO et al., 2010; KIM; HONG, 2001). Na sequência, serão expostos os efeitos que a temperatura, pressão, umidade, tempo de retenção e os impactos reportados na literatura no uso do pré-tratamento com CO₂ supercrítico em uma matriz lignocelulósica.

2.4.1 Efeito da temperatura

O aumento da temperatura no pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico apresenta um efeito positivo na taxa de conversão da celulose em glicose. Diversos autores utilizando o mesmo pré-tratamento para diferentes amostras verificaram taxas de conversão em glicose maiores quando comparadas com temperaturas menores.

Gao et al. (2010) verificaram que a temperatura influenciou a conversão da celulose para a palha de arroz, quando submetida ao pré-tratamento com CO₂ supercrítico a uma pressão de 300 bar. Ao final da hidrólise enzimática de 48 horas, Gao et al. (2010) verificaram que o pré-tratamento da palha de arroz à temperatura de 110°C resultou em uma conversão em glicose de 32,4 %, ao passo que nas temperaturas de 40°C e 80°C a conversão em glicose encontrada foi de 29 % e 30,5 %, respectivamente.

O mesmo comportamento foi verificado por Kim e Hong (2001), para o pré-tratamento com CO₂ supercrítico de madeiras conífera e folhosa a uma pressão de 214 bar. Para hidrólise enzimática de 72 horas, para a temperatura de 165°C no pré-tratamento houve conversão em açúcares de aproximadamente 30 % e 75 % do valor teórico para a madeira conífera e a madeira folhosa, respectivamente. Para temperaturas de 112°C e 138°C, as conversões da madeira conífera foram iguais, aproximadamente 12 %, enquanto para a madeira folhosa as conversões em açúcares foram de 12 % e 20 %, respectivamente.

Zheng et al. (1998) alcançaram conversões maiores, à medida que a temperatura no pré-tratamento aumentava para uma mistura de papéis reciclados e bagaço de cana, ao submeter estas ao pré-tratamento com CO₂ supercrítico a uma pressão de 76 bar seguida uma hidrólise enzimática de 25 horas. A taxa de conversão em glicose para a mistura de papéis reciclados foi de aproximadamente 30 % e 33 % nas temperaturas de 35°C e 80°C, respectivamente. Para o bagaço de cana, a taxa de conversão em glicose foi de aproximadamente 36 % e 42 % nas temperaturas de 35°C e 80°C, respectivamente.

No entanto Zheng et al. (1998) não verificaram mudanças significativas para o efeito da temperatura na conversão para a celulose pura. Estes autores verificaram uma taxa de conversão em glicose de aproximadamente 75 % nas temperaturas de 35°C e 80°C e pressão de 207 bar.

2.4.2 Efeito da pressão

Segundo Gao et al. (2010) e Zheng et al. (1998), os efeitos da variação da pressão no pré-tratamento de explosão supercrítica com CO₂ são positivas na medida em que se aumenta a pressão no pré-tratamento da biomassa. Tanto a palha de arroz como a celulose pura apresentaram um aumento na conversão em glicose após terem sido submetidos ao pré-tratamento.

Para a celulose pura, Zheng et al. (1998) verificaram um aumento substancial na conversão em glicose ao elevar a pressão do pré-tratamento para uma temperatura de 35°C. As conversões em glicose foram de 62, 67, 73 e 81 % nas pressões 76, 138, 207 e 276 bar, respectivamente. Para o bagaço de cana, Zheng et al. (1998) constataram mudanças na conversão em glicose após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico em dois intervalos de pressão nas temperaturas de 35°C e 80°C. Na temperatura de 35°C, a conversão em glicose subiu de 37 para 43 % para o intervalo de pressão de 76 a 207 bar, enquanto, para temperatura de 80°C, a conversão em glicose subiu de 41 para 45 % para o mesmo intervalo anterior de pressão.

Um acréscimo da pressão no pré-tratamento aumenta o poder de penetração do CO₂ nos microporos da biomassa, obtendo-se maiores difusividades e poder de solvatação do fluido supercrítico, resultando em taxas de conversão mais elevadas.

Gao et al. (2010) verificaram que para uma hidrólise enzimática de 48 horas houve um acréscimo de aproximadamente 2 % (33,6 para 35,4 %) na conversão em glicose para o pré-tratamento com CO₂ supercrítico a uma temperatura de 110°C. As pressões utilizadas nos experimentos supercríticos foram de 100 e 300 bar.

Kim e Hong (2001) verificaram que o aumento da pressão do CO₂ de 214 para 275 bar não aumentou a digestibilidade enzimáticas das madeiras aspen e SYP para amostras secas. No entanto para amostras com teor de umidade de 73 % em base úmida, verificou-se um efeito negativo para o aumento da pressão do CO₂ de 214 para 275 bar, isto pode ser atribuído à liberação de água de dentro da biomassa lignocelulósica, devido ao aumento da dissolução da água em densidades elevadas do fluido supercrítico no pré-tratamento em pressões elevadas.

Segundo Alinia et al. (2010), há um limite para a contribuição na conversão em açúcares redutores da palha de trigo pelo aumento da pressão no pré-tratamento com CO₂ supercrítico. A conversão em açúcares redutores aumentou de 41 g para 60,9 g e de 70,4 g para 151,5 g por quilograma de palha de trigo úmida nas temperaturas de 180°C e 190°C, respectivamente, para pressão de 80 bar a 120 bar. No entanto para pressões acima de 120 bar não houve mudanças significativas na conversão.

2.4.3 Efeito da umidade

Segundo Alinia et al. (2010), a presença de água nas amostras de palha de trigo, para o pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico (pressão de 120 bar e tempo de retenção de 30 minutos), foi importante para o aumento na conversão em açúcares redutores quando comparada a palha de trigo seca. Para amostras secas e amostras com teor de umidade igual a 19 % em base úmida, verificou-se um aumento na conversão em açúcares redutores de aproximadamente 60g/kg para 190g/kg, 150g/kg para 180g/kg e

140g/kg para 175g/kg, para temperaturas de 180°C, 190°C e 200°C, respectivamente. Foi atribuído este aumento à formação de ácido carbônico pela presença de água na palha de trigo e o dióxido de carbono, conseqüentemente pode ter ocorrido uma pré-hidrólise da hemicelulose e, assim, aumentado à conversão dos açúcares redutores.

Segundo Kim e Hong (2001), o emprego do pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico (165°C, 214 bar e 60 minutos de tempo de retenção) para a madeira conífera aspen e para a madeira folhosa “southern yellow pine” (SYP), se mostrou significativo para a conversão em açúcares quando alterado o teor de umidade das madeiras. A madeira aspen apresentou uma taxa de conversão em açúcares de aproximadamente 15 % para 80 % para um teor de umidade de 0 % e 73 %, respectivamente, enquanto a madeira SYP obteve uma conversão de aproximadamente 10 % para 37 % maior para um teor de umidade 0 % a 57 %. Kim e Hong (2001) atribuíram a conversão menor para umidade de 73 % da madeira SYP, devido à complexidade em hidrolisar a madeira folhosa quando comparada à madeira conífera por causa da presença da lignina guaiacil na SYP. Portanto, o teor de umidade pode influenciar as taxas de conversão em açúcares com seu aumento, porém depende muito de outros fatores como o tipo de lignina presente nas amostras.

2.4.4 Efeito do tempo de retenção

O parâmetro tempo de retenção corresponde ao tempo no qual a biomassa está sujeita às condições supercríticas do fluido no pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico.

Segundo Gao et al. (2010), o efeito das condições supercríticas mostrou-se positivo na conversão em glicose para a palha de arroz quando comparado a amostra sem pré-tratamento. Porém, verificou-se que para diferentes tempos de retenção (15, 30 e 45 minutos) para o pré-tratamento com CO₂ supercrítico, não houve variação significativa das conversões em glicose, com conversões próximas à 32 %.

No entanto Kim e Hong (2001) verificaram que nas madeiras aspen e SYP o maior tempo de retenção não forneceu a maior conversão em açúcares. Os tempos de retenção

estudados foram 10, 30 e 60 minutos para o pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico (165°C, 214 bar e teor de umidade de 73 %), para os quais houve um crescimento nas conversões para 10 minutos e 30 minutos, porém verificou-se uma pequena diminuição na conversão para 60 minutos em relação ao tempo de 30 minutos. A conversão em açúcar aumentou aproximadamente de 45 % para 86 % de 10 a 30 minutos para a madeira aspen e de 22 % para 28 % para a madeira SYP. Constatou-se uma diminuição de 30 para 60 minutos, de 86 % para 81 % e de 28 % para 25 % nas madeiras aspen e SYP, respectivamente.

Deste modo, conclui-se que de modo geral o tempo de retenção é um fator importante para a conversão em glicose, porém depende muito das condições do pré-tratamento e da complexidade estrutural da biomassa lignocelulósica.

2.4.5 Remoção e impacto do CO₂ supercrítico

O uso do pré-tratamento de explosão supercrítica com CO₂ possibilita mudanças nas estruturas morfológicas da biomassa (GAO et al., 2010). As taxas de conversões em açúcares pelo pré-tratamento de explosão supercrítica com CO₂ está intimamente ligado ao grau de complexidade encontrado no material lignocelulósico (KIM; HONG, 2001).

Srinivasan e Ju (2010) verificaram que o pré-tratamento de explosão supercrítica com CO₂ removeu, de modo eficaz, outros componentes presentes no guaiúle aumentando os teores de celulose e hemicelulose. O pré-tratamento foi principalmente um pré-tratamento físico, visto que não houve degradação da hemicelulose enquanto quando aplicado o pré-tratamento químico com ácido diluído verificou-se a remoção da hemicelulose, além da produção de compostos inibidores.

Zheng et al. (1998) utilizaram em sequência dois pré-tratamentos, ácido diluído e explosão de CO₂ supercrítico, para o bagaço de cana-de-açúcar e concluíram que estes removeram a hemicelulose aumentando a porosidade do bagaço e fornecendo maiores taxas de conversão de glicose. Estes autores também realizaram a hidrólise enzimática para o pré-

tratamento supercrítico com outros fluidos como gás nitrogênio e hélio. O gás carbônico foi o mais eficiente na taxa de conversão final em glicose.

O aumento no teor de celulose e hemicelulose, pela remoção de outros componentes presentes na biomassa é intrínseco ao grau de complexidade da estrutura morfológica da biomassa e do pré-tratamento escolhido.

Zheng et al. (1998) analisaram os efeitos anterior e posterior da utilização da explosão supercrítica com CO₂ sobre a estrutura da celulose pura (Avicel), e verificaram que os tempos de relaxamento do ¹³C e ¹H aumentaram, ou seja, esse aumento corresponde ao aumento da mobilidade dos átomos de carbono e hidrogênio, sugerindo que houve quebra das ligações de hidrogênio e ruptura da estrutura tridimensional da celulose no pré-tratamento. De modo que, o pré-tratamento foi responsável pelo decréscimo em 50% da cristalinidade na celulose pura, sugerindo que a interação entre a celulose e a molécula de gás carbônico supercrítico pode afetar a estrutura celulósica do material em estudo por meio da ruptura das estruturas de hemicelulose e lignina.

É possível que a interação com o gás carbônico supercrítico possa hidrolisar a hemicelulose (KIM; HONG, 2001), possivelmente pela interação entre o gás carbônico pressurizado presente nos poros da biomassa, que ao entrar em contato com a água produz ácido carbônico (AGBOR et al., 2011).

No entanto estes comportamentos não podem ser generalizados para todas as biomassas e condições de temperatura. Alinia et al. (2010) verificaram que para a palha de trigo nem sempre o aumento na temperatura e pressão correspondeu às maiores taxas de conversões. A partir de um determinado valor de pressão, a variação não foi significativa na conversão em açúcares redutores, enquanto Kim e Hong (2001) verificaram que houve um decréscimo na taxa de conversão nas madeiras pinho amarelo e aspen.

2.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de carboidratos vegetais surgiu como a tecnologia mais importante para a conversão de biomassa em monômeros de açúcares para posterior

fermentação em bioetanol. A degradação biológica dos carboidratos no interior da biomassa é obtida usando várias enzimas em proporções definidas para converter os carboidratos em açúcares monoméricos (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

Apesar da hidrólise ácida ser mais rápida e apresentar uma alta taxa de recuperação dos açúcares derivados da hemicelulose, o método produz produtos não desejáveis ao processo, sendo necessária uma detoxificação para a retirada destes compostos. Os métodos utilizados são a neutralização, supercalagem com hidróxido de cálcio, resina de troca iônica, carvão ativado e desintoxicação enzimática. Os custos da detoxificação e recuperação dos reagentes oneram o processo, enquanto a hidrólise enzimática tem mostrado resultados melhores na fermentação. Mesmo sendo mais lenta que a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática não gera produtos que afetam a fermentação, processo seguinte à hidrólise (CARDONA et al., 2010).

O processo de hidrólise enzimática envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção (ZHANG et al., 2006). No entanto a reação da hidrólise enzimática pode ser conduzida em condições relativamente moderadas, ou seja, a 50°C e à pressão atmosférica e não há formação de produtos de decomposição do açúcar. Entretanto, essas enzimas são incapazes de catalisar uma rápida e completa hidrólise da celulose nativa em glicose, sendo que as taxas de conversão variam de acordo com o tipo de resíduo, concentração da enzima e tempo da hidrólise (BASSO, 2010).

Enzimas celulase altamente específicas são responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose (BÉGUIN; AUBERT, 1994). O produto da hidrólise enzimática da celulose é a glicose. A hidrólise enzimática é a mais utilizada, pois geralmente é realizada em condições brandas (pH 4,8 e temperatura 45-50°C) e sem problemas de corrosão quando comparadas à hidrólise ácida (DUFF; MURRAY, 1996).

Segundo Olsson e Hahn-Hägerdal (1996), celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de glicose, a qual desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol.

As bactérias e fungos podem produzir celulases para a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Esses microrganismos podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos. Bactérias do gênero *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* podem produzir celulases (BISARIA, 1991).

Fungos que têm sido relatados para a produção de celulases incluem *Sclerotiumrolfsii*, *P. chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Schizophyllum* (DUFF; MURRAY, 1996; STERNBERG, 1976). De todos os gêneros de fungos, *Trichoderma* tem sido o mais estudado para produção de celulase (STERNBERG, 1976).

A conversão da celulose em glicose se faz por meio das enzimas celulase, porém pesquisas vem utilizando enzimas recombinantes para converter as hexoses e as pentoses simultaneamente, uma vez que aumentaria o rendimento teórico e poderia vir a melhorar substancialmente o processo, tanto em rendimento quanto economicamente (MERINO; CHERRY, 2007). As enzimas cooperam de uma maneira sinérgica para degradar o substrato, o que significa que a atividade de enzimas trabalhando juntas é maior do que a soma de suas atividades individuais.

Os processos hidrolíticos não são triviais devido às complexas interações entre celulose e hemicelulose presentes nas paredes celulares dos vegetais e entre estes polissacarídeos e ligninas, assim como a natureza cristalina da celulose e a barreira física formada por ligninas ao redor das fibras celulósicas. Por esta razão, a biomassa deve sofrer um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose (OGEDA; PETRI, 2010).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Neste trabalho foram utilizados duas frações distintas de bagaço de cana-de-açúcar, apresentadas nos subitens 3.1.1 e 3.1.2 como frações fina e P, respectivamente. O bagaço de cana foi cedido pela Usina Açucareira Ester S.A., situada na cidade de Cosmópolis, SP. Sete amostras de bagaço recém-processado, de aproximadamente um quilograma cada uma e teor de umidade de cerca de 50% (base úmida), foram coletadas no dia 20 de junho de 2013.

O bagaço de cana foi então seco no laboratório de Processos Sólido-Fluido da Faculdade de Engenharia Química na Universidade Estadual de Campinas (LPS/FEQ/UNICAMP). A secagem foi realizada em estufa de convecção forçada (marca TECNAL, modelo TE-394/2, Brasil) até atingir a umidade de equilíbrio com o ambiente do laboratório (ca. 8% base seca).

Após a secagem, o material passou pelo equipamento amostrador (marca Fritsch, Alemanha), obtendo amostras de 300 gramas para os experimentos de classificação pneumática (fração fina). A classificação pneumática foi realizada no Equipamento Classificador de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Outros Materiais Polidispersos, no laboratório de Termodinâmica e Energia da Faculdade de Engenharia Agrícola na Universidade Estadual de Campinas (FEAGRI/UNICAMP).

Para a fração P, as amostras foram separadas em um conjunto de peneiras adaptado a um shaker, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos na Universidade Estadual de Campinas (LEB/FEA/UNICAMP). A obtenção das amostras de bagaço em fração P e fina para o estudo com CO₂ supercrítico está elucidada nos subitens 3.1.1 e 3.1.2..

3.1.1 Fração fina

A fração fina do bagaço foi obtida por meio de um classificador pneumático com capacidade de alimentação de 5 a 30 kg/h, utilizando ar como fluido. O fluxo de ar e a vazão do bagaço na alimentação utilizados foram de 110 m³/h e 15 kg/h, respectivamente, conforme definido por Almeida (2012) como condição ótima de separação para este equipamento. Para estas condições, a fração fina apresentou um diâmetro médio de Sauter de 0,326 mm. O princípio do funcionamento do classificador é baseado na elutriação das partículas do bagaço conforme descrito por Almeida (2012). A amostra da fração fina do bagaço é apresentada na Figura 3.1.



Figura 3.1 - Amostra de fração fina. Fonte: (BUTZKE, 2013a).

3.1.2 Fração P

A fração medular do bagaço rica em células de parênquima foi denominada como fração P. Silva et al. (2012a) verificaram que a hidrólise enzimática da fração P promovia uma conversão da celulose em glicose mais eficiente quando comparada ao bagaço

completo (fibra e medula), isto se deu pelo acesso facilitado à enzima devido à menor presença de lignina nas células de parênquima.

Para a separação da fração P do bagaço completo, amostras de aproximadamente 50 gramas de bagaço completo foram colocadas em um sistema peneiras (marca Granutest, Brasil). As peneiras selecionadas foram as peneiras 6, 20, 28 e 80 da série Tyler. A fração P é definida como o material retido na peneira 80 (abertura de 0,175 mm). O conjunto de peneiras foi colocado sobre um shaker (Innova, modelo 4430, EUA) fazendo um movimento circular horizontal durante 20 segundos a 200 rpm. Este método de separação foi desenvolvido por Hofsetz e Silva (2011). A Figura 3.2 apresenta a amostra de fração P.

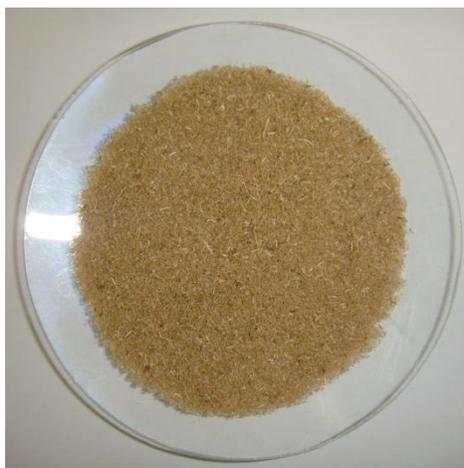


Figura 3.2 - Amostra de fração P. Fonte: (BUTZKE, 2013b).

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização do material

A fim de verificar as mudanças resultantes do pré-tratamento com CO₂ supercrítico, as frações fina e P foram caracterizadas antes e após o pré-tratamento. Verificou-se o teor de umidade (g/g) das frações e a composição estrutural das frações fina e P para determinar a quantidade de celulose, lignina, extrativos e cinzas presentes na

biomassa lignocelulósica. Por fim, foram realizadas análises de área superficial específica a fim de determinar a área disponível nos microporos das frações, analisou-se também se houve diminuição da cristalinidade da celulose e foram feitas imagens em alta resolução no microscópio eletrônico de varredura.

3.2.1.1 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade (g/g) das frações de bagaço foi realizada pelo método gravimétrico, usando-se uma estufa de secagem a vácuo (QUIMIS, modelo Q819V2). A secagem se deu a 70 °C e vácuo de aproximadamente de 90 kN/m² de pressão durante 24 horas. O teor de umidade (U) em base seca é calculado pela equação 3.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$U = \frac{m_{amostra} - m_{amostra\ seca}}{m_{amostra\ seca}} \quad (3.1)$$

Em que:

$m_{amostra}$ = massa da amostra (gramas);

$m_{amostra\ seca}$ = massa da amostra seca (gramas).

3.2.1.2 Composição estrutural

Análises de composição de celulose, lignina, extrativos e cinzas foram realizadas no laboratório de Processos Sólido-Fluido da Faculdade de Engenharia Química na Universidade Estadual de Campinas (LPS/FEQ/UNICAMP). Os métodos utilizados estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Métodos utilizados para análises de composição das frações de bagaço.

| Método | Método | Referência |
|---------------------------------------|---|-------------------------|
| Teor de lignina | NREL/TP-510-42618 Standard Determination of Structural carbohydrates and Lignin in Biomass | (SLUITER et al., 2008a) |
| Teor de celulose | Cellulose determination protocol | (SUN et al., 2004) |
| Extrativos (água e etanol) | NREL/TP-510-42619 Standard Biomass Analytical Methods | (SLUITER et al., 2008b) |
| Teor de cinzas | ASTM/E-1755-01 Standard Test Method for Ash in Biomass | (ASTM, 2008) |
| Teor de hemicelulose | Obtido por diferença | |

3.2.1.3 Análise de área superficial

As amostras de frações de bagaço foram submetidas à determinação da área superficial (BET), para quantificação do tamanho e do volume dos microporos. A medida de área superficial e tamanho dos poros são baseadas na fisiossorção, ou seja, na adsorção física e dessorção de gás (nitrogênio) na superfície e nos poros da amostra sólida. Utilizou-se um analisador de porosidade e área superficial (Micromeritics, modelo ASAP 2010, Austin, EUA), do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LRAC/FEQ/UNICAMP).

3.2.1.4 Difração de raios X

As amostras de frações de bagaço foram analisadas por difração de raios X, a fim de se verificar a ruptura de ligações que possam diminuir a cristalinidade da celulose. Utilizou-se um difratômetro de raios X (marca PHILIPS, modelo X'Pert, Almelo, Holanda), pertencente ao Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp (Campinas – SP), utilizando-se o cátodo Cu-K α como fonte de radiação ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$), com tensão de 40 kV e corrente de 40 mA, sendo a varredura feita com tamanho de passo de $0,02^\circ$, velocidade de $0,016^\circ/\text{segundo}$ e faixa de reflexão de $5^\circ - 70^\circ$ (ângulo de Bragg – 2θ).

3.2.2 Pré-tratamento com CO₂ supercrítico

O equipamento utilizado nos experimentos foi projetado e desenvolvido pela equipe do Laboratório de Engenharia de Produtos e Processos em Biorrecursos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (LEPPBio/FEQ/UNICAMP) em parceria com a empresa AUTIC (Automação e Instrumentação Industrial Ltda) da cidade de Campinas, conforme descrito por Azevedo (2005). O equipamento é extremamente versátil e possui cinco módulos (Figura 3.3): Módulo de Alimentação do solvente e/ou cossolvente; Módulo de Extração; Módulo de Separação (1); Módulo de Separação (2); Módulo de Medição e Coleta.



Figura 3.3 - Equipamento de Extração Supercrítica. Fonte: (BUTZKE, 2013c).

No presente trabalho foram utilizados apenas o módulo de alimentação do solvente e/ou cossolvente e o módulo de separação (1), descritos a seguir.

Módulo de alimentação do solvente e/ou cossolvente (Figura 3.4): O módulo de alimentação é disposto em dois níveis, no nível superior localizam-se as válvulas que alimentam o solvente ao processo, enquanto no nível inferior estão localizados os sistemas de alimentação do solvente e cossolvente (neste trabalho não foi utilizado cossolvente). O sistema de alimentação de solvente é constituído por uma bomba para HPLC marca Gilson (EUA), um módulo manométrico marca Gilson modelo 805 para controle da pressão na descarga das bombas, um transdutor de pressão e *display* digital para indicação de pressão e um sistema de pré-aquecimento de solvente localizado à jusante do misturador estático. Neste módulo encontra-se o quadro geral de força do equipamento.



Figura 3.4 - Módulo de alimentação do solvente e/ou cossolvente. Fonte: (BUTZKE, 2013d).

Módulo de Separação (Figura 3.5): Local em que se realiza a alimentação da amostra das frações de bagaço.

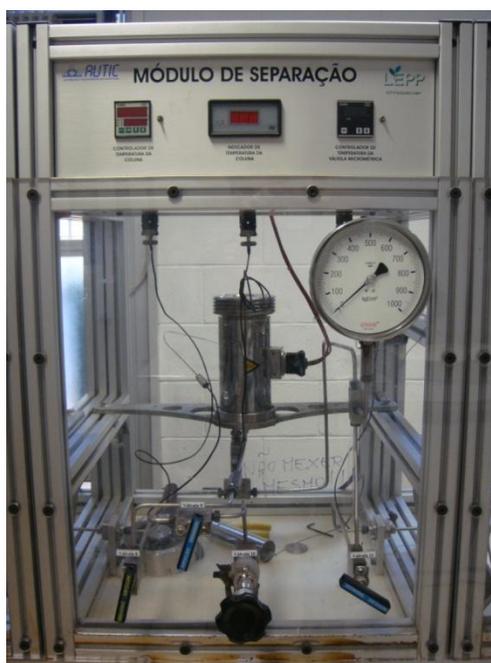


Figura 3.5 - Módulo de separação. Fonte: (BUTZKE, 2013e).

Este módulo possui uma coluna de 300 mL, duas válvulas reguladoras de fluxo, sendo uma para controle de pressão na coluna e outra para retirada de amostra do fundo da coluna, um manômetro para monitoração da pressão dentro da coluna, um controlador de temperatura PID para a camisa de aquecimento da coluna, um controlador P para a camisa de aquecimento da válvula e indicadores de temperatura.

Com todas as válvulas devidamente fechadas, liga-se o banho termostático até atingir a temperatura de -3°C e o CO_2 é bombeado ao sistema aumentando-se gradativamente a vazão de 0 até 7 mL/min, a fim de atingir a pressão desejada mais rapidamente. Em seguida, ligam-se os controladores de temperatura da coluna do módulo de separação e da válvula micrométrica ajustando-as nas temperaturas definidas. Abre-se a válvula que liga a alimentação do CO_2 ao módulo de separação, assim que a pressão alcance o valor desejado para o ensaio, a válvula de entrada do módulo de separação é fechada e a bomba que alimenta o CO_2 é desligada. Deste modo, o CO_2 nas condições de temperatura e pressão selecionadas é retido na coluna de separação por um tempo determinado para o ensaio. Passado este tempo abre-se a válvula de saída do módulo de separação, despressurizando o sistema e expulsando o CO_2 de dentro da coluna. O CO_2 expulso do sistema foi direcionado a um recipiente contendo água, o qual recebeu o conteúdo extraído pelo pré-tratamento, como os extrativos e a hemicelulose solubilizada. Porém, não foi possível analisar o conteúdo desta solução, pois parte do material extraído ficou retido na tubulação como resíduo na saída da tubulação. Depois de finalizado o pré-tratamento com CO_2 supercrítico as amostras foram devidamente retiradas do equipamento, e levadas imediatamente para secagem em estufa novamente, conforme o procedimento explicado no item 3.2.1.1, uma vez que é necessário manter as amostras pré-tratadas secas para análise da composição estrutural.

3.2.2.1 Ensaio experimentais

Visando analisar os parâmetros que influenciam o pré-tratamento supercrítico das frações de bagaço, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , com triplicata no ponto central, no qual foram testadas as variáveis: umidade, pressão, temperatura.

O tempo de retenção foi fixado em 30 minutos, uma vez que nos trabalhos encontrados na literatura observaram-se tempos de retenção entre 10 a 60 minutos (ALINIA et al., 2010; DE VRIJE et al., 2002; KIM, K. H.; HONG, 2001; SRINIVASAN; JU, 2010). A umidade foi avaliada, a fim de verificar a influência que a quantidade de água presente nas amostras poderia influenciar nos resultados do pré-tratamento, tanto física quanto quimicamente (ALINIA et al., 2010; BENAZZI et al., 2013b; GAO et al., 2010; KIM, K. H.; HONG, 2001; SRINIVASAN; JU, 2010). A temperatura e a pressão são variáveis no processo do pré-tratamento com CO₂ supercrítico (ALINIA et al., 2010; BENAZZI et al., 2013a; GAO et al., 2010; KIM, K. H.; HONG, 2001; SANTOS et al., 2011; SRINIVASAN; JU, 2010). A faixa de temperatura selecionada foi de 40°C a 60°C, sabendo que a mínima temperatura supercrítica para o CO₂ é de 31,1°C. A mínima pressão supercrítica é de 73,75 bar, deste modo, foi selecionada o intervalo de 100 a 250 bar. O intervalo utilizado para a temperatura e pressão no equipamento com CO₂ supercrítico foram selecionadas considerando-se as limitações operacionais do equipamento.

A matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Matriz do planejamento experimental.

| Ensaio | Variáveis | | |
|-----------|-------------|------------------|---------------|
| | Umidade (%) | Temperatura (°C) | Pressão (bar) |
| 1 | 0 | 40 | 100 |
| 2 | 100 | 40 | 100 |
| 3 | 0 | 60 | 100 |
| 4 | 100 | 60 | 100 |
| 5 | 0 | 40 | 250 |
| 6 | 100 | 40 | 250 |
| 7 | 0 | 60 | 250 |
| 8 | 100 | 60 | 250 |
| 9 | 50 | 50 | 175 |
| 10 | 50 | 50 | 175 |
| 11 | 50 | 50 | 175 |

Como o volume do cilindro utilizado no pré-tratamento com CO₂ supercrítico era limitado (cabendo aproximadamente 15 gramas das frações de bagaço) e o total de massa necessária nas análises de composição e hidrólise enzimática excediam 15 gramas, desta forma, os ensaios referentes ao planejamento experimental mostrado na Tabela 3.2 foram realizados quatro vezes. Duas vezes para determinar o comportamento do teor de celulose e duas vezes para determinar o comportamento da conversão da celulose em glicose (nas frações fina e P), deste modo, foi possível comparar os resultados com os ensaios controle (sem pré-tratamento). Foram adicionados no cilindro esferas de vidro, para que não houvesse formação de caminho preferencial do CO₂ supercrítico.

Para aumentar o teor de umidade das frações secas (estufa de secagem a vácuo a 70 °C durante 24 horas) foram colocadas 15 gramas de cada amostra em saco plástico, então, adicionou-se água lentamente com auxílio de um borrifador, em seguida, o saco foi fechado hermeticamente.

Para o teor de umidade de 50% em base seca adicionou-se 7,5 mL de água para 15 gramas de frações fina e P, enquanto para um teor de umidade igual a 100 % em base seca adicionou-se 15 mL de água. Deste modo, as amostras devidamente lacradas em sacos plásticos fechados hermeticamente foram levadas ao refrigerador por 24 horas, sendo que, a cada hora as amostras nos sacos plásticos eram movimentadas suavemente para que a água penetrasse por igual nos poros das frações de bagaço.

As análises dos teores de celulose e da hidrólise enzimática foram realizadas em triplicata nas frações fina e P.

3.2.3 Hidrólise enzimática

As frações P e fina previamente pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/Unicamp). As enzimas utilizadas na hidrólise enzimática foram a celulase NS 50013 - Novozymes, Dinamarca (15 FPU/ g de matéria seca) e β -glucosidase NS 50010 - Novozymes, Dinamarca (50 UI/g de matéria seca). As condições

da hidrólise (pH igual a 5 e temperatura de 47°C) foram determinadas anteriormente pelo LEB. O tempo total da hidrólise enzimática foi estabelecido em 72 horas, o teor de sólidos (fração fina e P) utilizado foi igual a 3 % ou razão sólido seco/líquido de 30 g/L.

Neste procedimento foram utilizados reatores encamisados de 500 mL, agitadores magnéticos e banho termostático (para controle de temperatura). A hidrólise enzimática foi realizada segundo as seguintes etapas:

- I. Determinou-se a quantidade de enzimas, de água e das frações a serem utilizadas;
- II. Adicionou-se a água e colocaram-se os magnetos no reator encamisado;
- III. Adicionaram-se as frações fina e P;
- IV. Adicionaram-se as enzimas (início da hidrólise enzimática);
- V. Foram retirados alíquotas de 3 mL de amostra (3, 6, 12, 24, 48 e 72h) e inativou-se as enzimas em banho termostatizado a 100°C por 5min, em seguida resfriou-se em banho de gelo;
- VI. Centrifugou-se as amostras em 3000 rpm por 15 minutos. Recolheu-se o sobrenadante e o filtrou para retirar pequenas partículas que ainda ficaram em suspensão (utilizou-se papel filtro de 0,45 µm);
- VII. Analisaram-se os açúcares redutores totais pelo método DNS adaptado de Miller (1959) e glicose pelo método do kit enzimático, em seguida foi calculada a conversão em glicose.

Os reatores foram mantidos fechados durante o processo para evitar evaporação. Adicionou-se Azida de sódio (15 mM/L) para evitar crescimento microbiano.

A conversão da celulose em glicose foi calculada de acordo com a equação 3.2.

$$\text{Conversão em glicose (\%)} = \frac{[\text{Glicose}]}{\text{Celulose} \times R} \times 100 \quad (3.2)$$

Em que:

[*Glicose*] = concentração de glicose (g de glicose/L de solução);

Celulose = teor de celulose inicial (g/g);

R = razão sólido/líquido de fração (fina e P) utilizada (g/L).

3.2.3.1 Inibidor

A quantificação do composto inibidor hidroximetilfurfural (HMF) no hidrolisado das frações fina e P foi determinada em cromatógrafo Dionex no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/Unicamp).

As amostras para análise foram retiradas ao final das 72 horas de hidrólise enzimática e diluídas em 125 vezes e filtradas através de um filtro de 0,45 μm . As amostras foram identificadas e quantificadas por um cromatógrafo iônico (HPLC-PAD), utilizando um sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EUA).

3.2.4 Tratamento estatístico dos dados

Com auxílio do pacote computacional Statistica (versão 8.0, da StatSoft, Inc.) foi realizado a análise dos dados experimentais, para avaliar a influência das variáveis e de suas interações sobre as respostas de composição estrutural (extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas) e conversão da celulose em glicose, considerando um nível de significância (α) de 5%.

A fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados para o planejamento experimental utilizou-se como medida de dispersão o desvio padrão. Realizou-se também o teste F para determinar um modelo matemático que descreva o comportamento para o teor de celulose e conversão em glicose nas frações fina e P. A fim de determinar se o modelo é estatisticamente significativo e possa ser utilizado para fins preditivos, o valor F calculado deve ser obrigatoriamente maior que o valor de F tabelado. Enquanto o F calculado para

falta de ajuste deve ser obrigatoriamente menor que o valor de F tabelado para a falta de ajuste.

Os valores de F tabelado e F tabelado para falta de ajuste foram determinados com auxílio da tabela Distribuição F em Calado e Montgomery (2003) (ANEXO A). O valor F tabelado é função do grau de liberdade da regressão, do grau de liberdade dos resíduos e do valor de α . Enquanto o valor de F tabelado para falta de ajuste é função do grau de liberdade da falta de ajuste, do grau de liberdade do erro puro e do valor de α .

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo tem como objetivo apresentar os resultados obtidos nos ensaios de pré-tratamento com CO₂ supercrítico, nas frações fina e P do bagaço de cana-de-açúcar. Também são avaliadas a composição estrutural das frações, bem como alterações estruturais por meio de análises de cristalinidade; diferenças nas áreas superficiais específicas.

4.1 Condições do pré-tratamento

O pré-tratamento foi realizado nas frações fina e P em diferentes teores de umidade, temperatura e pressão. A determinação da umidade em base seca foi realizada conforme o item 3.2.2 deste trabalho. Para avaliação dos parâmetros de umidade, temperatura e pressão sobre composição estrutural e a hidrólise enzimática, utilizou-se um planejamento experimental 2³ completo, com triplicata no ponto central, portanto os parâmetros foram avaliados em três níveis (-1, 0, +1) conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Especificação dos níveis avaliados nas frações fina e P do bagaço.

| Variáveis | Níveis | | |
|--------------------------|--------|-----|------|
| | (-1) | 0 | (+1) |
| Umidade em base seca (%) | 0 | 50 | 100 |
| Temperatura (°C) | 40 | 50 | 60 |
| Pressão (bar) | 100 | 175 | 250 |

Em seguida, apresenta-se a Tabela 4.2, na qual estão especificados os 11 ensaios realizados nas duas frações fina e P.

Tabela 4.2 - Matriz do planejamento experimental 2³ completo com triplicata no ponto central.

| Ensaio | Variáveis | | |
|-----------|-------------|------------------|---------------|
| | Umidade (%) | Temperatura (°C) | Pressão (bar) |
| 1 | -1 (0) | -1 (40) | -1 (100) |
| 2 | +1 (100) | -1 (40) | -1 (100) |
| 3 | -1 (0) | +1 (60) | -1 (100) |
| 4 | +1 (100) | +1 (60) | -1 (100) |
| 5 | -1 (0) | -1 (40) | +1 (250) |
| 6 | +1 (100) | -1 (40) | +1 (250) |
| 7 | -1 (0) | +1 (60) | +1 (250) |
| 8 | +1 (100) | +1 (60) | +1 (250) |
| 9 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) |
| 10 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) |
| 11 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) |

4.2 Caracterização estrutural das frações fina e P

Com o intuito de verificar a diferença entre as composições estruturais resultantes do pré-tratamento com CO₂ supercrítico, realizou-se a análise da composição estrutural das frações de bagaço fina e P, conforme o item 3.2.3. A Tabela 4.3 apresenta os resultados percentuais dos principais componentes da composição da biomassa estudada: cinzas, extrativos totais, celulose, lignina insolúvel, lignina solúvel. O teor de hemicelulose neste trabalho foi obtido por diferença. Todas as análises da composição da fração fina e fração P foram realizadas em triplicata.

Tabela 4.3 - Composição estrutural das frações de bagaço.

| % | Fração fina inicial | Fração fina livre de cinzas (%) | Fração P inicial | Fração fina livre de cinzas (%) |
|--------------------------|----------------------------|--|-------------------------|--|
| Cinzas | 4,54 | - | 14,18 | - |
| Extrativos totais | 10,77 | 11,28 | 10,05 | 11,71 |
| Celulose | 47,38 | 49,63 | 42,33 | 49,32 |
| Lignina insolúvel | 11,75 | 12,31 | 10,73 | 12,50 |
| Lignina solúvel | 2,70 | 2,83 | 2,51 | 2,92 |
| Hemicelulose | 22,86 | 23,95 | 20,20 | 23,54 |

Os resultados da composição estrutural sempre apresentará um total de 100 %, pois o teor de hemicelulose foi obtido por diferença. As principais diferenças de composição entre as frações fina e P podem ser observadas no teor de cinzas e celulose. O valor maior de aproximadamente 212 % no teor de cinzas na amostra da fração P pode ser explicado devido ao processo de separação da fração P, que favorece a concentração de matéria inorgânica recolhida na colheita da cana, devido ao movimento para sua separação. A fração fina por ser obtida por meio de um classificador pneumático consegue minimizar a presença destas partículas. O teor de celulose diminuiu aproximadamente 11 % para a fração P, porém esta e as diminuições referentes à lignina e hemicelulose podem ser explicadas pelo aumento do teor de cinzas.

Comparando-se as composições livres do teor de cinzas das frações fina e P, verificou-se que apesar da estrutura morfológica das frações fina e P serem diferentes, a composição estrutural de ambas as amostras são iguais.

A fim de se comparar a composição estrutural da fração fina e da fração P, verificou-se que a composição foi próxima da encontrada por Almeida (2012) e Silva et al. (2012b) conforme a Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Análise química do bagaço integral, fração fina e P do bagaço de cana.

| Análise | Fração fina (%)¹ | Livre de cinzas (%) | Bagaço integral (%)¹ | Livre de cinzas (%) | Fração P (%)² | Livre de cinzas (%) |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Cinzas | 6,51 | - | 6,09 | - | 14,90 | - |
| Extrativos | 12,31 | 13,17 | 11,66 | 12,41 | 9,46 | 11,12 |
| Celulose | 42,27 | 45,21 | 45,43 | 48,38 | 46,10 | 54,17 |
| Hemicelulose | 24,20 | 25,89 | 21,66 | 23,06 | 14,04 | 16,50 |
| Lignina | 14,71 | 15,73 | 15,16 | 16,14 | 15,50 | 18,21 |

¹Almeida (2012); ²Silva et al. (2012b).

Analisando os resultados de Almeida (2012) e sabendo que o procedimento usado para a determinação da composição foi o mesmo utilizado neste trabalho, verifica-se que os valores encontram-se próximos. Silva et al. (2012b) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho para a fração P; assim como a fração fina, a composição estrutural da fração P foi determinada pelo mesmo procedimento. As pequenas variações na composição da fração fina e P podem ser explicadas pelo fato do bagaço utilizado ter sido coletado em safras diferentes. As amostras da fração fina e do bagaço integral livres de cinzas apresentaram resultados muito próximos, confirmando que as diferenças na fração fina e o bagaço integral são principalmente em relação à estrutura morfológica. A fração P apresentou um teor de celulose e hemicelulose maior e menor, pois são amostras coletadas em safras diferentes.

Estabelecida a matriz do planejamento, os resultados foram avaliados com o software de análise de dados STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc. 2007) para selecionar quais são as variáveis que mais influenciam a composição estrutural das frações fina e P após o pré-tratamento. As variáveis respostas do planejamento experimental para a composição estrutural das frações fina e P foram o teor de extrativos totais, celulose, lignina insolúvel, lignina solúvel e hemicelulose (medida indireta).

Na hidrólise enzimática realizada neste trabalho, foi utilizada uma combinação das enzimas celulase e β -glicosidase, as quais atacam a celulose das frações fina e P. Deste

modo, realizou-se um tratamento estatístico utilizando como única variável dependente o teor de celulose nas amostras das frações.

4.2.1 Composição estrutural da fração fina após pré-tratamento

A seguir, na Tabela 4.5, é apresentado as respostas do planejamento experimental para os 11 ensaios realizados conforme mostrado na Tabela 4.2 para a composição estrutural da fração fina. Na Tabela 4.5 estão os teores de cinzas, extrativos totais, celulose, lignina insolúvel, lignina solúvel e hemicelulose determinados após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Tabela 4.5 - Resultados da composição estrutural da fração fina após o pré-tratamento supercrítico.

| Ensaio | Cinzas (%) | Extrativos (%) | Celulose (%) | Lignina Insolúvel (%) | Lignina Solúvel (%) | Hemicelulose (%) |
|---------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4,60 | 10,35 | 61,43 | 12,11 | 3,39 | 8,12 |
| 2 | 4,56 | 10,44 | 51,94 | 13,34 | 3,12 | 16,60 |
| 3 | 3,87 | 10,86 | 56,43 | 12,54 | 3,13 | 13,17 |
| 4 | 5,17 | 10,44 | 55,29 | 13,05 | 3,09 | 12,96 |
| 5 | 5,20 | 10,62 | 58,43 | 12,53 | 3,26 | 9,96 |
| 6 | 4,52 | 11,09 | 43,51 | 11,79 | 2,42 | 26,67 |
| 7 | 4,64 | 10,77 | 62,93 | 12,91 | 3,51 | 5,24 |
| 8 | 4,33 | 10,94 | 47,02 | 12,39 | 2,74 | 22,58 |
| 9 | 4,14 | 10,73 | 51,88 | 12,44 | 2,91 | 17,90 |
| 10 | 4,27 | 10,71 | 57,64 | 12,43 | 2,97 | 11,98 |
| 11 | 4,11 | 10,56 | 50,12 | 12,65 | 2,78 | 19,78 |

O ensaio sem pré-tratamento com CO₂ supercrítico mostrado na Tabela 4.3 apresentou um teor de hemicelulose de 22,86 %. Verifica-se a partir da Tabela 4.5 que o principal efeito do pré-tratamento com CO₂ supercrítico na composição estrutural da fração fina foi a solubilização e remoção da hemicelulose. Com a remoção da hemicelulose da composição estrutural da fração fina, é possível afirmar que o pré-tratamento foi eficaz em alterar o complexo formado pela celulose, hemicelulose e lignina, o que facilita o acesso das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. A diminuição da hemicelulose foi considerável, de aproximadamente de 65 %, 56 % e 77 % para os ensaios 1, 5 e 7, respectivamente.

Os ensaios 6 e 8 apresentaram teores de hemicelulose iguais a 26,67 % e 22,58 %, respectivamente, resultado maior e igual a amostra sem pré-tratamento (22,86 %). Provavelmente, pode ter ocorrido algum erro na execução das análises desses ensaios, visto que não houve para nenhum outro ensaio uma diminuição do teor de celulose, que indicasse que o pré-tratamento supercrítico possa solubilizar ou remover celulose.

Os valores de cinzas e extrativos totais não apresentaram uma variação significativa quando comparados ao ensaio sem pré-tratamento, deste modo, o pré-tratamento supercrítico não conseguiu solubilizar e remover os extrativos. O aumento nos teores de lignina insolúvel e solúvel é decorrente da diminuição dos teores de hemicelulose nos ensaios, ou seja, o pré-tratamento com CO₂ supercrítico não remove a lignina. É possível que a depressurização possa afetar a lignina na fração fina rompendo sua estrutura, assim aumentando a área superficial.

Observa-se na Tabela 4.5 que o maior teor de celulose da fração fina se deu no ensaio 7, que corresponde a uma umidade de 0 %, temperatura de 60°C e pressão de 250 bar, alcançando um teor de celulose de 62,93 %. O ensaio 1 apresentou um resultado muito próximo do ensaio 7 com um teor de celulose de 61,43 %.

Os ensaios 9, 10 e 11 são as replicatas no ponto central, os quais apresentaram um desvio padrão para o teor de celulose na fração fina de 0,032. O ensaio 10 apresentou um valor diferente do esperado no ponto central, provavelmente resultado de alguma irregularidade na execução do pré-tratamento ou na análise da composição.

De um modo geral, o uso do pré-tratamento com CO₂ supercrítico foi positivo, com exceção dos ensaios 6 e 8 que apresentaram um teor de celulose menor que o ensaio sem pré-tratamento.

A seguir, na Tabela 4.6, é apresentada a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento da fração fina tendo como resposta o teor de celulose, juntamente com os valores obtidos para os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, erro padrão e p-valor, coeficiente de determinação do modelo R² e nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05).

Tabela 4.6 - Efeitos e coeficientes estimados do teor de celulose para fração fina.

| Variável | Efeito | Coeficiente ¹ | Desvio padrão ² | p-valor |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Média/Intercepto³ | <i>0,546225</i> | <i>0,546225</i> | <i>0,013906</i> | <i>0,000648</i> |
| Curvatura | -0,028183 | -0,014092 | 0,026629 | 0,649537 |
| Umidade (A) | -0,103650 | -0,051825 | 0,013906 | 0,065055 |
| Temperatura (B) | 0,015900 | 0,007950 | 0,013906 | 0,625223 |
| Pressão (C) | -0,033000 | -0,016500 | 0,013906 | 0,357263 |
| (A) x (B) | 0,018400 | 0,009200 | 0,013906 | 0,576272 |
| (A) x (C) | -0,050500 | -0,025250 | 0,013906 | 0,211067 |
| (B) x (C) | 0,024150 | 0,012075 | 0,013906 | 0,476767 |
| (A) x (B) x (C) | -0,023350 | -0,011675 | 0,013906 | 0,489526 |

¹ Coeficiente do modelo; ² Erro padrão (resíduo) do coeficiente: corresponde à metade do erro padrão do efeito – com exceção do intercepto; ³ Média dos resultados.

A Tabela 4.6 exhibe que nenhuma variável é significativa para o intervalo de confiança estabelecido. A ausência de significância das variáveis pode ser observada por meio do Gráfico de Pareto indicado na Figura 4.1, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

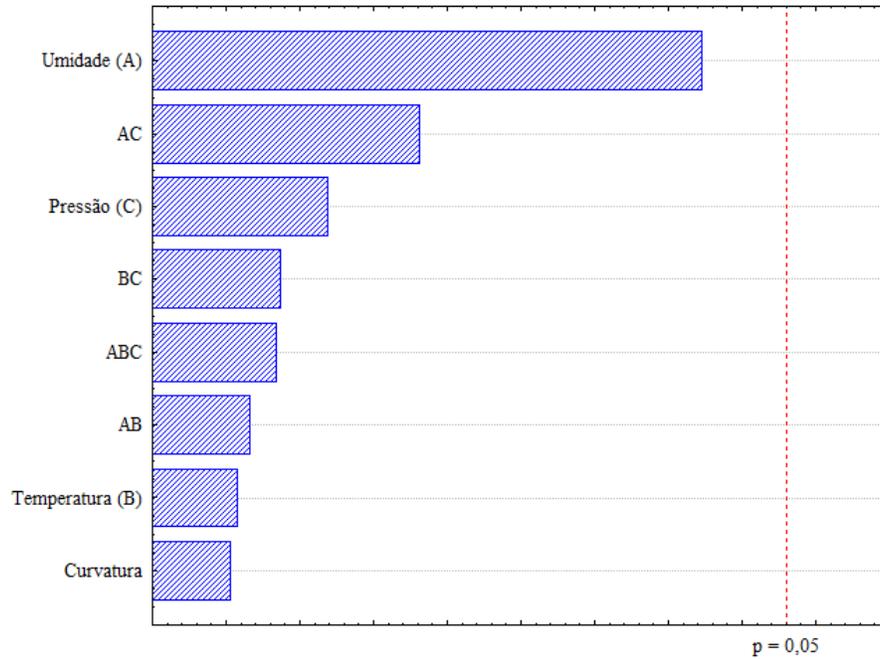


Figura 4.1 - Variável significativa do teor de celulose para fração fina.

A Figura 4.1 mostra que nenhuma variável é significativa para os ensaios de fração fina, pois graficamente nenhuma das variáveis encontra-se à direita da linha tracejada para o intervalo de confiança de 95 %.

O efeito de interação entre as variáveis mostra a importância entre as interações mesmo quando não significativas e pode ser visto pela falta de paralelismo das linhas. A Figura 4.2 apresenta este efeito.

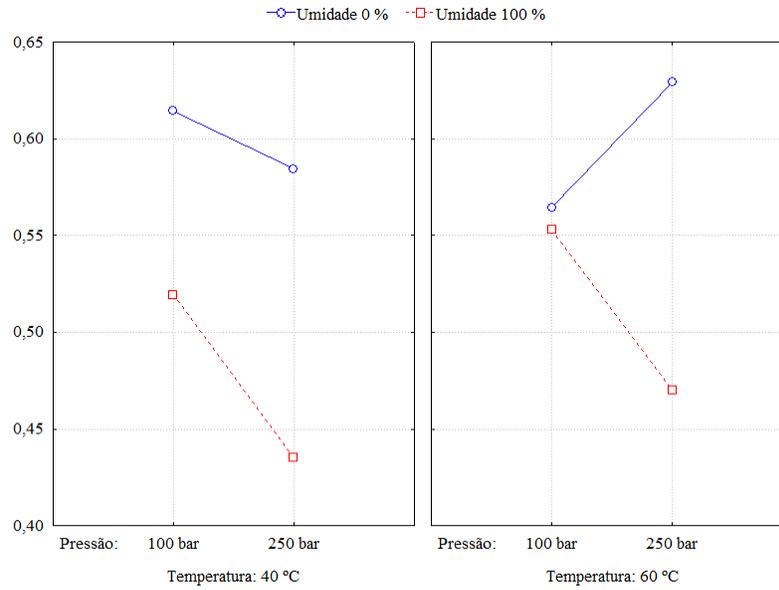


Figura 4.2 - Gráfico das médias marginais para o teor de celulose da fração fina.

Verifica-se que não existe realmente influência da umidade no intervalo de pressão de 100 a 250 bar para temperatura de 40°C no teor de celulose, pois as linhas são praticamente paralelas e não se cruzam mesmo que os parâmetros de pressão fossem estendidos. Para a temperatura de 60°C as linhas também não chegam a se cruzar mostrando que também não há influência da umidade para este intervalo, porém se fosse trabalhado com uma faixa menor de pressão provavelmente notar-se-ia uma influência da umidade.

A fim de verificar a normalidade dos erros é apresentado o gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme a Figura 4.3, pois devido ao pequeno número de ensaios um histograma da frequência dos resíduos não é indicado.

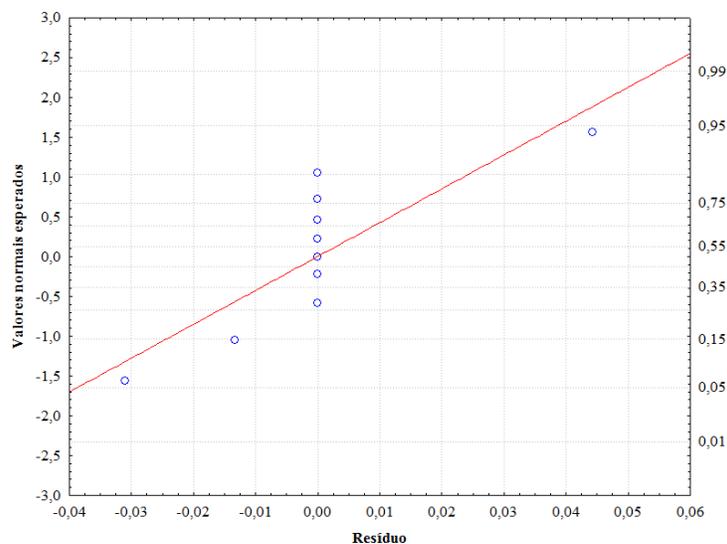


Figura 4.3 - Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de celulose da fração fina.

O gráfico da probabilidade normal permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, pois os dados se encontram relativamente próximos à linha reta vermelha. Em seguida, apresenta-se a Figura 4.4 (Valores previstos *versus* valores observados) para determinar se os dados previstos por um modelo linear com os coeficientes calculados na Tabela 4.6 são próximos dos valores observados experimentalmente.

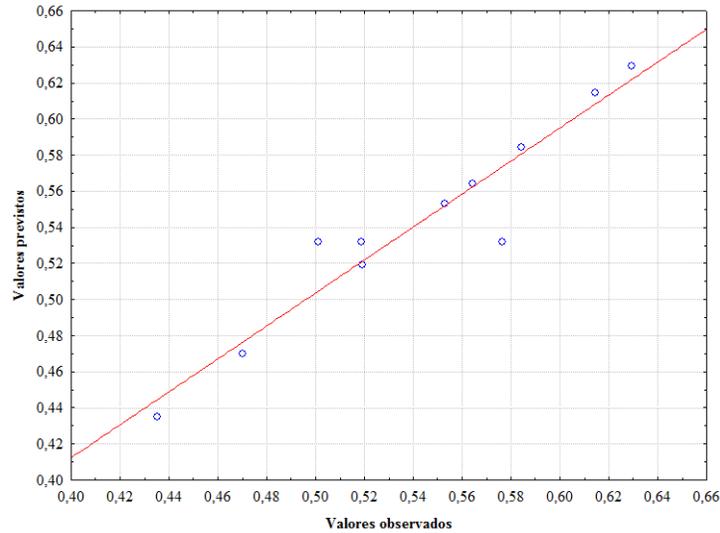


Figura 4.4 - Valores previstos versus valores observados do teor de celulose da fração fina.

A Figura 4.4 apresenta que os valores previstos se encontram próximos dos dados experimentais, isto é caracterizado pelos pontos que ficam próximos à linha reta vermelha. Apesar da curvatura apresentada na Tabela 4.6 não ser significativa, não há variáveis significativas para o intervalo de confiança escolhido, deste modo, não é possível determinar um modelo matemático que descreva o comportamento do teor de celulose da fração fina. O modelo proposto explicaria 91,34 % da variância, conforme valor de R^2 calculado na tabela dos efeitos da fração fina.

Realizou-se em seguida o teste F para os dados. Verificaram-se os resultados da análise de variância dos resultados (ANOVA) conforme apresentada na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Análise da variância do teor de celulose da fração fina.

| Fonte de variação | SQ ¹ | GL ² | MQ ³ | Teste F (calculado) | Teste F (tabelado) |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,024170 | 3 | 0,008057 | 4,8778 | 4,3468 |
| Falta de ajuste | 0,008468 | 5 | 0,001694 | 1,0947 | 19,296 |
| Resíduos | 0,011562 | 7 | 0,001652 | | |
| Erro puro | 0,003094 | 2 | 0,001547 | | |
| SQ total | 0,035732 | 10 | | | |

¹Soma quadrática; ²Grau de liberdade e ³Média quadrática.

Analisando a Tabela 4.7, verificou-se que as duas condições para o teste F foram satisfeitas, o que significa que a regressão linear é de boa confiabilidade e sem evidência de falta de ajuste, deste modo confirmou-se que um modelo linear seria capaz de descrever um modelo de maneira satisfatória caso alguma das variáveis fosse significativa.

Portanto, serão alcançados maiores teores de celulose para menores valores de umidade da amostra. A seguir é apresentada a superfície de resposta (Figura 4.5) para um teor de umidade igual à zero em função da temperatura e pressão. Selecionou-se o teor de umidade igual à zero, pois foi para esta condição de umidade que foram encontradas os maiores valores para o teor de celulose (ensaios 1, 5 e 7).

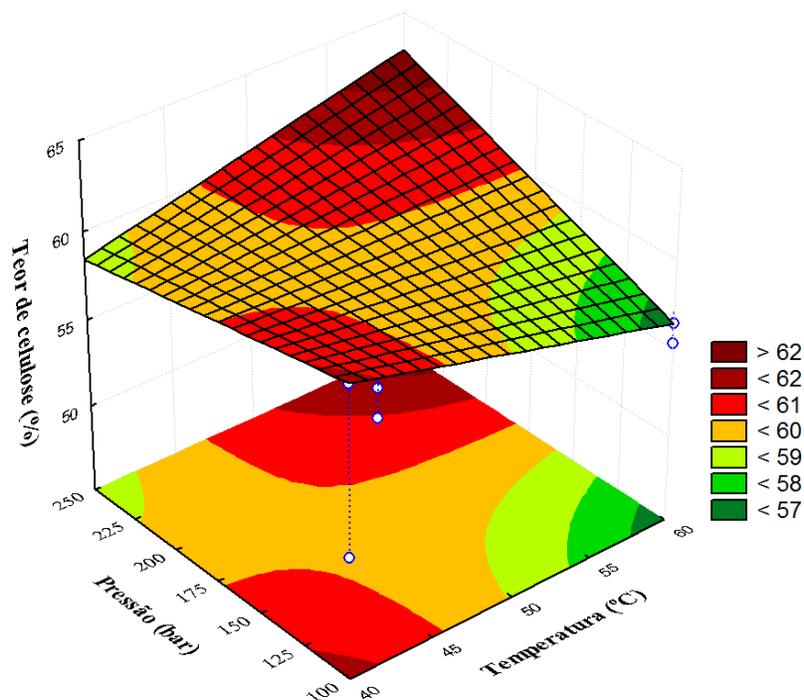


Figura 4.5 - Superfície de resposta do teor de celulose para fração fina.

Os resultados indicam que quanto maior for a pressão e a temperatura aplicada no pré-tratamento para um valor mínimo de umidade (0 %) maior será o teor de celulose na fração fina pré-tratada, confirmando o maior resultado de conversão obtido no ensaio 7.

4.2.2 Composição estrutural da fração P após pré-tratamento

A seguir, na Tabela 4.8, é apresentado as respostas do planejamento experimental para os 11 ensaios realizados conforme mostrado na Tabela 4.2 para a composição estrutural da fração P. Na Tabela 4.8 estão os teores de cinzas, extrativos totais, celulose, lignina insolúvel, lignina solúvel e hemicelulose determinados após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Tabela 4.8 - Resultados da composição estrutural da fração P após o pré-tratamento supercrítico.

| Ensaio | Cinzas (%) | Extrativos (%) | Celulose (%) | Lignina Insolúvel (%) | Lignina Solúvel (%) | Hemicelulose (%) |
|---------------|-------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 1 | 14,04 | 9,66 | 57,89 | 11,90 | 3,43 | 3,08 |
| 2 | 14,58 | 9,98 | 43,98 | 11,51 | 2,60 | 17,35 |
| 3 | 14,17 | 10,64 | 55,67 | 12,20 | 3,23 | 4,09 |
| 4 | 13,48 | 10,36 | 47,64 | 12,02 | 2,77 | 13,73 |
| 5 | 14,79 | 10,67 | 55,12 | 11,20 | 3,30 | 4,92 |
| 6 | 13,77 | 10,42 | 49,56 | 11,31 | 2,97 | 11,97 |
| 7 | 14,16 | 10,58 | 45,26 | 11,20 | 2,63 | 16,17 |
| 8 | 13,89 | 10,46 | 58,57 | 11,19 | 3,41 | 2,48 |
| 9 | 14,88 | 10,42 | 42,72 | 11,10 | 2,51 | 18,37 |
| 10 | 14,71 | 10,69 | 41,89 | 11,16 | 2,43 | 19,12 |
| 11 | 14,83 | 10,67 | 42,43 | 11,21 | 2,48 | 18,38 |

No ensaio sem pré-tratamento com CO₂ supercrítico da fração P mostrado na Tabela 4.3 obteve-se um teor de hemicelulose de 20,20 %. Assim como para a fração fina, verifica-se na Tabela 4.8 que o principal efeito do pré-tratamento com CO₂ supercrítico na composição estrutural da fração P foi a solubilização e remoção da hemicelulose. Consequentemente o pré-tratamento foi eficaz em alterar o complexo formado pela celulose, hemicelulose e lignina, facilitando o acesso das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. A diminuição no teor de hemicelulose foi considerável, houve uma diminuição de aproximadamente 85 %, 80 %, 76 % e 88 % para os ensaios 1, 3, 5 e 8, respectivamente.

Os ensaios 1, 3 e 5 apresentam em comum o teor de umidade igual a 0 %, com pequenas variações nas respostas para o intervalo de temperatura e pressão estudadas.

Não houve variação significativa para nenhum dos componentes da composição estrutural da fração P nos ensaios do ponto central, para tais condições de pré-tratamento

(Umidade = 50 %, Temperatura = 50°C e Pressão = 175 bar). Os ensaios 9, 10 e 11 são as replicatas no ponto central, os quais apresentaram um desvio padrão para o teor de celulose na fração P de 0,003. Este resultado para o desvio padrão mostra que há uma dispersão baixa dos resultados para os teores de celulose, de modo que, confirma uma boa reprodutibilidade dos resultados.

Os valores de cinzas e extrativos totais novamente não apresentaram uma variação significativa quando comparados ao ensaio sem pré-tratamento, deste modo, o pré-tratamento supercrítico não conseguiu solubilizar e remover os extrativos. Devido à diminuição dos teores de hemicelulose na fração P, verificou-se um aumento nos teores de lignina insolúvel e solúvel. O pré-tratamento com CO₂ supercrítico não conseguiu remover a lignina da fração P, porém o efeito da despressurização no pré-tratamento pode afetar a lignina na fração P rompendo sua estrutura e assim aumentando a área superficial.

Verifica-se na Tabela 4.8, que para fração P o maior teor de celulose apresentado foi no ensaio 8, o qual corresponde a uma umidade de 100 %, temperatura de 60°C e pressão de 250 bar, alcançando um teor de celulose de 58,57 %. O ensaios 1, 3 e 5 apresentaram resultados próximos ao ensaio 7, com teores de celulose iguais a 57,89 %, 55,67 % e 55,12 %, respectivamente. Com exceção dos ensaios realizados em triplicata observou-se um aumento considerável nos teores de celulose, com um aumento próximo de 38 % para o ensaio 8 em relação à amostra sem pré-tratamento. O aumento no teor de celulose nas amostras de fração P ocorreu devido à remoção da hemicelulose pelo pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

A estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento da fração P tendo como resposta o teor de celulose é apresentada na Tabela 4.9, juntamente com os valores obtidos para os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, erro padrão e p-valor, coeficiente de determinação do modelo R² e nível de significância ($\alpha = 0,05$). Os valores destacados em **negrito e itálico** indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05).

Tabela 4.9 - Efeitos e coeficientes estimados do teor de celulose para fração P.

| Variável | Efeito | Coeficiente ¹ | Desvio padrão ² | p-valor |
|-------------------------------|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|
| Média/Intercepto ³ | <i>0,517112</i> | <i>0,517112</i> | <i>0,001489</i> | <i>0,000008</i> |
| Curvatura | <i>-0,187292</i> | <i>-0,093646</i> | <i>0,002852</i> | <i>0,000926</i> |
| Umidade (A) | <i>-0,035475</i> | <i>-0,017738</i> | <i>0,001489</i> | <i>0,006976</i> |
| Temperatura (B) | 0,001475 | 0,000737 | 0,001489 | 0,669510 |
| Pressão (C) | 0,008325 | 0,004162 | 0,001489 | 0,107717 |
| (A) x (B) | <i>0,061875</i> | <i>0,030937</i> | <i>0,001489</i> | <i>0,002309</i> |
| (A) x (C) | <i>0,074225</i> | <i>0,037112</i> | <i>0,001489</i> | <i>0,001606</i> |
| (B) x (C) | -0,005725 | -0,002863 | 0,001489 | 0,194532 |
| (A) x (B) x (C) | <i>0,032475</i> | <i>0,016238</i> | <i>0,001489</i> | <i>0,008307</i> |

¹ Coeficiente do modelo; ² Erro padrão (resíduo) do coeficiente: corresponde à metade do erro padrão do efeito – com exceção do intercepto; ³ Média dos resultados.

Da fração P, observa-se que a variável umidade (A) é significativa, assim como todas as interações entre as outras variáveis com a umidade para o intervalo de confiança estabelecido de 95 %. A significância destas variáveis pode ser observada por meio do Gráfico de Pareto indicado na Figura 4.6, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

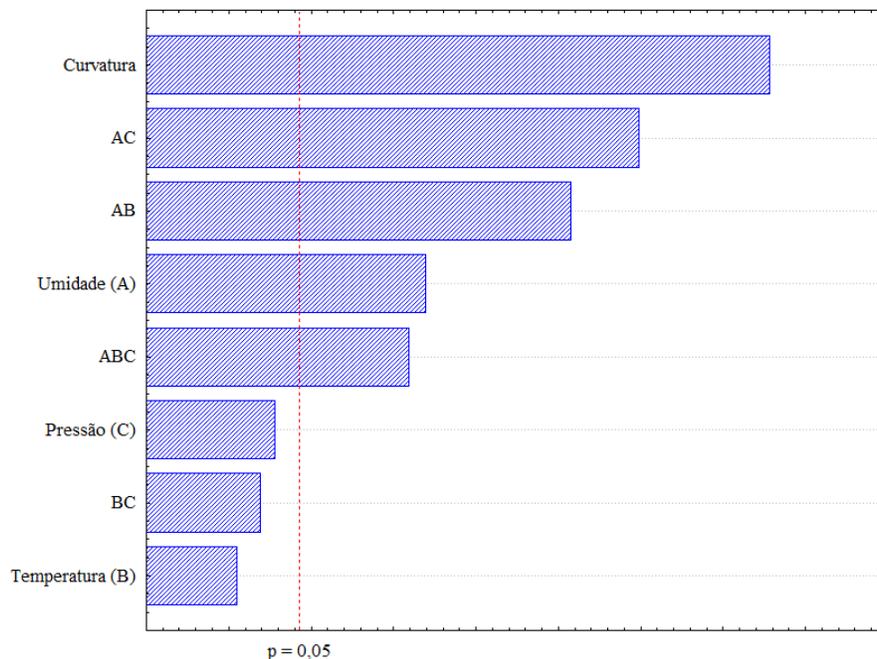


Figura 4.6 - Variáveis significativas do teor de celulose para fração P.

A partir da Figura 4.6 é possível constatar que as variáveis significativas contribuem para uma maior resposta no teor de celulose são: curvatura, interação entre a umidade e pressão (AC), interação entre a umidade e temperatura (AB), umidade (A) e a interação tripla entre estas (ABC), pois estas se encontram graficamente à direita da linha tracejada que é a variável dentro do intervalo de confiança de 95%.

Novamente é verificado o efeito de interação entre as variáveis, pois mesmo quando não significativas podem apresentar importância sobre o comportamento do teor de celulose. A Figura 4.7 apresenta este efeito.

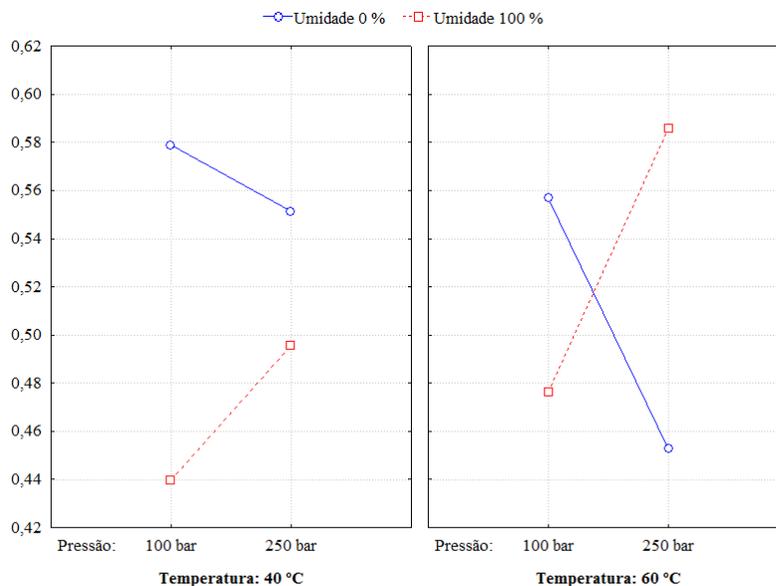


Figura 4.7 - Gráfico das médias marginais para o teor de celulose da fração P.

Verifica-se que não existe realmente influência da umidade no intervalo de pressão de 100 a 250 bar para temperatura de 40°C no teor de celulose da fração P, pois as linhas não se cruzam, porém nota-se que se o intervalo de pressão trabalhado nos experimentos fosse maior consequentemente as linhas se cruzariam e haveria uma interação considerável da umidade no comportamento para a temperatura de 40°C. Enquanto, para a temperatura de 60°C as linhas de interação se cruzam, evidenciando uma forte influência no intervalo de pressão estudado para uma temperatura de 60°C.

Para determinar um modelo matemático que descreva o comportamento do teor de celulose no pré-tratamento é necessário verificar o teste de normalidade dos erros. Como o número de ensaios é pequeno, um histograma da frequência dos resíduos não é indicado, optando-se por construir o gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme a Figura 4.8.

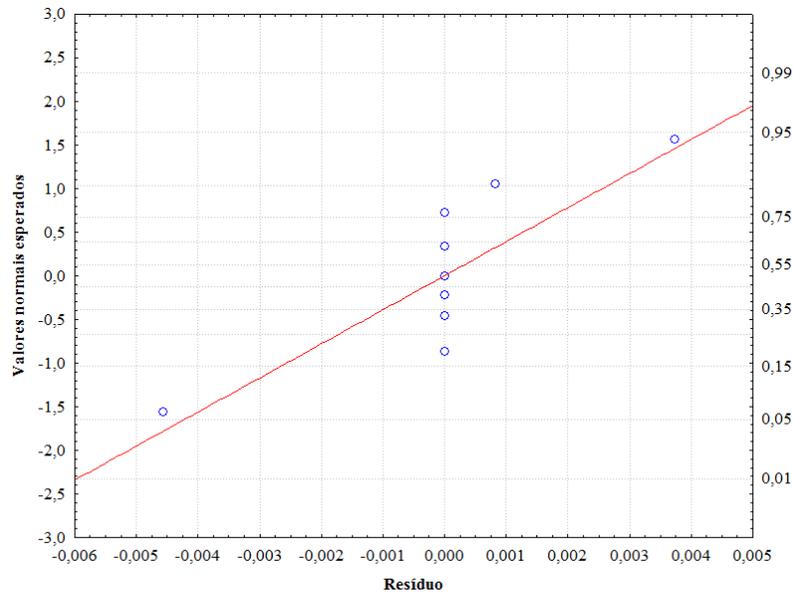


Figura 4.8 - Gráfico da probabilidade normal dos resíduos do teor de celulose da fração P.

O gráfico da probabilidade normal permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, pois os dados se encontram relativamente próximos à linha reta vermelha. Em seguida, apresenta-se a Figura 4.9, para determinar se os dados previstos pela regressão linear são próximos dos valores observados experimentalmente.

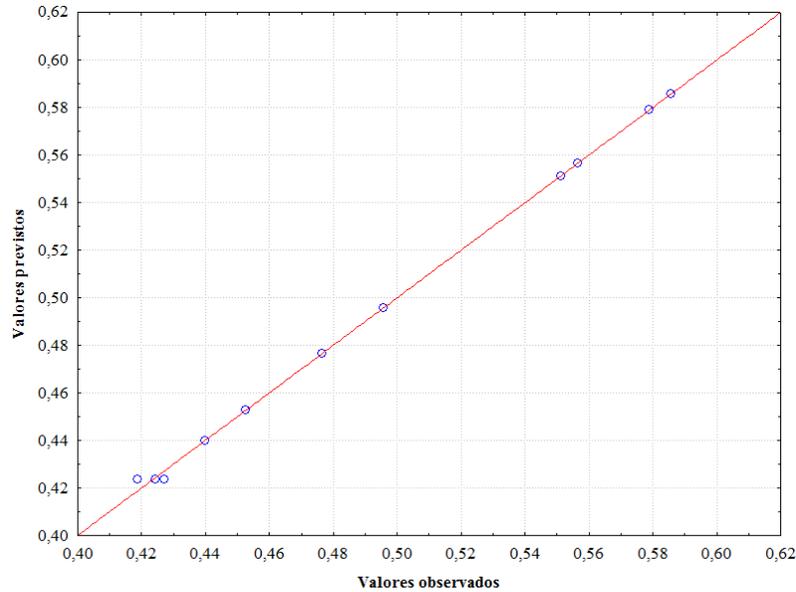


Figura 4.9 - Valores previstos versus valores observados do teor de celulose da fração P.

Os dados se ajustam perfeitamente aos valores esperados conforme apresentado na Figura 4.9, isto é caracterizado pelos pontos que ficam próximos à linha reta vermelha. O modelo proposto explicaria 99,92 % da variância, conforme valor de R^2 calculado na tabela dos efeitos da fração P.

Outro fator a ser levado em conta para a construção de um modelo matemático de primeira ordem é verificar se a curvatura é ou não significativa, para este caso a curvatura é significativa para a fração P, portanto um modelo de primeira ordem não descreve satisfatoriamente os efeitos.

Para confirmar se o modelo linear realmente não descreve o comportamento do teor de celulose da fração P foi realizado o teste F para os dados. Verificaram-se os resultados da análise de variância dos resultados (ANOVA) conforme apresentada na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Análise da variância do teor de celulose da fração P.

| Fonte de variação | SQ ¹ | GL ² | MQ ³ | Teste F (calculado) | Teste F (tabelado) |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,00266 | 3 | 0,00089 | 0,15509 | 4,3468 |
| Falta de ajuste | 0,03998 | 5 | 0,00800 | 450,6941 | 19,296 |
| Resíduos | 0,04002 | 7 | 0,00572 | | |
| Erro puro | 0,00003 | 2 | 0,00002 | | |
| SQ total | 0,04268 | 10 | | | |

¹Soma quadrática; ²Grau de liberdade e ³Média quadrática.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.10, verifica-se que ambos os resultados, apesar do coeficiente de determinação do modelo alto ($R^2 = 99,92\%$), confirmam que o modelo não se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo não é válido.

Em seguida, apesar da não validação do modelo, é apresentada a superfície de resposta (Figura 4.10) que representa graficamente o processo para o teor de celulose em função da temperatura e pressão para uma umidade de 100 %. O teor de umidade igual a 100 % foi selecionado de acordo com o resultado de maior valor no planejamento experimental (ensaio 8).

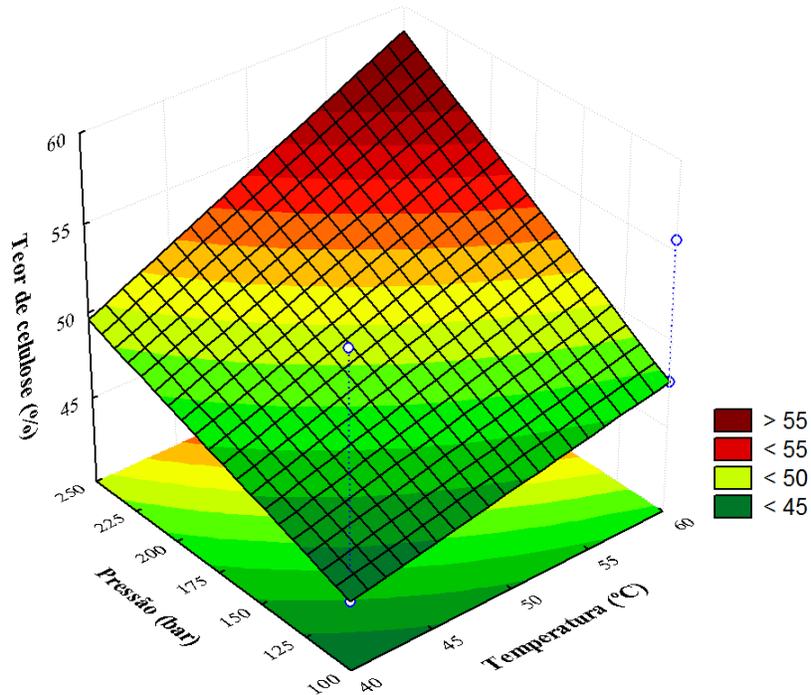


Figura 4.10 - Superfície de resposta do teor de celulose para fração P.

Como mostra a Figura 4.10, quanto maior for a temperatura e pressão aplicada no pré-tratamento com CO₂ supercrítico, da fração P com umidade de 100 %, maiores serão os teores de celulose.

O pré-tratamento com CO₂ supercrítico foi importante na alteração da composição estrutural das frações de bagaço, observou-se maiores teores de celulose nos ensaios e a diminuição dos teores de hemicelulose, possibilitando um acesso enzimático mais eficiente na etapa de hidrólise enzimática.

O aumento de 33 % no teor de celulose da fração fina e aumento de 38 % da fração P pelo pré-tratamento com CO₂ supercrítico, foi muito próximo dos resultados encontrados por Rabelo et al. (2012). Rabelo et al. (2012) obtiveram teores de celulose utilizando o pré-tratamento a vapor impregnado com peróxido de hidrogênio de 63 % contra 43 % (aumento aproximado de 47 %) sem pré-tratamento para o bagaço de cana.

Gao et al. (2010), Kim e Hong (2001) e Srinivasan e Ju (2010) utilizaram intervalos de pressão no pré-tratamento de biomassa lignocelulósicas próximos de 250 bar,

assim como utilizado neste trabalho, porém é importante avaliar o pré-tratamento com CO₂ supercrítico nas frações fina e P em pressões maiores, assim como para temperaturas elevadas como verificado por Alinia et al. (2010), Kim e Hong (2001) e Srinivasan e Ju (2010), com temperaturas de operação superiores a 150°C.

Devido a limitações no equipamento o intervalo de pressão e de temperatura não foram maiores. As superfícies de respostas indicam que o aumento nestes parâmetros é essencial para um maior teor de celulose após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

4.3 Hidrólise enzimática

A fim de verificar qual a influência que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico possui na conversão da celulose em glicose, e não só quanto à sua composição estrutural, realizou-se a hidrólise enzimática das frações de bagaço fina e P, conforme o item 3.2.4. Deste modo, foi possível determinar o percentual em que a celulose foi convertida em glicose para diversas condições de pré-tratamento.

A partir da hidrólise enzimática também foram determinados a quantidade de açúcares redutores totais (ART) para as frações fina e P. Para determinar os ART foi utilizado o método DNS, enquanto que, para determinação da concentração de glicose foi o kit enzimático. Naturalmente a concentração de ART é superior à concentração de glicose, visto que os ART contabilizam a sacarose, frutose e a glicose. Os resultados da concentração de ART são apresentados no APÊNDICE A.

Primeiramente, foi analisado o comportamento da hidrólise para a concentração de glicose em função do tempo de hidrólise, a fim de, verificar o tempo de hidrólise mais eficiente nas frações fina e P. Em seguida, foi avaliado para o tempo de hidrólise com as melhores conversões em glicose como resposta ao planejamento experimental.

Estabelecida a matriz do planejamento, os resultados foram avaliados com o software de análise de dados STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc. 2007) para selecionar quais são as variáveis que mais influenciam a hidrólise enzimática. A variável resposta do

planejamento experimental para a hidrólise enzimática nas frações fina e P foi a conversão em glicose.

4.3.1 Hidrólise enzimática da fração fina

A hidrólise enzimática da fração fina foi realizada em 72 horas, com tomadas de amostras em tempos determinados. A Figura 4.11 apresenta as curvas de concentração de glicose para a hidrólise enzimática da fração fina.

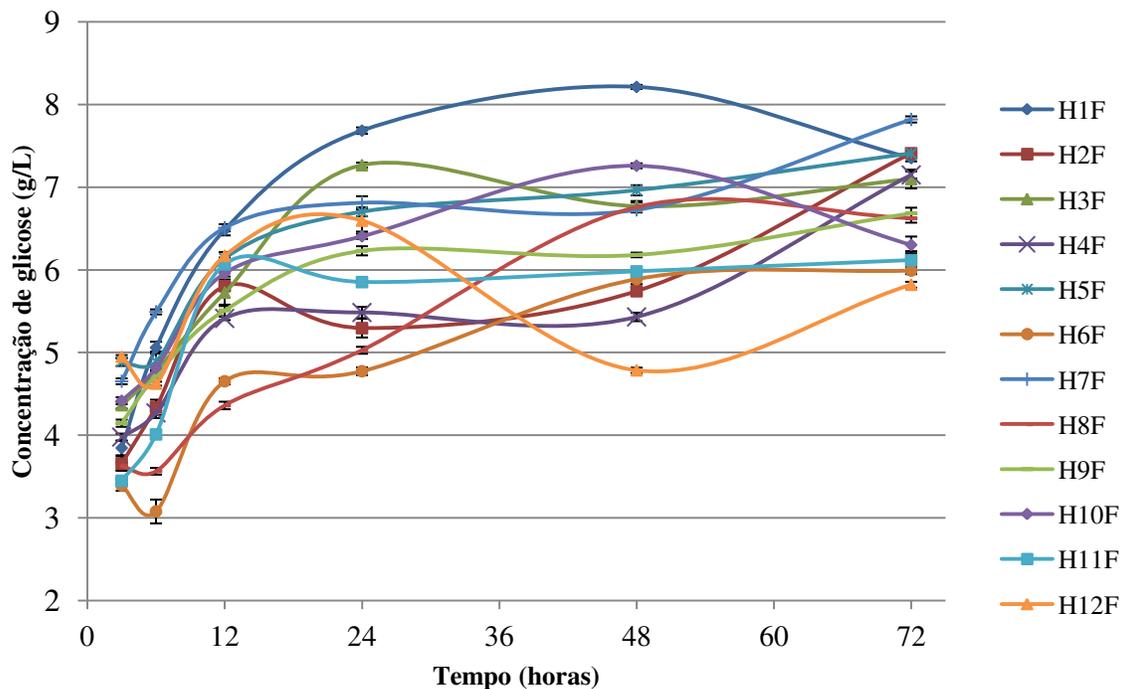


Figura 4.11 – Curva de concentração de glicose *versus* tempo da fração fina.

Como mostra a Figura 4.11, todos os ensaios aumentaram a concentração de glicose nas primeiras 24 horas de hidrólise enzimática, com exceção dos ensaios H2F e H11F. Para 24 horas de hidrólise enzimática, verificou-se que apenas os ensaios H1F, H3F,

H5F e H7F apresentaram uma concentração maior do que o ensaio sem pré-tratamento (controle), todos os demais ensaios foram inferiores ao valor obtido para o ensaio controle.

De 24 para 48 horas de hidrólise enzimática, verificou-se que os ensaios H3F e sem pré-tratamento apresentaram uma diminuição considerável na concentração de glicose quando comparada para hidrólise enzimática de 24 horas de 7 % e 27 %, respectivamente. De 48 para 72 horas de hidrólise enzimática, verificou-se que houve uma diminuição significativa na concentração de glicose para o ensaio H1F de 10 % em relação ao ensaio H1F para 48 horas.

A Figura 4.11 mostra que a hidrólise enzimática da fração fina sem pré-tratamento com CO₂ supercrítico (H12F) obteve sua melhor produção em glicose de 6,60 g/L em 24 horas de hidrólise.

O ensaio sem pré-tratamento H12F apresentou uma concentração de glicose inicial elevada quando comparado aos demais ensaios com pré-tratamento, provavelmente devido à presença de sacarose superficial remanescente do caldo de cana, visto que a sacarose é composta por moléculas de glicose e frutose. Os demais ensaios com pré-tratamento apresentaram concentrações de glicose menores inicialmente, pois provavelmente grande parte da sacarose presente nas amostras foram extraídas durante o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Apesar do ensaio H7F ter apresentado ao final da hidrólise uma produção maior (7,82 g/L) em relação aos demais ensaios em 72 horas, verificou-se que este valor é ligeiramente maior, cerca de 2 %, em relação ao ensaio H1F (7,69 g/L) para hidrólise enzimática em 24 horas e ligeiramente menor, cerca de 5 %, em relação ao ensaio H1F (8,21 g/L) para hidrólise enzimática em 48 horas. Deste modo, verificou-se que 24 horas de hidrólise enzimática foi suficiente para atingir o melhor resultado, demonstrando que uma hidrólise enzimática de 72 horas da fração fina é desnecessária.

Os ensaios H1F, H3F, H5F e H7F apresentaram melhores resultados quando comparados o ensaio H12F em 24 horas de hidrólise, estes são exatamente os ensaios com teor de umidade igual a 0 %, evidenciando que a ausência de água na fração fina influencia diretamente na obtenção de melhores conversões.

O melhor ensaio de hidrólise enzimática nas primeiras 24 horas foi o ensaio H1F, no qual obteve-se um aumento de 16,52 % quando comparado ao ensaio H12F. Verificou-se que os ensaios com amostras úmidas obtiveram resultados satisfatórios a partir de 48 horas de hidrólise enzimática, porém nenhuma destas chegou a ultrapassar o resultado para o ensaio H1F nas primeiras 24 horas.

É interessante observar que, com exceção dos ensaios H5F e H6F, todos os ensaios apresentaram uma oscilação nas conversões em glicose, no entanto, as curvas de concentração deveriam se manter constantes após determinado período. Assim, devem ter ocorrido problemas durante a hidrólise enzimática como, por exemplo, falha dos magnetos em homogeneizar a solução durante a hidrólise e/ou alguma contaminação durante o preparo da amostra para a leitura dos açúcares. Este efeito oscilatório é mais intenso justamente para a amostra sem pré-tratamento (H12F). Verificou-se uma queda de 28 % na conversão em glicose de 24 para 48 horas.

O ensaio realizado em triplicata (H9F, H10F e H11F) mostrou-se com um comportamento esperado nas réplicas. Com exceção do ponto em 48 horas para o ensaio H10F, todos os pontos forneceram conversões em glicose bem próximas, conferindo ao experimento uma boa reprodutibilidade dos resultados.

Os resultados da concentração de glicose e conversão da celulose em glicose são apresentados no APÊNDICE A.

4.3.1.1 Hidrólise enzimática da fração fina em 24 horas

A seguir, na Tabela 4.11, estão especificados os 11 ensaios realizados no pré-tratamento com CO₂ supercrítico da fração fina e sua respectiva conversão como resposta da hidrólise enzimática nas primeiras 24 horas.

Tabela 4.11 - Matriz do planejamento experimental 2³ completo com triplicata no ponto central.

| Ensaio | Variáveis | | | Conversão | Desvio padrão amostral |
|-----------|-------------|------------------|---------------|-------------------------------|------------------------|
| | Umidade (%) | Temperatura (°C) | Pressão (bar) | em glicose (%) da fração fina | |
| 1 | -1 (0) | -1 (40) | -1 (100) | 52,49 | 0,27 |
| 2 | +1 (100) | -1 (40) | -1 (100) | 36,17 | 0,77 |
| 3 | -1 (0) | +1 (60) | -1 (100) | 49,64 | 0,21 |
| 4 | +1 (100) | +1 (60) | -1 (100) | 37,46 | 0,46 |
| 5 | -1 (0) | -1 (40) | +1 (250) | 45,78 | 0,37 |
| 6 | +1 (100) | -1 (40) | +1 (250) | 32,61 | 0,32 |
| 7 | -1 (0) | +1 (60) | +1 (250) | 46,54 | 0,53 |
| 8 | +1 (100) | +1 (60) | +1 (250) | 34,34 | 0,29 |
| 9 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 42,56 | 0,38 |
| 10 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 43,76 | 0,22 |
| 11 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 39,98 | 0,32 |

Observa-se na Tabela 4.11 que o melhor resultado da fração fina ocorreu no ensaio 1 que corresponde a uma umidade de 0%, temperatura de 40°C e pressão de 100 bar, alcançando uma conversão em glicose de 52,49%. Os ensaios 3, 5 e 7 apresentaram resultados similares, alcançando valores próximos de 50 % na conversão em glicose.

Com exceção dos ensaios 1, 3, 5 e 7, os valores de conversão para o planejamento experimental foram menores que a conversão da celulose encontrada para o ensaio controle (sem pré-tratamento supercrítico) da fração fina, o qual alcançou uma conversão de 45,05% em glicose. Aumento máximo de 16,52 % para o ensaio 1 (maior conversão) quando comparada com o ensaio sem pré-tratamento (controle). Portanto, o pré-tratamento com CO₂ supercrítico se mostrou ineficiente, de um modo geral, em aumentar a conversão da celulose em glicose da fração fina com 24 horas de hidrólise enzimática.

O valor encontrado para o desvio padrão para os pontos na triplicata do ponto central (ensaios 9, 10 e 11) da fração fina foi de 0,016, resultado que confirma a boa reprodutibilidade dos resultados, devido à baixa dispersão dos resultados para os teores de celulose.

Para analisar as conversões em glicose, primeiramente foi calculada a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento da fração fina (Tabela 4.12), deste modo obteve-se os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, erro padrão e p-valor, coeficiente de determinação do modelo R^2 e nível de significância ($\alpha = 0,05$). Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05).

Tabela 4.12 - Efeitos e coeficientes estimados da conversão em glicose para fração fina.

| Variável | Efeito | Coeficiente ¹ | Desvio padrão ² | p-valor |
|-------------------------------|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------|
| Média/Intercepto ³ | 0,418794 | 0,418794 | 0,006833 | 0,000266 |
| Curvatura | 0,004391 | 0,002195 | 0,013084 | 0,882178 |
| Umidade (A) | -0,134657 | -0,067328 | 0,006833 | 0,010144 |
| Temperatura (B) | 0,002317 | 0,001159 | 0,006833 | 0,880945 |
| Pressão (C) | -0,041226 | -0,020613 | 0,006833 | 0,094559 |
| (A) x (B) | 0,012807 | 0,006404 | 0,006833 | 0,447621 |
| (A) x (C) | 0,007806 | 0,003903 | 0,006833 | 0,625494 |
| (B) x (C) | 0,010124 | 0,005062 | 0,006833 | 0,535994 |
| (A) x (B) x (C) | -0,007928 | -0,003964 | 0,006833 | 0,620480 |

¹ Coeficiente do modelo; ² Erro padrão (resíduo) do coeficiente: corresponde à metade do erro padrão do efeito – com exceção do intercepto; ³ Média dos resultados.

Verifica-se que apenas a umidade (A) é significativa. A significância desta variável pode ser observada por meio do Gráfico de Pareto indicado na Figura 4.12, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

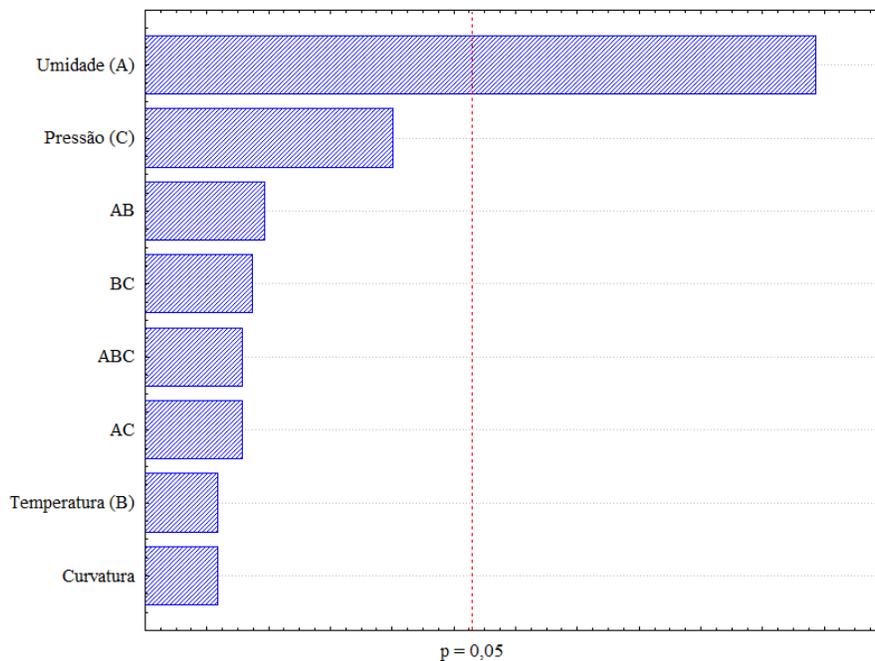


Figura 4.12 - Variáveis significativas na conversão da celulose da fração fina.

A Figura 4.12 ratifica que apenas a umidade (A) possui influência positiva no pré-tratamento com CO₂ supercrítico sobre a conversão em glicose da fração fina, pois graficamente encontram-se à direita da linha tracejada. O efeito de interação entre as variáveis é importante e pode ser visto pela falta de paralelismo das linhas apresentadas no gráfico da Figura 4.13.

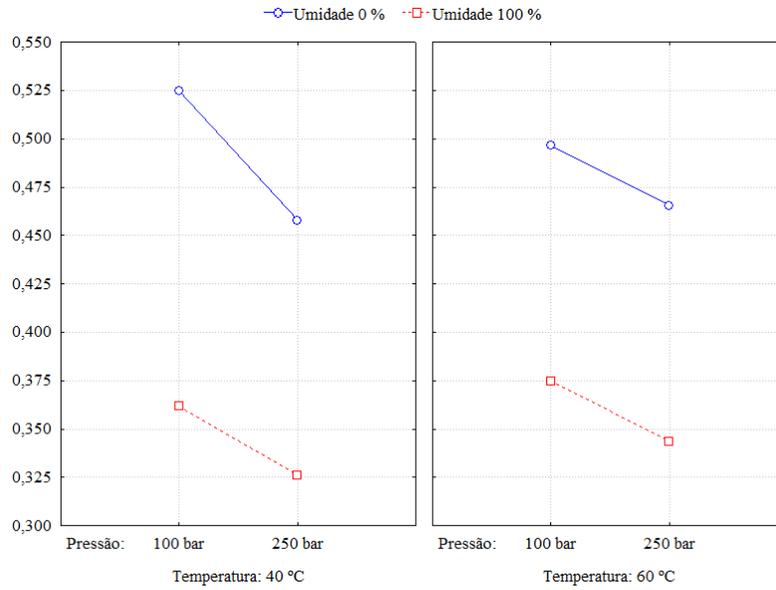


Figura 4.13 - Gráfico das médias marginais para a conversão em glicose da fração fina.

Verifica-se que não existe a influência entre as variáveis, umidade e pressão, nos seus respectivos intervalos nas temperaturas de 40°C e de 60°C.

Para determinar um modelo matemático que descreva a hidrólise da fração fina se verifica o teste de normalidade dos erros. Como o número de ensaios é pequeno, um histograma da frequência dos resíduos não é indicado, optando-se por construir o gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme a Figura 4.14.

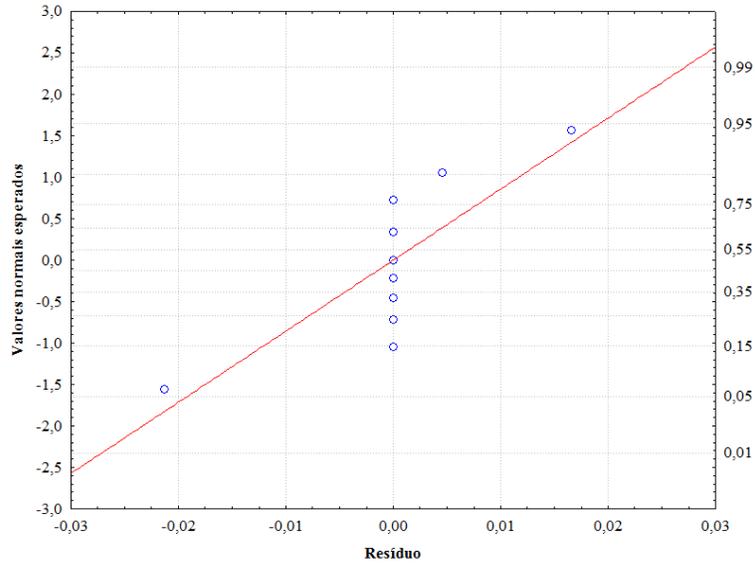


Figura 4.14 - Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da conversão em glicose da fração fina.

O gráfico da probabilidade normal permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, pois os dados se encontram relativamente próximos à linha reta vermelha. Em seguida, apresenta-se a Figura 4.15 (Valores previstos *versus* valores observados), para determinar se os dados previstos por um modelo matemático são próximos dos valores observados experimentalmente.

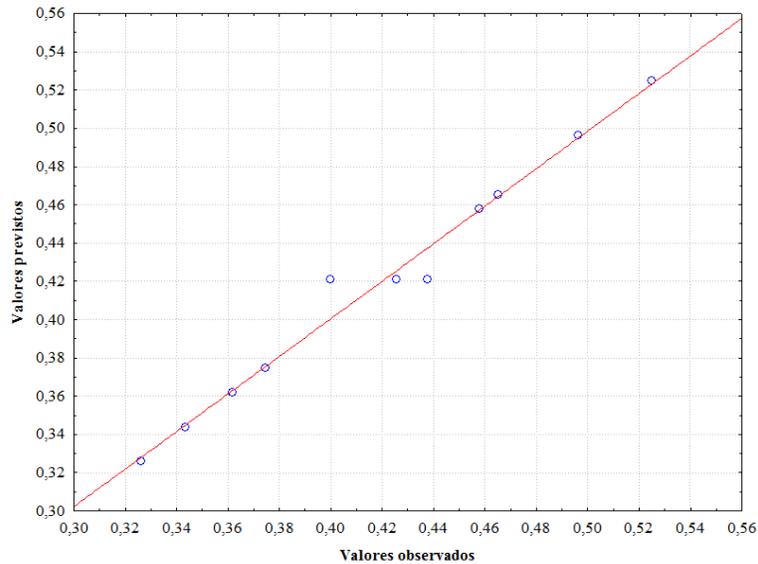


Figura 4.15 - Valores previstos versus valores observados da conversão em glicose da fração fina.

Confirma-se que na Figura 4.15 uma regressão linear descreveria bem os dados experimentais, isto é caracterizado pelos pontos que ficam próximos à linha reta vermelha, como a curvatura não é significativa para a fração fina, pode ser proposto um modelo matemático primeira ordem que descreva o comportamento para a hidrólise enzimática da fração fina. O modelo proposto explicaria 98,19 % da variância, conforme valor de R^2 calculado na tabela dos efeitos da fração fina.

Para confirmar se o modelo linear realmente descreve o comportamento da hidrólise da fração fina foi realizado o teste F para os dados. Verificaram-se os resultados da análise de variância dos resultados (ANOVA) conforme apresentada na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Análise da variância da conversão em glicose da fração fina.

| Fonte de variação | SQ ¹ | GL ² | MQ ³ | Teste F (calculado) | Teste F (tabelado) |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,039675 | 3 | 0,013225 | 60,1843 | 4,3468 |
| Falta de ajuste | 0,000791 | 5 | 0,000158 | 0,4236 | 19,296 |
| Resíduos | 0,001538 | 7 | 0,000220 | | |
| Erro puro | 0,000747 | 2 | 0,000374 | | |
| SQ total | 0,041213 | 10 | | | |

¹Soma quadrática; ²Grau de liberdade e ³Média quadrática.

Analisando a Tabela 4.13, verificou-se que as duas condições para o teste F foram satisfeitas, o que significa que a regressão linear é de boa confiabilidade e sem evidência de falta de ajuste, deste modo se confirma que um modelo linear é capaz de descrever um modelo de maneira satisfatória. A seguir é apresentada a equação para descrever a conversão em glicose da fração fina após um pré-tratamento com CO₂ supercrítico em função da variável significativa.

$$\text{Conversão em glicose (\%)} = 41,88 - 6,73 \times A$$

Em que:

A: é o teor de umidade² (%);

O comportamento da conversão em glicose da fração fina pode ser visualizado por meio da superfície de resposta (Figura 4.16) em função da temperatura e pressão o teor de umidade fixa em 0 %. O teor de umidade igual a 0 % foi selecionado de acordo com os maiores resultados no planejamento experimental (ensaios 1, 3, 5 e 7).

^{2,3,4} Codificado de acordo com os níveis (-1, 0, +1) apresentados na Tabela 4.1.

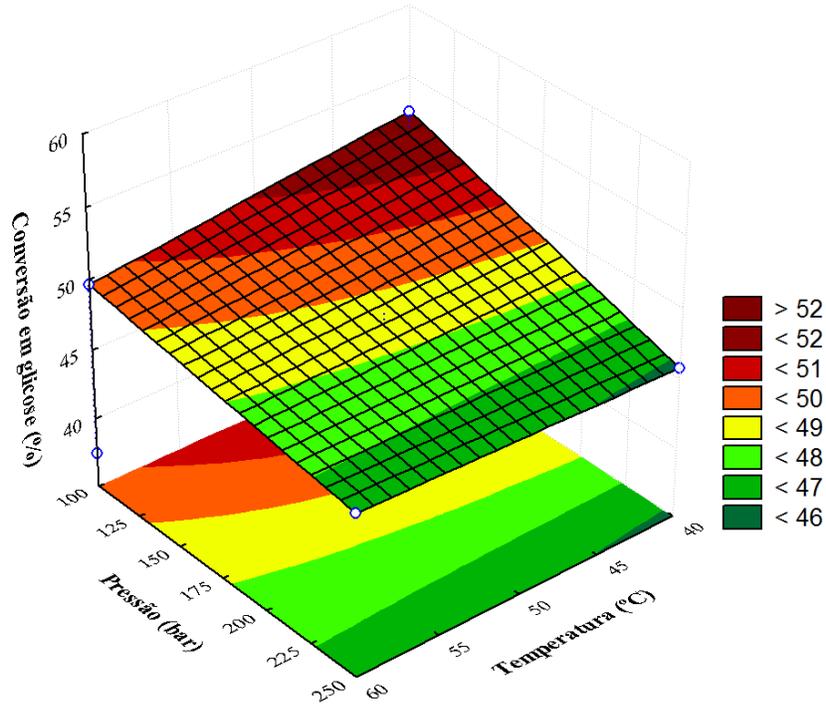


Figura 4.16 - Superfície de resposta da conversão em glicose para fração fina.

Como mostra a Figura 4.16, quanto menores forem a temperatura e pressão aplicada no pré-tratamento com CO_2 supercrítico, para a fração fina com umidade igual a 0 %, maior será a conversão em glicose como visto para o ensaio 1.

4.3.2 Hidrólise enzimática da fração P

Assim como para a fração fina, a hidrólise enzimática da fração P foi realizada em 72 horas, com tomadas de amostras em tempos determinados. A Figura 4.17 apresenta as curvas de concentração de glicose para a hidrólise enzimática da fração P.

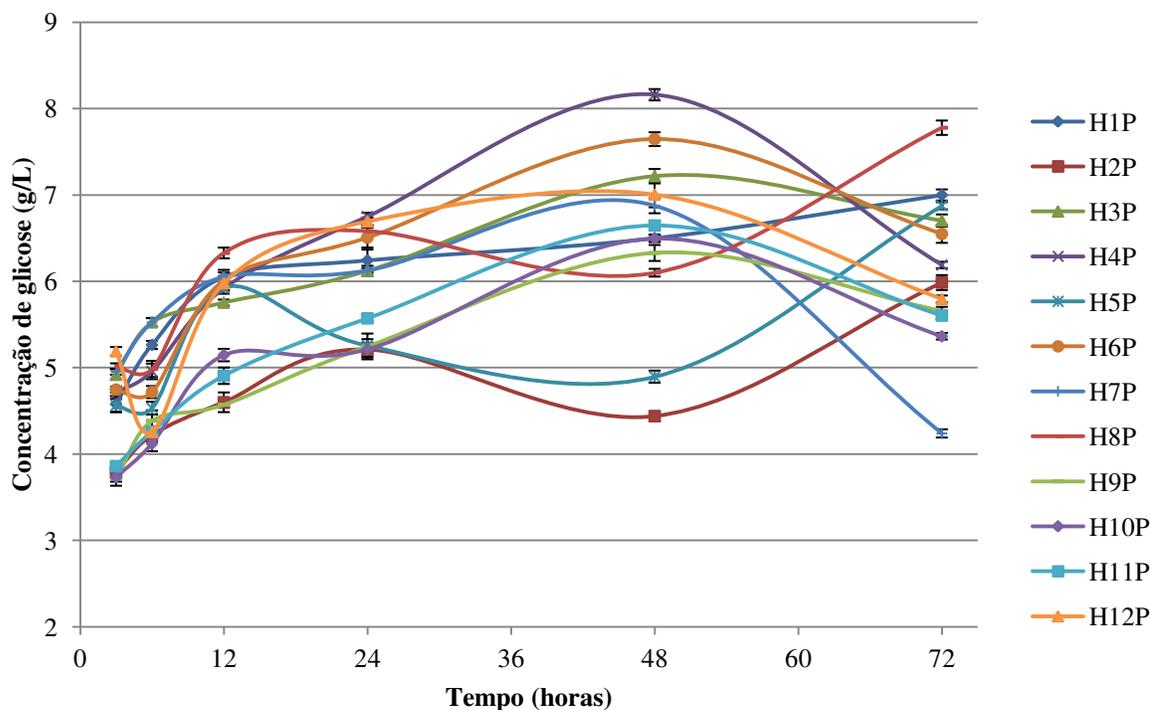


Figura 4.17 – Curva de concentração de glicose *versus* tempo da fração P.

Como mostra a Figura 4.17, a concentração de glicose aumentou para todos os ensaios nas primeiras 24 horas de hidrólise enzimática, porém nenhum ensaio obteve uma concentração de glicose maior do que o ensaio sem pré-tratamento (controle). De 24 para 48 horas de hidrólise enzimática todos os ensaios, com exceção dos ensaios H2P, H5P e H8P, apresentaram um aumento na concentração de glicose. O ensaio H4P apresentou a maior concentração entre todos os ensaios para 48 horas de hidrólise enzimática, alcançando uma concentração de glicose de 8,16 g/L.

O ensaio sem pré-tratamento H12P novamente apresentou uma concentração de glicose inicial elevada quando comparado aos demais ensaios com pré-tratamento para a leitura de 3 horas de hidrólise enzimática, assim como para a fração fina, provavelmente devido à presença de sacarose. Os demais ensaios com pré-tratamento apresentaram concentrações de glicose menores inicialmente, pois o pré-tratamento CO₂ supercrítico foi eficaz na extração da sacarose superficial.

Curiosamente como visto para o ensaio H12P, todos os ensaios que aumentaram a concentração de glicose de 24 para 48 horas, com exceção do ensaio H1P, diminuíram a concentração consideravelmente de 48 para 72 horas, enquanto, os ensaios H2P, H5P e H8P que apresentaram uma diminuição na concentração de glicose de 24 para 48 horas, aumentaram significativamente de 48 para 72 horas. Estas oscilações na concentração de glicose em função do tempo de hidrólise enzimática, assim como para a fração fina, são provavelmente resultado de problemas ocorridos durante o experimento como, a falha dos magnetos na homogeneização da solução durante a hidrólise enzimática e/ou contaminação durante o preparo das amostras para a leitura dos açúcares.

A Figura 4.17 mostra que a hidrólise enzimática da fração P sem pré-tratamento com CO₂ supercrítico (H12P), obteve uma concentração de glicose para 24 horas de hidrólise enzimática igual a 6,70 g/L. Houve um aumento na concentração do ensaio H12P para 48 horas de hidrólise, porém este aumento de aproximadamente 5 % não foi considerado significativo.

O uso do pré-tratamento com CO₂ supercrítico para a fração P só foi eficaz para tempos de hidrólise maiores que 24 horas, como pode ser visto nos tempos de 48 e 72 horas. O ensaio H4P apresentou a maior concentração de glicose (8,16 g/L) para 48 horas de hidrólise enzimática, um aumento de 16,52 % em relação ao ensaio sem pré-tratamento em 48 horas, aproximadamente 21 % quando comparado ao melhor ensaio para 24 horas de hidrólise enzimática (H4P) e de 5 % quando comparado ao ensaio com a melhor concentração para 72 horas de hidrólise enzimática para o ensaio H8P.

As concentrações de glicose mais altas para 48 horas de hidrólise enzimática foram obtidas nos ensaios H4P (teor de umidade igual a 100 %, temperatura de 60°C e pressão de 100 bar) e H6P (teor de umidade igual a 100 %, temperatura de 40°C e pressão de 250 bar), com concentrações de glicose de 8,16 g/L e 7,65 g/L, respectivamente. Deste modo, concluiu-se que o teor de umidade foi importante para um aumento na concentração de glicose da fração P, no entanto é necessária uma avaliação para verificar a relação entre a temperatura e pressão no aumento da conversão em glicose da fração P.

A triplicata realizada no ponto central (H9P, H10P e H11P) para o planejamento experimental obteve conversões em glicose sem variação significativa, atribuindo ao experimento uma boa reprodutibilidade dos resultados.

Obteve-se para 24 horas de hidrólise enzimática, a concentração mais significativa para o ensaio sem pré-tratamento, alcançando uma concentração de 6,60 g/L e 6,70 g/L nas frações fina e P, respectivamente.

Os resultados da concentração de glicose e conversão da celulose em glicose são apresentados no APÊNDICE A.

Para comparar os resultados estatísticos das conversões em glicose no pré-tratamento com CO₂ supercrítico nas frações fina e P, tomou-se o tempo de 24 horas para a hidrólise enzimática da fração P. A fim de verificar o comportamento da fração P ao aumentar o intervalo das condições de temperatura e pressão no pré-tratamento. Em seguida, foi realizado o mesmo estudo para 48 horas de hidrólise enzimática, no qual foram determinadas as melhores conversões em glicose da fração P.

4.3.2.1 Hidrólise enzimática da fração P para 24 horas

Na Tabela 4.14 estão especificados os 11 ensaios realizados no pré-tratamento com CO₂ supercrítico da fração P e sua respectiva conversão como resposta para 24 horas de hidrólise enzimática.

Tabela 4.14 - Matriz do planejamento experimental 2³ completo com triplicata no ponto central.

| Ensaio | Variáveis | | | Conversão | Desvio padrão amostral |
|-----------|-------------|------------------|---------------|-------------------------------|------------------------|
| | Umidade (%) | Temperatura (°C) | Pressão (bar) | em glicose (%) da fração P | |
| 1 | -1 (0) | -1 (40) | -1 (100) | 47,72 | 0,85 |
| 2 | +1 (100) | -1 (40) | -1 (100) | 39,83 | 0,49 |
| 3 | -1 (0) | +1 (60) | -1 (100) | 46,79 | 0,40 |
| 4 | +1 (100) | +1 (60) | -1 (100) | 51,60 | 0,30 |
| 5 | -1 (0) | -1 (40) | +1 (250) | 40,19 | 0,95 |
| 6 | +1 (100) | -1 (40) | +1 (250) | 49,74 | 0,79 |
| 7 | -1 (0) | +1 (60) | +1 (250) | 46,82 | 0,20 |
| 8 | +1 (100) | +1 (60) | +1 (250) | 50,32 | 0,46 |
| 9 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 40,10 | 0,28 |
| 10 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 39,86 | 0,80 |
| 11 | 0 (50) | 0 (50) | 0 (175) | 42,59 | 0,29 |

As conversões da fração P foram diferentes quando comparadas com a fração fina. Para este caso, nota-se na Tabela 4.14 que a para o ensaio 4 (H4P), que corresponde a uma umidade de 100 %, temperatura de 60°C e pressão de 100 bar, observou-se a conversão mais alta, alcançando um valor de 51,60 % em glicose. Os únicos ensaios que alcançaram conversões acima de 50 % em glicose foram os ensaios 4 e 8.

Para o ensaio controle (sem pré-tratamento) da fração P verificou-se uma conversão da celulose de 51,16 %. Os valores de conversão para os ensaios H4P, H6P e H8P para o planejamento experimental da fração P foram iguais (sem variação significativa) à conversão da celulose encontrada para o ensaio controle, em todos os outros ensaios verificou-se uma conversão muito inferior ao ensaio sem pré-tratamento da fração P. Deste modo, o pré-tratamento com CO₂ supercrítico se mostrou ineficiente no aumento

da conversão da celulose em glicose da fração P para estas condições de temperatura e pressão no pré-tratamento.

O valor encontrado para o desvio padrão para os pontos na triplicata do ponto central (ensaios 9, 10 e 11) da fração fina foi de 0,012, resultado que confirma a boa reprodutibilidade dos resultados, devido à baixa dispersão dos resultados para os teores de celulose.

A estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento da fração P é apresentada na Tabela 4.15, juntamente com os valores obtidos para os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, erro padrão e p-valor, coeficiente de determinação do modelo R^2 e nível de significância ($\alpha=0,05$). Os valores destacados em negrito e itálico indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05).

Tabela 4.15 - Efeitos e coeficientes estimados da conversão em glicose para fração P.

| Variável | Efeito | Coeficiente ¹ | Desvio padrão ² | p-valor |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Média/Intercepto³ | <i>0,466264</i> | <i>0,466264</i> | <i>0,005340</i> | <i>0,000131</i> |
| Curvatura | <i>-0,115521</i> | <i>-0,057761</i> | <i>0,010226</i> | <i>0,029944</i> |
| Umidade (A) | 0,024915 | 0,012458 | 0,005340 | 0,144874 |
| Temperatura (B) | 0,045121 | 0,022560 | 0,005340 | 0,051725 |
| Pressão (C) | 0,002799 | 0,001399 | 0,005340 | 0,817816 |
| (A) x (B) | 0,016588 | 0,008294 | 0,005340 | 0,260624 |
| (A) x (C) | 0,040342 | 0,020171 | 0,005340 | 0,063492 |
| (B) x (C) | -0,009079 | -0,004539 | 0,005340 | 0,484846 |
| (A) x (B) x (C) | <i>-0,046896</i> | <i>-0,023448</i> | <i>0,005340</i> | <i>0,048157</i> |

¹ Coeficiente do modelo; ² Erro padrão (resíduo) do coeficiente: corresponde à metade do erro padrão do efeito – com exceção do intercepto; ³ Média dos resultados.

Observando-se a tabela de efeitos para este planejamento verifica-se que apenas a variável de interação entre a umidade, temperatura e pressão é significativa. A significância desta variável pode ser observada por meio do Gráfico de Pareto indicado na Figura 4.18, o qual apresenta a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão.

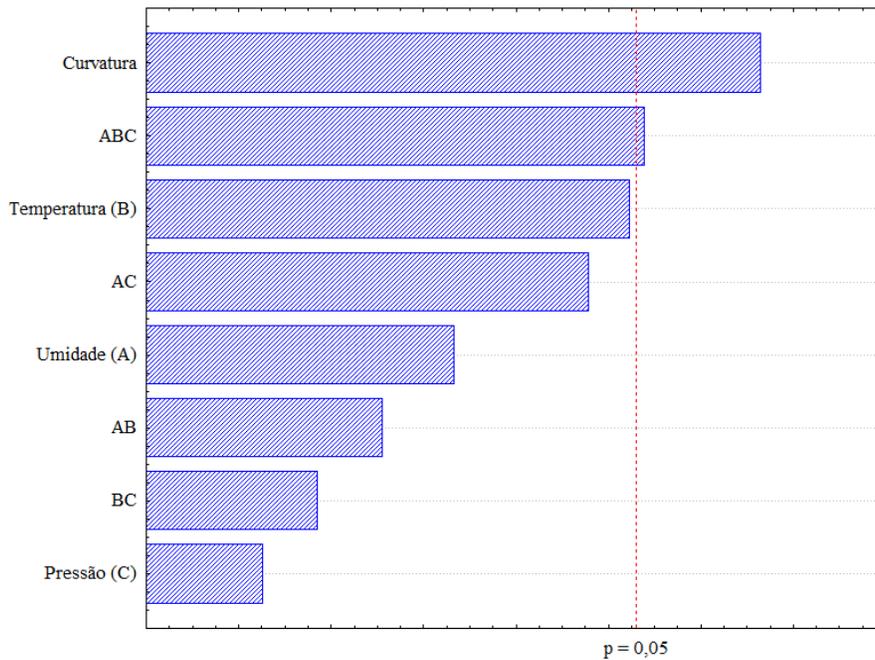


Figura 4.18 - Variáveis significativas na conversão da celulose da fração P.

A partir da Figura 4.18 verifica-se que com exceção da interação entre as três variáveis (ABC), todas variáveis e as interações entre as variáveis não são significativas, pois não se encontram à direita da linha tracejada. A variável ABC possui influência positiva no pré-tratamento com CO₂ supercrítico sobre a conversão em glicose da fração P. O efeito de interação pode ser verificado pela falta de paralelismo das linhas apresentadas no gráfico da Figura 4.19.

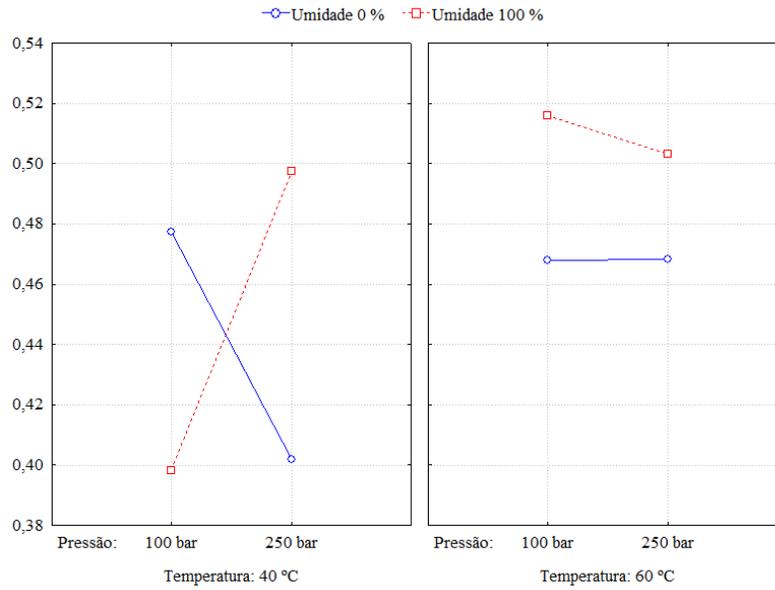


Figura 4.19 - Gráfico das médias marginais para a conversão em glicose da fração P.

Verifica-se que há influência da umidade no intervalo de pressão de 100 a 250 bar para temperatura de 40°C, pois as linhas da umidade se cruzam, porém para temperatura de 60°C, não há influência para tais intervalos. Provavelmente, verificar-se-ia uma influência entre a umidade e a pressão caso fosse ampliado o intervalo de pressão que foi utilizado no estudo.

A fim de se determinar um modelo matemático que descreva a hidrólise da fração P é necessário verificar o teste de normalidade dos erros. Assim como para a fração fina o número de ensaios é pequeno, portanto, opta-se por construir o gráfico de probabilidade normal dos resíduos conforme a Figura 4.20.

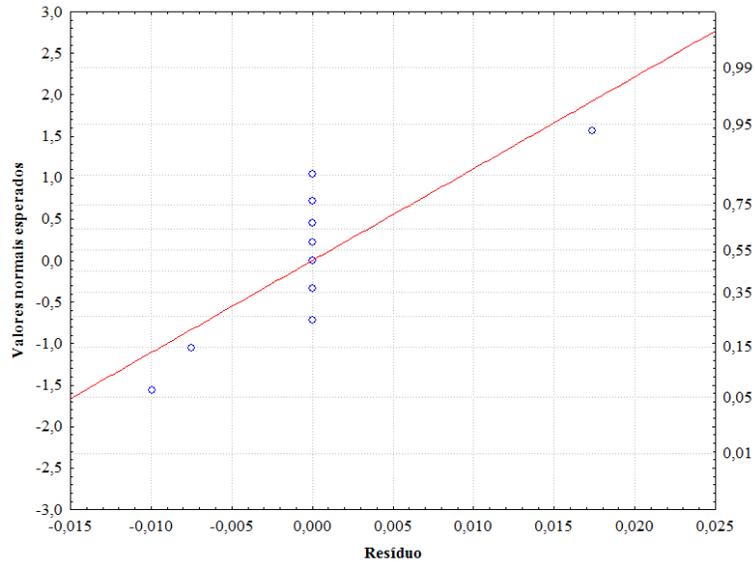


Figura 4.20 - Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da conversão em glicose da fração P.

O gráfico da probabilidade normal permite afirmar que os resíduos obedecem à distribuição normal, pois os dados se encontram relativamente próximos à linha reta vermelha. Na sequência determina-se o gráfico: Valores previstos *versus* valores observados, em que é verificado se os dados previstos pelo modelo matemático são próximos dos valores observados experimentalmente.

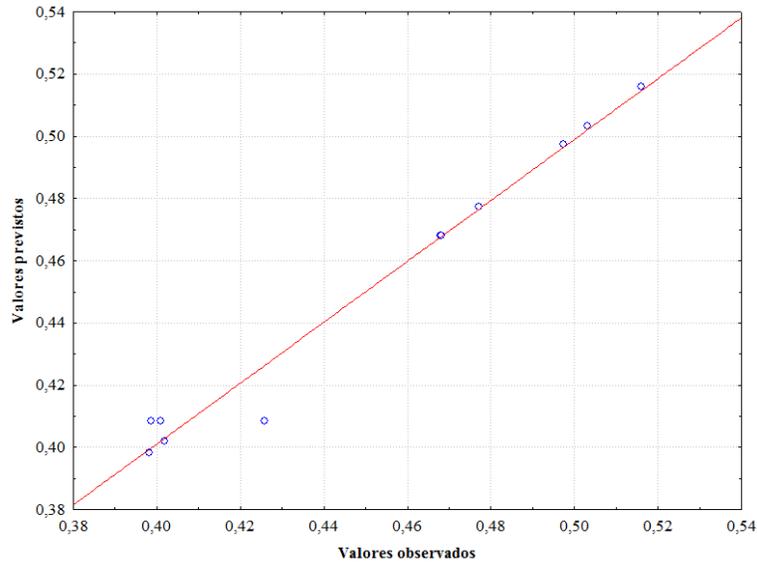


Figura 4.21 - Valores previstos versus valores observados da conversão em glicose da fração P.

A Figura 4.21 confirma que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, isto é caracterizado pelos pontos que ficam próximos à linha reta vermelha. O modelo proposto explicaria 97,87 % da variância, conforme valor de R^2 calculado na tabela dos efeitos da fração P.

Como para a fração P a curvatura é significativa, um modelo matemático linear não é válido, sendo necessário um modelo de ordem superior para validar os dados. Além disso, para validar um modelo linear é necessário confirmar as condições do teste F, deste modo, verificou-se o teste F por meio da análise de variância dos resultados (ANOVA), apresentada na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 - Análise da variância da conversão em glicose da fração P.

| Fonte de variação | SQ | GL | MQ | Teste F (calculado) | Teste F (tabelado) |
|------------------------|----------|----|----------|------------------------|-----------------------|
| Regressão | 0,005330 | 3 | 0,001777 | 0,7723 | 4,3468 |
| Falta de ajuste | 0,015647 | 5 | 0,003129 | 13,7254 | 19,296 |
| Resíduos | 0,016103 | 7 | 0,002300 | | |
| Erro puro | 0,000456 | 2 | 0,000228 | | |
| SQ total | 0,021433 | 10 | | | |

¹Soma quadrática; ²Grau de liberdade e ³Média quadrática.

Apenas uma das duas condições foi satisfeita, confirmando que o modelo não se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo não é válido.

Apesar da não validação do modelo, é apresentada a superfície de resposta (Figura 4.22) que representa graficamente o comportamento da conversão em glicose em função da temperatura e pressão para um teor de umidade igual 100 %. O teor de umidade igual a 100 % foi selecionado de acordo com os maiores resultados no planejamento experimental (ensaio 4 e 8).

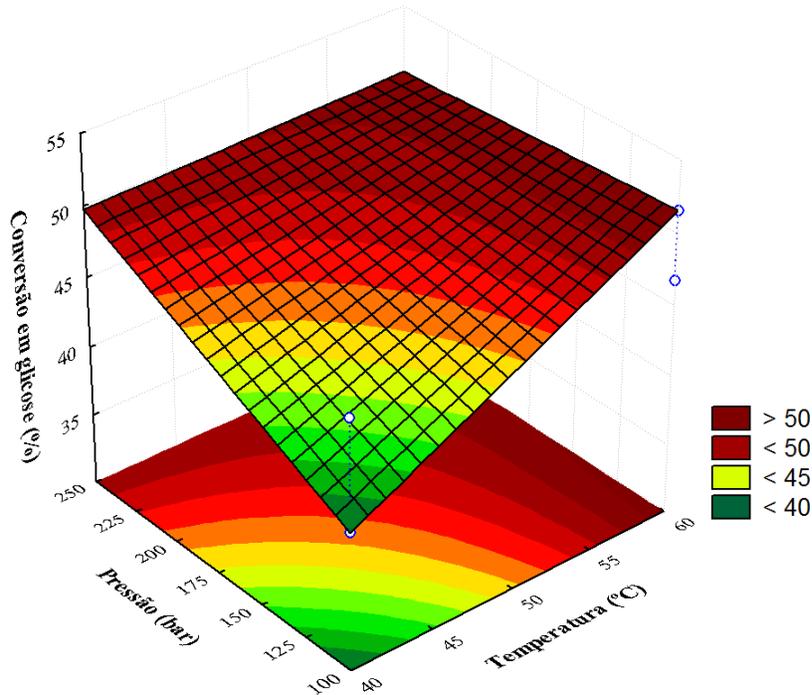


Figura 4.22 - Superfície de resposta da conversão em glicose para fração P.

A Figura 4.22 mostra que serão alcançados maiores conversões em glicose da fração P, quanto maiores forem a temperatura e pressão aplicada no pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Para valores de pressão de 75 a 500 bar para o mesmo intervalo de temperatura verificou-se que a conversão em glicose aumentou para pouco mais de 65 %, uma diferença significativa quando comparada aos ensaio 4 e 8 com conversões iguais a 51,60 % e 50,32 %, respectivamente.

Assim como para o teor de celulose, o modelo linear não descreve um modelo matemático para a conversão em glicose para fração P, deste modo, é aconselhável partir para um modelo quadrático, cuja expressão geral, para duas variáveis é:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Este modelo tem 6 parâmetros e 5 níveis, logo deve-se ampliar o planejamento. A ampliação pode ser feita com a construção do planejamento com delineamento composto central rotacional (DCCR). O planejamento DCCR é idêntico ao planejamento inicial (2^3), porém deslocado em 45 graus em relação à orientação de partida. Os novos pontos estarão a uma distância de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central.

Phan e Tan (2014) verificaram uma conversão de aproximadamente 60 % em glicose ao final de 72 horas de hidrólise enzimática utilizando um pré-tratamento combinado de explosão com CO_2 supercrítico e alcalino para o bagaço de cana.

Os resultados de conversão em glicose da fração fina apesar de mostrar um aumento em relação à fração sem pré-tratamento para alguns ensaios, foram inferiores ao encontrado por Almeida (2012), o qual encontrou uma conversão em glicose de 64,11 % da fração fina sem pré-tratamento em 72 horas de hidrólise enzimática.

As melhores conversões em glicose para a fração fina e P apresentaram um aumento igual de 16,52 % em relação às frações de bagaço não pré-tratadas para um tempo de hidrólise enzimática de 24 e 48 horas, respectivamente.

4.4 Cristalinidade

Uma forma de observar alterações estruturais após o pré-tratamento com CO_2 supercrítico é analisando uma possível diminuição na cristalinidade da celulose na biomassa. Deste modo, análises de difração de raios X foram realizadas nas frações fina e P de bagaço antes e após serem expostas ao pré-tratamento com CO_2 supercrítico, com o intuito de verificar a cristalinidade da celulose do material.

4.4.1 Cristalinidade da fração fina

Após selecionar os ensaios que apresentaram as maiores conversões em glicose, verificou-se o impacto quanto à sua cristalinidade nestes após o pré-tratamento. Os difratogramas são apresentados a seguir nas Figuras 4.23 e 4.24.

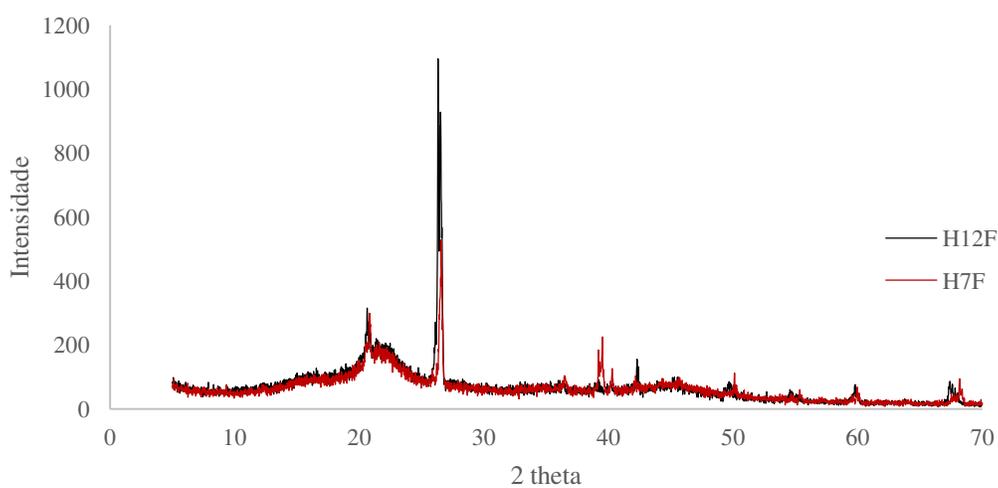


Figura 4.23 - Difratograma das amostras de fração fina sem pré-tratamento - H12F; e com pré-tratamento - H7F (Umidade = 0%; Temperatura = 60°C; Pressão = 250 bar).

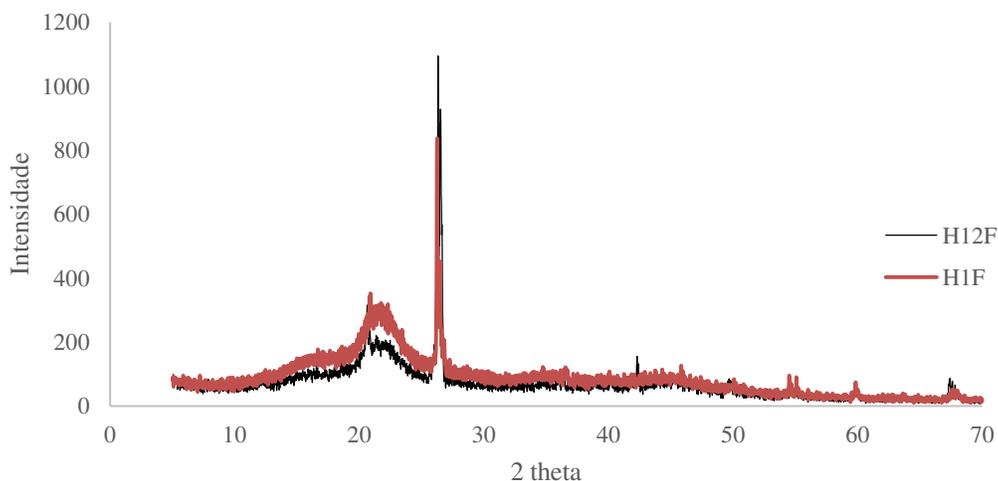


Figura 4.24 - Difratograma das amostras de fração fina sem pré-tratamento - H12F; e com pré-tratamento – H1F (Umidade = 0%; Temperatura = 40°C; Pressão = 100 bar).

Os ensaios H1F e H7F com teores de celulose de 61,43 % e 62,93 %, respectivamente, apresentaram uma redução considerável em um dos picos, com remoção de um pico devido à despressurização, aproximadamente em $2\theta=26,5$ nas Figuras 4.21 e 4.22. Para o ensaio H1F verificou-se uma intensidade de 836 na leitura da difratometria, uma diminuição de 23,65 % no pico com a maior intensidade em relação a maior intensidade para o ensaio sem pré-tratamento (H12F), enquanto, para o ensaio H7F verificou-se uma intensidade de 528 na leitura da difratometria, uma diminuição de 51,78 % no pico com a maior intensidade em relação a maior intensidade para o ensaio sem pré-tratamento (H12F), resultado próximo a 50 % encontrado por Zheng et al. (1998) para celulose pura (Avicel).

4.4.2 Cristalinidade da fração P

Os ensaios que apresentaram os maiores teores de celulose para a fração P foram os ensaios H1P (57,89 %) e H8P (58,57 %). Os difratogramas são apresentados a seguir nas Figuras 4.25 e 4.26.

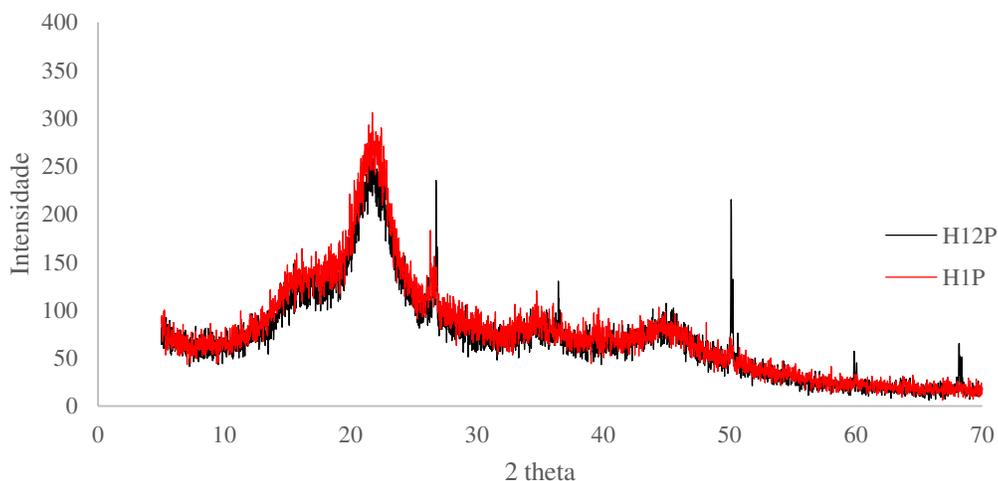


Figura 4.25 - Difratoograma das amostras de fração P sem pré-tratamento - H12P; e com pré-tratamento – H1P (Umidade = 0%; Temperatura = 40°C; Pressão = 100 bar).

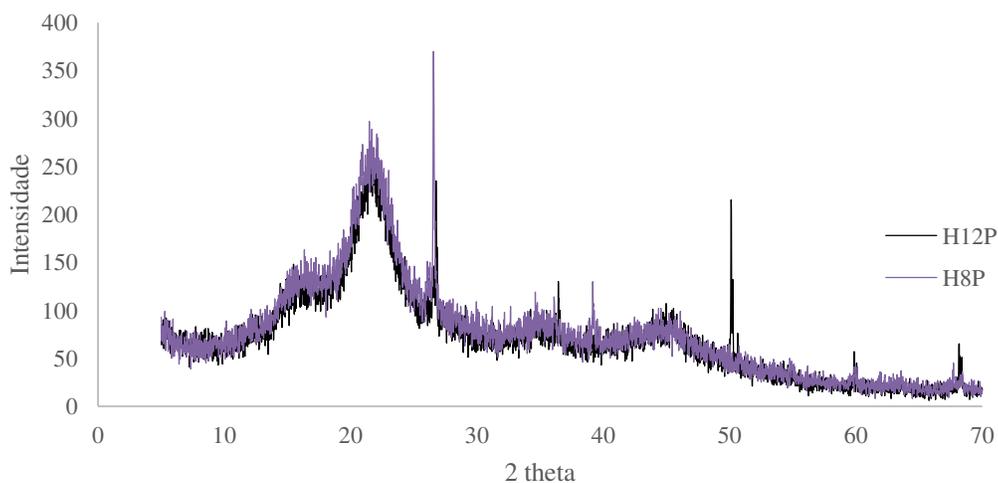


Figura 4.26 - Difratoograma das amostras de fração P sem pré-tratamento - H12P; e com pré-tratamento – H8P (Umidade = 100%; Temperatura = 60°C; Pressão = 250 bar).

Estes ensaios apresentaram um impacto diferente da fração fina. Formou-se um pico em aproximadamente $2\theta=26,5$ para o ensaio H8P (intensidade de 370), resultando em

um aumento de 57,45 % em relação ao ensaio H12P, enquanto, para o ensaio H1P verificou-se uma redução de 22,13 % em relação ao ensaio H12P.

Este aumento de 57,45 % no pico para o ensaio H8P pode ser explicado devido à hidrólise parcial pelo ácido carbônico da celulose amorfa no pré-tratamento, pois a interação entre o gás carbônico pressurizado nas condições supercríticas ao entrar em contato com a água presente na amostra produz ácido carbônico, caracterizando assim uma hidrólise ácida fraca durante o pré-tratamento.

4.4.3 Índice de cristalinidade nas frações fina e P

Outra maneira de analisar as respostas da cristalinidade é por meio do índice de cristalinidade, o qual é proposto no trabalho de Hulleman et al. (1999). O espectro de difração foi tomado utilizando o método θ - 2θ . Leituras da análise foram tiradas a 1° min^{-1} de $2\theta = 5 - 70^\circ$ com um passo de $0,02^\circ$. A cristalinidade é determinada como a porcentagem de material cristalino na biomassa e é expresso pelo índice de cristalinidade, conforme equação 4.1.

$$ICr (\%) = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] \times 100 \quad (4.1)$$

Em que:

$ICr (\%)$ = Índice de cristalinidade;

I_{002} = Intensidade de difração no pico do plano 002 cristalino;

I_{am} = Intensidade de difração no pico da região amorfa.

A seguir, nas Tabelas 4.17 e 4.18 são apresentados os índices de cristalinidade calculados nas frações fina e P nas amostras selecionadas.

Tabela 4.17 - Índice de cristalinidade da fração fina antes e após pré-tratamento.

| Amostras | Região amorfa | Região cristalina | ICr (%) |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| Fração fina¹ | 82 | 1095 | 92,51 |
| H1F | 115 | 497 | 76,86 |
| H7F | 80 | 121 | 33,88 |

¹Amostra sem pré-tratamento.

A intensidade de difração na região amorfa foi tomado em $2\theta = 25,51^\circ$ e na região cristalina em $2\theta = 26,31$. O índice de cristalinidade da celulose do ensaio H1F diminuiu 16,92 % em relação a fração fina sem pré-tratamento, enquanto, para o ensaio H7F houve uma diminuição de 63,37 % em relação ao ensaio sem pré-tratamento da fração fina.

Tabela 4.18 - Índice de cristalinidade da fração P antes e após pré-tratamento.

| Amostras | Região amorfa | Região cristalina | ICr (%) |
|-----------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|
| Fração P¹ | 107 | 235 | 54,47 |
| Pico 1 | | | |
| H1P | 109 | 145 | 24,83 |
| H8P | 88 | 370 | 76,22 |
| Fração P¹ | 53 | 215 | 75,35 |
| Pico 2 | | | |
| H1P | 52 | 70 | 25,71 |
| H8P | 35 | 46 | 23,91 |

¹Amostra sem pré-tratamento.

Apesar das frações fina e P apresentarem composições estruturais praticamente iguais, verificou-se que houve uma grande diferença nos seus respectivos índices de cristalinidade antes do pré-tratamento (92,51 % e 54,47 %). Esta diferença no índice de cristalinidade se deve a estrutura física das frações fina e P. A fração fina obtida por classificação pneumática favoreceu a concentração de fibras de bagaço, enquanto que a fração P é composta basicamente por medula do bagaço. A fração fina por ser composta de fibras exibe uma estrutura cristalina mais intensa que a fração P devido ao complexo formado pela lignina, celulose e hemicelulose ao longo das fibras.

Foram analisados dois picos da fração P. No primeiro pico do plano 002 tem-se que intensidade de difração na região amorfa foi tomado em $2\theta = 25,65^\circ$ e na região cristalina em $2\theta = 26,55^\circ$. Verificou-se para o ensaio H1P, que o índice de cristalinidade diminuiu 54,42 % em relação à fração P sem pré-tratamento, enquanto, para o ensaio H8P houve um aumento de 39,93 % no índice de cristalinidade, aumento explicado anteriormente neste mesmo tópico.

No segundo pico relevante da fração P a intensidade de difração na região amorfa foi tomado em $2\theta = 49,95^\circ$ e na região cristalina em $2\theta = 50,11^\circ$. Neste pico houve uma redução no índice de cristalinidade da fração P considerável, com uma diminuição de 65,88 % e 68,27 % para os ensaios H1P e H8P, respetivamente.

Diversos estudos mostram que os índices de cristalinidade de biomassa podem apresentar um aumento após pré-tratamento, pois parte da celulose amorfa é removida (CAO; TAN, 2002; ZHAO et al., 2007). Com a ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina pelo pré-tratamento com CO₂ supercrítico houve uma diminuição na cristalinidade das frações fina e P. Esta diminuição de acordo com Hahn-Hägerdal et al. (2006) resulta no aumento da quantidade de poros, favorecendo assim um alcance maior pelas enzimas na hidrólise enzimática e consequentemente maior conversão em glicose.

Narayanaswamy et al. (2011) verificaram que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico não alterou a estrutura cristalina da celulose para a palha de milho. No entanto Santos et al. (2011) verificaram alterações para o bagaço de cana após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

O pré-tratamento com CO₂ supercrítico indica que há uma interação mais profunda entre a celulose da biomassa e as moléculas do gás. Ao que tudo indica o pré-tratamento afeta diretamente a estrutura da celulose, podendo diminuir ou aumentar sua cristalinidade, além de romper a ligação entre a celulose, hemicelulose e a lignina.

4.5 Área superficial

Com o intuito de identificar se houve um aumento na quantidade de poros da fração fina e da fração P após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico, realizou-se a análise de área superficial ou BET (método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller). Este procedimento utiliza dados referentes à adsorção de um gás, usualmente nitrogênio, e equações provenientes do processo de adsorção identificado pelo procedimento BET que fornece como resultado a área superficial específica.

A área superficial da amostra fina anterior ao pré-tratamento foi 0,9079 m²/g. Após o pré-tratamento supercrítico a amostra com o melhor desempenho na conversão em glicose H7F teve sua área aumentada para 1,4099 m²/g, ou seja, um aumento de 55,29%. Enquanto para a fração P anterior ao pré-tratamento a área superficial específica foi de 0,9643 m²/g. Após o pré-tratamento o ensaio H8P (maior conversão em glicose) teve sua área aumentada para 1,3465 m²/g, o que corresponde a um aumento de 39,64%.

Este aumento de área superficial nas frações de bagaço é considerado baixo quando comparado a outros trabalhos. Chen et al. (2011) verificaram um aumento da área superficial do bagaço de 1 m²/g para aproximadamente 6 m²/g no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído com aquecimento por micro-ondas.

Considerando o pequeno aumento na área superficial das frações fina e P, conclui-se que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico possibilita um aumento da área superficial das amostras de bagaço pela remoção da hemicelulose e não pelo efeito da depressurização rápida. Deste modo, ao romper o complexo de hemicelulose-celulose-lignina e aumentar a área superficial das amostras, cria-se uma área de contato substancialmente maior para o ataque enzimático. Porém, este aumento não foi tão acentuado, possivelmente pelo tempo necessário para a depressurização do equipamento após o pré-tratamento.

4.6 Inibidores

O principal composto inibidor produzido a partir da glicose, relatado nos trabalhos sobre bagaço, é o hidroximetilfurfural (EWANICK; BURA, 2011). Deste modo, para avaliar a produção de HMF após as 72 horas de hidrólise enzimática utilizou-se um cromatógrafo Dionex, no qual, foram injetadas as amostras previamente diluídas. Os resultados são apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 - Concentração de HMF (g/L) após 72 horas de hidrólise enzimática.

| Ensaio | Fração fina | Fração P |
|---------------|--------------------|-----------------|
| H1 | 0,49 | 0,49 |
| H2 | 0,49 | 0,48 |
| H3 | 0,49 | 0,50 |
| H4 | 0,48 | 0,49 |
| H5 | 0,49 | 0,50 |
| H6 | 0,49 | 0,50 |
| H7 | 0,46 | 0,48 |
| H8 | 0,50 | 0,50 |
| H9 | 0,46 | 0,49 |
| H10 | 0,46 | 0,48 |
| H11 | 0,47 | 0,48 |
| H12 | 0,47 | 0,49 |

Os ensaios H12F e H12P correspondem as amostras não pré-tratadas com CO₂ supercrítico, submetidas à hidrólise enzimática. Verifica-se que as concentrações após a hidrólise enzimática foram de 0,47 g/L e 0,49 g/L, respectivamente. Ao observar os demais ensaios submetidos ao pré-tratamento com CO₂ supercrítico de acordo com o planejamento experimental apresentado anteriormente, nota-se que não houve mudanças na concentração produzida deste inibidor.

Os níveis iguais de HMF antes e após pré-tratamento indica que não houve degradação da celulose no pré-tratamento com CO₂ supercrítico. Martín et al. (2007) verificaram resultados semelhantes ao utilizar o pré-tratamento de explosão a vapor para o bagaço de cana (0,40 g/L).

Conclui-se que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico por ser um pré-tratamento essencialmente físico realizado a baixas temperaturas e condições intermediárias de pressão, possui a vantagem de provavelmente não produzir HMF que poderia prejudicar a fermentação da glicose em etanol.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico foi importante para a solubilização e remoção da hemicelulose quando comparado aos ensaios sem pré-tratamento. Com a remoção da hemicelulose, conseqüentemente houve um aumento no teor de celulose das frações fina e P após o pré-tratamento. A presença de água nas amostras de fração fina e P favoreceu a formação de ácido carbônico pela reação entre a água e o dióxido de carbono, contribuindo para a remoção da hemicelulose devido à sua hidrólise por um ácido fraco durante o pré-tratamento com CO₂ supercrítico.

Devido à alta difusividade do fluido supercrítico ocorreu a maior penetração do CO₂ supercrítico na biomassa, o que favoreceu a maior remoção pelo efeito da depressurização. Concluiu-se que para temperaturas e pressões elevadas, maiores foram as remoções de hemicelulose durante o pré-tratamento com CO₂ supercrítico, conseqüentemente maiores foram os teores de celulose nas frações fina e P.

Os melhores resultados da conversão de celulose em glicose nas frações fina e P ocorreram para diferentes tempos de hidrólise enzimática. A fração fina apresentou os melhores resultados para uma hidrólise enzimática de 24 horas, enquanto para a fração P os melhores resultados foram para 48 horas de hidrólise.

O aumento da temperatura e da pressão pouco influenciou a conversão de celulose em glicose da fração fina, verificou-se que os melhores resultados foram nas condições críticas mínimas de temperatura e pressão, enquanto, para a fração P o comportamento encontrado foi o oposto. As superfícies de resposta indicaram que não há necessidade de se elevar a temperatura e pressão da fração P, apenas aumentando uma destas variáveis é suficiente para atingir conversões maiores.

A presença de água nas amostras favoreceu os melhores resultados no teor de celulose e a conversão em glicose da fração P, ao contrário do verificado para a fração fina, no entanto ainda é necessário estudar como a presença de água na fração P afeta as conversões.

A partir das alterações estruturais em ambas as frações após o pré-tratamento de com CO₂ supercrítico foram verificados que o índice de cristalinidade da celulose diminuiu para a fração fina e aumentou para a fração P. O efeito da descompressão garantiu uma redução na cristalinidade da celulose, porção de difícil hidrólise pelas enzimas, da fração fina, porém o aumento no índice de cristalinidade da fração P pode ser explicado devido ao pré-tratamento com CO₂ supercrítico ter hidrolisado parte da celulose amorfa da fração P. Não foi possível afirmar que um índice de cristalinidade maior ou menor resultará em uma maior conversão em glicose, a conversão em glicose é muito mais complexa e depende da análise de outras variáveis e da biomassa empregada.

Além de romper o complexo formado pela celulose, hemicelulose e lignina, o efeito físico causado pela descompressão no pré-tratamento com CO₂ supercrítico juntamente da remoção da hemicelulose aumentou a quantidade de poros presentes nas frações fina e P. Este aumento na quantidade de poros foi devido ao rompimento do complexo e a solubilização e remoção da hemicelulose, o que facilitou o acesso das enzimas nas frações fina e P, aumentando a conversão em glicose pela hidrólise enzimática.

De um modo geral, o pré-tratamento nas frações fina e P foi eficiente em aumentar o teor de celulose, porém ineficiente em aumentar as conversões em glicose, pois as conversões foram baixas para a maioria dos ensaios nas condições estudadas, é necessário um estudo mais aprofundado para verificar realmente a viabilidade deste processo para obtenção de açúcares fermentescíveis.

Sugestões para trabalhos futuros

Para dar continuidade ao estudo de pré-tratamento com CO₂ supercrítico das frações de fina e P do bagaço de cana, as principais sugestões para trabalhos futuros são:

- Avaliar o extrato obtido no pré-tratamento com CO₂ supercrítico;

- Não secar completamente o bagaço de cana e as frações fina e P (pois a secagem completa pode modificar e danificar a estrutura física da amostra fechando completamente os poros);
- Determinar a diferença de massa das amostras antes e após o pré-tratamento;
- Aumentar a faixa de temperatura e pressão estudadas no pré-tratamento e otimizar estas variáveis;
- Utilização de um pré-tratamento de explosão com CO₂ supercrítico e a utilização de cossolventes polares juntamente com o CO₂ no pré-tratamento;
- Avaliar o custo energético do pré-tratamento para temperaturas e pressões elevadas para verificar a viabilidade deste pré-tratamento;
- Utilizar dois pré-tratamentos em série para verificar a eficiência deste na conversão em açúcares;
- Utilizar enzimas recombinantes, a fim de hidrolisar a hemicelulose;
- Utilizar os açúcares para fermentação em etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

ALBARELLI, J. Q. **Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica**. 2013. 216f.. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ALINIA, R.; ZABIHI, S.; ESMAEILZADEH, F. et al. Pretreatment of wheat straw by supercritical CO₂ and its enzymatic hydrolysis for sugar production. **Biosystems Engineering**, v. 107, n. 1, p. 61-66, 2010.

ALMEIDA, E. **Estudo da separação pneumática de frações de bagaço de cana e sua influência na hidrólise enzimática**. 2012. 109f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Annual book of ASTM standards, ASTM-E 1755-01 (Reapproved 2007). Section 11, v 11.06, 2008.

AZEVEDO, A. B. A. D. **Extração e recuperação dos princípios ativos do café utilizando fluidos supercríticos**. 2005. 202f.. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L. et al. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). **Química Nova**, v. 31, p. 2035-2041, 2008.

BARNABÉ, É. D. C. **Extração de pilocarpina e epiisopiloturina de jaborandi utilizando processos envolvendo solventes supercríticos**. 2008. 85f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. 2010. 90f.. Dissertação

(Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; ASTOLFI, V. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 4-5, p. 247-250, 2013a.

BENAZZI, T.; CALGAROTO, S.; DALLA ROSA, C. et al. Hydrolysis of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide to obtain fermentable sugars. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 9, p. 1766-1768, 2013b.

BERTELLI, L. G. Álcool - o melhor substituto do petróleo. **UNICA - União da Indústria da cana-de-açúcar**, 2006. Disponível em: <
<http://www.unica.com.br/convidados/39485854920337715081/alcool-o-melhor-substituto-do-petroleo/>>. Acesso em: 23 maio 2013.

BISARIA, V. S. Bioprocessing of Agro-residues to glucose and chemicals. In: MARTIN, A. M. (Ed.). **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. London: Elsevier, 1991. p.210-213.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. D.; SOUZA, A. P. D. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 7, p. 365-380.

BUTZKE, A. S. **Amostra de bagaço (fração fina)**. 1 fotografia, 2013a.

_____. **Amostra de bagaço (fração P)**. 1 fotografia, 2013b.

_____. **Equipamento de Extração Supercrítica**. 1 fotografia, 2013c.

_____. **Módulo de alimentação do solvente e/ou cossolvente**. 1 fotografia, 2013d.

_____. **Módulo de separação**. 1 fotografia, 2013e.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando o Estatística**. E-PAPERS. Rio de Janeiro: 261 p. 2003.

CAMARGO, F. A. **Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli (3-hidroxibutirato-co-valerato)/(PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar**. 2003. 115f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

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. 4754-4766, 2010.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nat Biotech**, v. 25, n. 7, p. 759-761, 07//print 2007.

CHEN, W. H.; TU, Y. J.; SHEEN, H. K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, n. 8, p. 2726-2734, 2011.

CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A. et al. **Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose**. INSTITUTE, S. E. R. Golden, Colorado: 1-64 p. 1985.

CORTEZ, L. A. B. Introdução. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 1, p. 3-16.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; AYARZA, J. A. C. Biomassa no Brasil e no mundo. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S., et al (Ed.). **Biomassa para energia**. 1. ed. Campinas: UNICAMP, v.1, 2009. cap. 1, p.15-29.

DE VRIJE, T.; DE HAAS, G.; TAN, G. B. et al. Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by Thermotoga elfii. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11-12, p. 1381-1390, 2002.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996.

DW. Deutsche Welle - Conferência do Clima prorroga Protocolo de Kyoto até 2020. **Meio Ambiente**, 2012. Disponível em: < <http://dw.de/p/16ydm> >. Acesso em: 01 março 2014.

EWANICK, S.; BURA, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2651-2658, 2011.

FAN, L. T.; LEE, Y.-H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 1, p. 177-199, 1980.

GAO, M.; XU, F.; LI, S. et al. Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, n. 4, p. 470-475, 2010.

GARCÍA-APARICIO, M. P.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A. et al. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1-3, p. 278-288, 2006.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz als Roh - und Werkstoff**, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

GHAFFAR, S. H.; FAN, M. Lignin in straw and its applications as an adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 48, n. 0, p. 92-101, 2014.

GOLDEMBERG, J. A estratégia de São Paulo para o etanol. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 3, p.19-25.

GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 246-263, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 12// 2006.

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

HAMES, B. R. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications. In: MIELENZ, J. R. (Ed.). **Biofuels**: Humana Press, v.581, 2009. cap. 11, p.145-167.

HARMSSEN, P.; HUIJGEN, W.; BERMUDEZ, L. et al. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Wageningen: Wageningen UR, Food & Biobased Research, 2010.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2008.

HISANO, H.; NANDAKUMAR, R.; WANG, Z.-Y. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 3, p. 306-313, 2009/06/01 2009.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Mechanical separation of sugarcane bagasse particles. In: Silva, M. A. (Org). **U2 - Technology: Integrated pretreatment and hydrolysis**, Fifth Report, 2011. p. 7-12. (Agreement Shell Brasil Petróleo - Unicamp).

HULLEMAN, S. H. D.; KALISVAART, M. G.; JANSSEN, F. H. P. et al. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticised, compression-moulded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, n. 4, p. 351-360, 1999.

IEA. International Energy Agency. **Key World Energy Statistics 2013**, 2013. Disponível em: < <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2013.pdf> >. Acesso em: 12 agosto 2014.

KABEL, M. A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J. et al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2034-2042, 2007.

KELLEY, S. S.; WARD, T. C.; RIALS, T. G. et al. Engineering plastics from lignin. XVII. Effect of molecular weight on polyurethane film properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 37, n. 10, p. 2961-2971, 1989.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139-144, 2001.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 583-591, 2006.

KUCHELMEISTER, C.; BAUER, S. Rapid Small-Scale Determination of Extractives in Biomass. **BioEnergy Research**, p. 1-9, 2014/07/10 2014.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LEITE, R. C. C. A estratégia brasileira para o etanol. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. cap. 2, p.17-18.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - BRASIL. **Acompanhamento da Produção Sucroalcooleira**, 2014. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia> >. Acesso em: 12 agosto 2014.

MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O. et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1767-1773, 2007.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 121f.. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MERINO, S.; CHERRY, J. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**: Springer Berlin Heidelberg, v.108, 2007. cap. 66, p.95-120.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MME. Ministério de Minas e Energia - BRASIL. **Balanco energético nacional 2014**, Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2014. Disponível em: < <https://ben.epe.gov.br/> >. Acesso em: 12 agosto 2014.

MOHAMMED, M. A. A.; SALMIATON, A.; WAN AZLINA, W. A. K. G. et al. Hydrogen rich gas from oil palm biomass as a potential source of renewable energy in Malaysia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 2, p. 1258-1270, 2011.

NADIF, A.; HUNKELER, D.; KÄUPER, P. Sulfur-free lignins from alkaline pulping tested in mortar for use as mortar additives. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 1, p. 49-55, 2002.

NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J. et al. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6995-7000, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

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

PHAN, D. T.; TAN, C. S. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 167, n. 0, p. 192-197, 2014.

PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 10, p. 1219-1222, 1984.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, A. K. e SILVA, S. S. D. (Ed.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**: InTech, 2013. cap. 6, p.119-155.

RABELO, S. C.; VAZ ROSSELL, C. E.; DE MORAES ROCHA, G. J. et al. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by steam pretreatment impregnated with hydrogen peroxide. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 5, p. 1207-1217, 2012.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 37-48, 1992/03/01 1992.

RFA. Renewable Fuels Association. **Annual Industry Outlook**, 2014. Disponível em: < <http://ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook> >. Acesso em: 12 agosto 2014.

RITTER, S. K. Calling All Chemists. **Chemical and engineering news**. v. 88, n. 33. p. 59-68, 2008. Disponível em: < <http://cen.acs.org/articles/86/i33/Calling-Chemists.html> >. Acesso em: 10/04/2013.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, A. L. F.; KAWASE, K. Y. F.; COELHO, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 277-282, 2011.

SETUA, D. K.; SHUKLA, M. K.; NIGAM, V. et al. Lignin reinforced rubber composites. **Polymer Composites**, v. 21, n. 6, p. 988-995, 2000.

SILVA, M. A.; MAUGERI, F. J.; COSTA, F. A. A. **Processo de produção de etanol a partir de hidrólise enzimática de biomassa, processo de separação da matéria-prima de hidrólise e uso de células de parênquima para obtenção de etanol**. BR. PI 1004486-8 A2 2012.

SILVA, M. A. et al. Biomass characterization and mechanical separation. In: Silva, M. A. (Org). **U2 - Technology: Integrated pretreatment and hydrolysis**, Seventh Report, 2012. p. 3-10. (Agreement Shell Brasil Petróleo - Unicamp).

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory of Analytical Procedure (LAP). **NREL/TP-510-42618**. NREL (National Renewable Energy Laboratory), 2008.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C. et al. Determination of extratives in biomass. Laboratory of Analytical Procedure (LAP). **NREL/TP-510-42619**. NREL (National Renewable Energy Laboratory), 2008.

SLUITER, J. B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C. J. et al. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043-9053, 2010/08/25 2010.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; MEDEIROS, A. B. P. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SRINIVASAN, N.; JU, L. K. Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9785-9791, 2010.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. **Biotechnology and bioengineering symposium**, n. 6, p. 35-53, 1976.

STEWART, D. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 202-207, 2008.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Review Genetics**, v. 9, n. 6, p. 433-443, 06//print 2008.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, n. 84: p. 331-339, 2004.

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

TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**. New York: John Wiley & Sons, 1996.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H.-C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 155-163, 1992.

UNICA. **Produção: Histórico de produção e moagem por safra**. UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. São Paulo, 2014. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 12 agosto 2014.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

WALTER, A.; ENSINAS, A. V. Combined production of second-generation biofuels and electricity from sugarcane residues. **Energy**, v. 35, n. 2, p. 874-879, 2010.

ZHANG, P. Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHAO, X.-B.; WANG, L.; LIU, D.-H. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 12, p. 1115-1121, 2007.

ZHENG, Y.; LIN, H. M.; TSAO, G. T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 6, p. 890-896, 1998.

ZHENG, Y.; LIN, H. M.; WEN, J. et al. Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 8, p. 845-850, 1995.

ANEXO A

Distribuição F – Tabela retirada de Calado e Montgomery (2003).

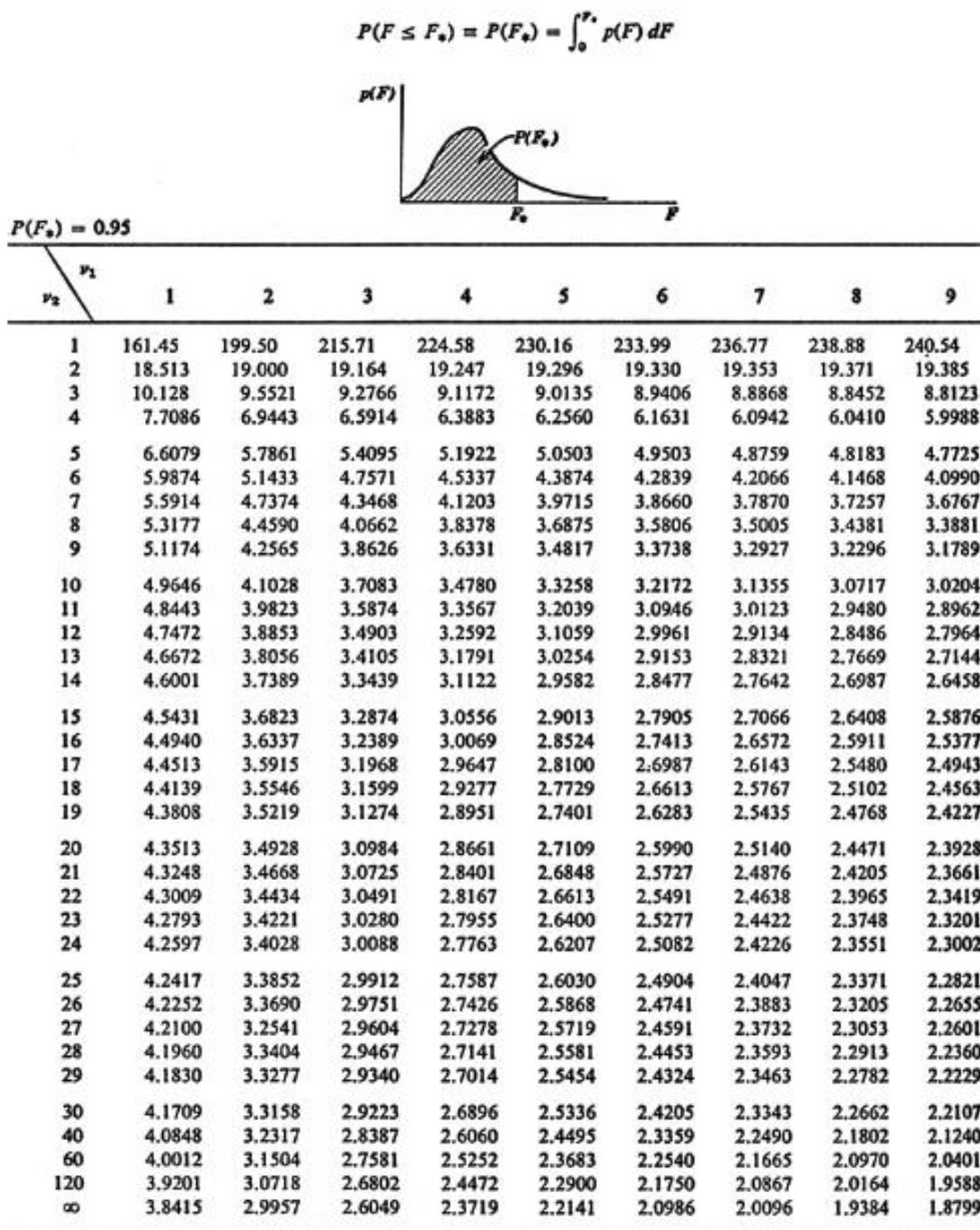


Figura A.1A – Distribuição F para $\alpha = 0,95$ (1 de 2).

| $p_2 \backslash v_1$ | 10 | 12 | 15 | 20 | 24 | 30 | 40 | 60 | 120 | ∞ |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| 1 | 241.88 | 243.91 | 245.95 | 248.01 | 249.05 | 250.09 | 251.14 | 252.20 | 253.25 | 254.32 |
| 2 | 19.396 | 19.413 | 19.429 | 19.446 | 19.454 | 19.462 | 19.471 | 19.479 | 19.487 | 19.496 |
| 3 | 8.7855 | 8.7446 | 8.7029 | 8.6602 | 8.6385 | 8.6166 | 8.5944 | 8.5720 | 8.5494 | 8.5265 |
| 4 | 5.9644 | 5.9117 | 5.8578 | 5.8025 | 5.7744 | 5.7459 | 5.7170 | 5.6878 | 5.6581 | 5.6281 |
| 5 | 4.7351 | 4.6777 | 4.6188 | 4.5581 | 4.5272 | 4.4957 | 4.4638 | 4.4314 | 4.3984 | 4.3650 |
| 6 | 4.0600 | 3.9999 | 3.9381 | 3.8742 | 3.8415 | 3.8082 | 3.7743 | 3.7398 | 3.7047 | 3.6688 |
| 7 | 3.6365 | 3.5747 | 3.5108 | 3.4445 | 3.4105 | 3.3758 | 3.3404 | 3.3043 | 3.2674 | 3.2298 |
| 8 | 3.3472 | 3.2840 | 3.2184 | 3.1503 | 3.1152 | 3.0794 | 3.0428 | 3.0053 | 2.9669 | 2.9276 |
| 9 | 3.1373 | 3.0729 | 3.0061 | 2.9365 | 2.9005 | 2.8637 | 2.8259 | 2.7872 | 2.7475 | 2.7067 |
| 10 | 2.9782 | 2.9130 | 2.8450 | 2.7740 | 2.7372 | 2.6996 | 2.6609 | 2.6211 | 2.5801 | 2.5379 |
| 11 | 2.8536 | 2.7876 | 2.7186 | 2.6464 | 2.6090 | 2.5705 | 2.5309 | 2.4901 | 2.4480 | 2.4045 |
| 12 | 2.7534 | 2.6866 | 2.6169 | 2.5436 | 2.5055 | 2.4663 | 2.4259 | 2.3842 | 2.3410 | 2.2962 |
| 13 | 2.6710 | 2.6037 | 2.5331 | 2.4589 | 2.4202 | 2.3803 | 2.3392 | 2.2966 | 2.2524 | 2.2064 |
| 14 | 2.6021 | 2.5342 | 2.4630 | 2.3879 | 2.3487 | 2.3082 | 2.2664 | 2.2230 | 2.1778 | 2.1307 |
| 15 | 2.5437 | 2.4753 | 2.4035 | 2.3275 | 2.2878 | 2.2468 | 2.2043 | 2.1601 | 2.1141 | 2.0658 |
| 16 | 2.4935 | 2.4247 | 2.3522 | 2.2756 | 2.2354 | 2.1938 | 2.1507 | 2.1058 | 2.0589 | 2.0096 |
| 17 | 2.4499 | 2.3807 | 2.3077 | 2.2304 | 2.1898 | 2.1477 | 2.1040 | 2.0584 | 2.0107 | 1.9604 |
| 18 | 2.4117 | 2.3421 | 2.2686 | 2.1906 | 2.1497 | 2.1071 | 2.0629 | 2.0166 | 1.9681 | 1.9168 |
| 19 | 2.3779 | 2.3080 | 2.2341 | 2.1555 | 2.1141 | 2.0712 | 2.0264 | 1.9796 | 1.9302 | 1.8780 |
| 20 | 2.3479 | 2.2776 | 2.2033 | 2.1242 | 2.0825 | 2.0391 | 1.9938 | 1.9464 | 1.8963 | 1.8432 |
| 21 | 2.3210 | 2.2504 | 2.1757 | 2.0960 | 2.0540 | 2.0102 | 1.9645 | 1.9165 | 1.8657 | 1.8117 |
| 22 | 2.2967 | 2.2258 | 2.1508 | 2.0707 | 2.0283 | 1.9842 | 1.9380 | 1.8895 | 1.8380 | 1.7831 |
| 23 | 2.2747 | 2.2036 | 2.1282 | 2.0476 | 2.0050 | 1.9605 | 1.9139 | 1.8649 | 1.8128 | 1.7570 |
| 24 | 2.2547 | 2.1834 | 2.1077 | 2.0267 | 1.9838 | 1.9390 | 1.8920 | 1.8424 | 1.7897 | 1.7331 |
| 25 | 2.2365 | 2.1649 | 2.0889 | 2.0075 | 1.9643 | 1.9192 | 1.8718 | 1.8217 | 1.7684 | 1.7110 |
| 26 | 2.2197 | 2.1479 | 2.0716 | 1.9898 | 1.9464 | 1.9010 | 1.8533 | 1.8027 | 1.7488 | 1.6906 |
| 27 | 2.2043 | 2.1323 | 2.0558 | 1.9736 | 1.9299 | 1.8842 | 1.8361 | 1.7851 | 1.7307 | 1.6717 |
| 28 | 2.1900 | 2.1179 | 2.0411 | 1.9586 | 1.9147 | 1.8687 | 1.8203 | 1.7689 | 1.7138 | 1.6541 |
| 29 | 2.1768 | 2.1045 | 2.0275 | 1.9446 | 1.9005 | 1.8543 | 1.8055 | 1.7537 | 1.6981 | 1.6377 |
| 30 | 2.1646 | 2.0921 | 2.0148 | 1.9317 | 1.8874 | 1.8409 | 1.7918 | 1.7396 | 1.6835 | 1.6223 |
| 40 | 2.0772 | 2.0035 | 1.9245 | 1.8389 | 1.7929 | 1.7444 | 1.6928 | 1.6373 | 1.5766 | 1.5089 |
| 60 | 1.9926 | 1.9174 | 1.8364 | 1.7480 | 1.7001 | 1.6491 | 1.5943 | 1.5343 | 1.4673 | 1.3893 |
| 120 | 1.9105 | 1.8337 | 1.7505 | 1.6587 | 1.6084 | 1.5543 | 1.4952 | 1.4290 | 1.3519 | 1.2539 |
| ∞ | 1.8307 | 1.7522 | 1.6664 | 1.5705 | 1.5173 | 1.4591 | 1.3940 | 1.3180 | 1.2214 | 1.0000 |

Figura A.2A – Distribuição F para $\alpha = 0,95$ (2 de 2).

APÊNDICE A

Tabelas e gráficos com os resultados da concentração de açúcares redutores totais.

Tabela A1 – Concentração de ART da fração fina após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Concentração de ART (g/L) | | | | | |
| H1F | 5,10 | 6,89 | 8,94 | 10,17 | 11,97 | 12,12 |
| H2F | 4,94 | 6,33 | 6,55 | 8,62 | 7,72 | 10,13 |
| H3F | 4,94 | 6,90 | 8,07 | 9,43 | 10,84 | 10,71 |
| H4F | 5,26 | 6,92 | 7,23 | 9,71 | 7,41 | 10,38 |
| H5F | 4,99 | 4,69 | 9,31 | 10,00 | 10,71 | 11,11 |
| H6F | 4,02 | 4,27 | 5,69 | 6,47 | 7,25 | 7,49 |
| H7F | 4,63 | 4,64 | 9,11 | 9,28 | 12,14 | 12,19 |
| H8F | 4,56 | 5,26 | 6,15 | 6,93 | 7,93 | 8,73 |
| H9F | 4,15 | 4,31 | 8,18 | 8,96 | 9,70 | 9,82 |
| H10F | 6,69 | 4,26 | 8,19 | 8,72 | 10,07 | 10,79 |
| H11F | 6,47 | 4,19 | 7,40 | 8,24 | 8,92 | 9,78 |
| H12F | 6,90 | 4,60 | 7,99 | 9,04 | 7,24 | 9,29 |

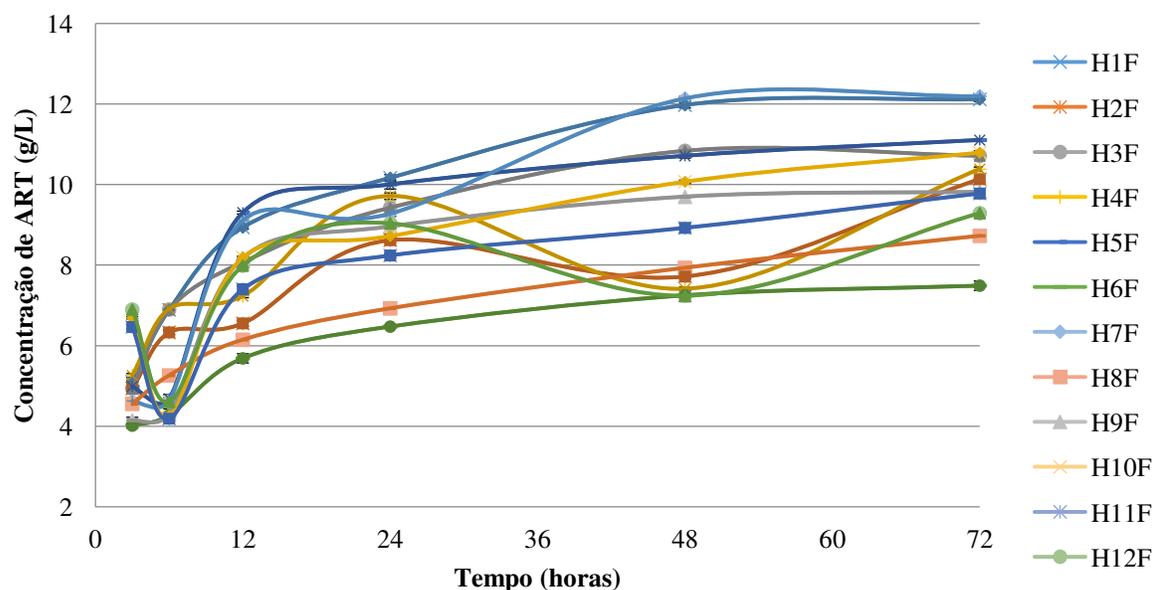


Figura A1 - Curva de concentração de ART versus tempo da fração fina.

Tabela A2 – Concentração de ART da fração P após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Concentração de ART (g/L) | | | | | |
| H1P | 6,71 | 7,28 | 9,02 | 9,40 | 10,54 | 11,96 |
| H2P | 4,43 | 4,82 | 6,09 | 6,98 | 5,27 | 8,20 |
| H3P | 6,80 | 7,96 | 8,72 | 9,36 | 10,82 | 11,10 |
| H4P | 6,87 | 7,90 | 8,83 | 10,21 | 10,50 | 8,99 |
| H5P | 6,33 | 7,55 | 8,64 | 8,11 | 7,46 | 11,34 |
| H6P | 6,63 | 7,35 | 8,88 | 9,38 | 9,39 | 9,71 |
| H7P | 6,54 | 6,91 | 8,85 | 9,37 | 10,16 | 10,61 |
| H8P | 6,42 | 7,36 | 8,60 | 8,78 | 8,40 | 10,86 |
| H9P | 5,03 | 5,68 | 6,70 | 7,83 | 8,74 | 8,04 |
| H10P | 4,89 | 5,30 | 6,52 | 7,22 | 8,92 | 7,95 |
| H11P | 5,00 | 5,51 | 6,59 | 7,57 | 8,91 | 7,95 |
| H12P | 7,49 | 7,98 | 8,26 | 10,40 | 10,40 | 7,62 |

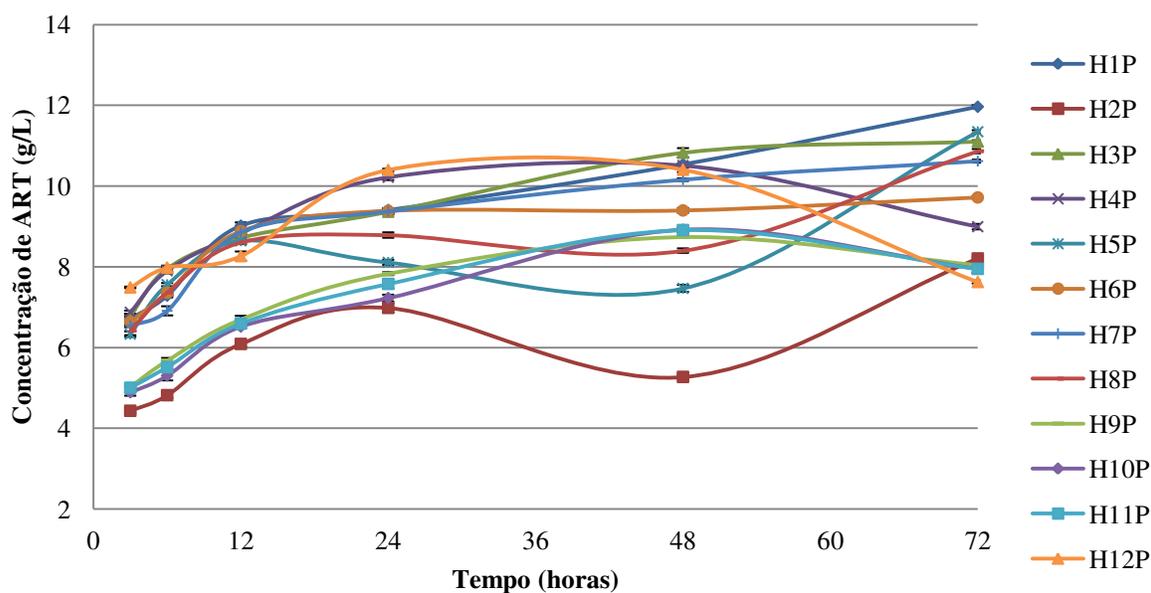


Figura A2 - Curva de concentração de ART versus tempo da fração P.

Tabelas com os resultados da concentração de glicose e conversão da celulose em glicose.

Tabela A3 – Concentração de glicose da fração fina após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Concentração de glicose (g/L) | | | | | |
| H1F | 3,85 | 5,06 | 6,48 | 7,69 | 8,21 | 7,35 |
| H2F | 3,66 | 4,34 | 5,80 | 5,30 | 5,74 | 7,41 |
| H3F | 4,36 | 4,77 | 5,72 | 7,27 | 6,77 | 7,10 |
| H4F | 3,98 | 4,27 | 5,41 | 5,48 | 5,43 | 7,15 |
| H5F | 4,89 | 4,89 | 6,14 | 6,70 | 6,96 | 7,41 |
| H6F | 3,39 | 3,08 | 4,66 | 4,77 | 5,89 | 5,99 |
| H7F | 4,65 | 5,49 | 6,51 | 6,81 | 6,73 | 7,82 |
| H8F | 3,62 | 3,56 | 4,36 | 5,03 | 6,76 | 6,62 |
| H9F | 4,15 | 4,72 | 5,51 | 6,23 | 6,18 | 6,68 |
| H10F | 4,42 | 4,81 | 5,96 | 6,41 | 7,26 | 6,30 |
| H11F | 3,45 | 4,01 | 6,07 | 5,85 | 5,98 | 6,12 |
| H12F | 4,95 | 4,62 | 6,17 | 6,56 | 4,79 | 5,82 |

Tabela A4 – Concentração de glicose da fração P após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Concentração de glicose (g/L) | | | | | |
| H1P | 4,58 | 5,26 | 6,05 | 6,24 | 6,50 | 6,70 |
| H2P | 3,79 | 4,22 | 4,60 | 5,21 | 4,44 | 5,98 |
| H3P | 4,92 | 5,52 | 5,76 | 6,12 | 7,22 | 6,70 |
| H4P | 4,71 | 4,96 | 5,92 | 6,75 | 8,16 | 6,19 |
| H5P | 4,56 | 4,53 | 5,93 | 5,26 | 4,90 | 6,87 |
| H6P | 4,75 | 4,72 | 6,01 | 6,51 | 7,65 | 6,55 |
| H7P | 4,95 | 5,52 | 6,05 | 6,12 | 6,87 | 4,24 |
| H8P | 5,02 | 4,98 | 6,33 | 6,58 | 6,10 | 7,78 |
| H9P | 3,72 | 4,38 | 4,57 | 5,25 | 6,33 | 5,66 |
| H10P | 3,73 | 4,12 | 5,15 | 5,21 | 6,50 | 5,36 |
| H11P | 3,86 | 4,26 | 4,91 | 5,57 | 6,65 | 5,60 |
| H12P | 5,19 | 4,26 | 5,98 | 6,69 | 7,00 | 5,80 |

Tabela A5 – Conversão em glicose da fração fina após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|---------------|--|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Conversão em glicose (%) | | | | | |
| H1F | 26,27 | 34,56 | 44,29 | 52,49 | 56,10 | 50,22 |
| H2F | 24,97 | 29,63 | 39,64 | 36,17 | 39,22 | 50,61 |
| H3F | 29,80 | 32,59 | 39,10 | 49,64 | 46,25 | 48,49 |
| H4F | 27,17 | 29,17 | 36,98 | 37,46 | 37,10 | 48,83 |
| H5F | 33,39 | 33,41 | 41,93 | 45,78 | 47,56 | 50,61 |
| H6F | 23,17 | 21,02 | 31,78 | 32,61 | 40,22 | 40,93 |
| H7F | 31,78 | 37,51 | 44,47 | 46,54 | 45,95 | 53,42 |
| H8F | 24,75 | 24,34 | 29,78 | 34,34 | 46,17 | 45,25 |
| H9F | 28,32 | 32,22 | 37,63 | 42,56 | 42,22 | 45,66 |
| H10F | 30,17 | 32,88 | 40,71 | 43,76 | 49,59 | 43,05 |
| H11F | 23,56 | 27,39 | 41,44 | 39,98 | 40,85 | 41,78 |
| H12F | 33,80 | 31,58 | 42,15 | 45,05 | 32,68 | 39,76 |

Tabela A6 – Conversão em glicose da fração P após hidrólise enzimática.

| Ensaio | Tempo de hidrólise enzimática (h) | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 3 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 |
| | Conversão em glicose (%) | | | | | |
| H1P | 35,00 | 40,24 | 46,25 | 47,72 | 49,69 | 53,51 |
| H2P | 28,99 | 32,24 | 35,16 | 39,83 | 33,93 | 45,76 |
| H3P | 37,62 | 42,23 | 43,98 | 46,79 | 55,18 | 51,24 |
| H4P | 36,01 | 37,89 | 45,24 | 51,60 | 62,38 | 47,31 |
| H5P | 34,89 | 34,64 | 45,35 | 40,19 | 37,43 | 52,55 |
| H6P | 36,28 | 36,06 | 45,95 | 49,74 | 58,45 | 50,07 |
| H7P | 37,87 | 42,23 | 46,25 | 46,82 | 52,55 | 32,40 |
| H8P | 38,36 | 38,11 | 48,38 | 50,32 | 46,63 | 59,46 |
| H9P | 28,42 | 33,52 | 34,94 | 40,10 | 48,38 | 43,24 |
| H10P | 28,53 | 31,50 | 39,34 | 39,86 | 49,66 | 41,01 |
| H11P | 29,51 | 32,57 | 37,51 | 42,59 | 50,81 | 42,83 |
| H12P | 39,67 | 32,54 | 45,70 | 51,16 | 53,54 | 44,31 |