

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

**OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO ALCALINO A ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS
PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR.**

Autora: Christiane Curiel dos Santos de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

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

Campinas – São Paulo
Fevereiro de 2012

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

Oliveira, Christiane Curiel dos Santos de
OL4o Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio
alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise
enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. / Christiane Curiel
dos Santos de Oliveira. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Pré-tratamento. 2. Bagaço de cana. 3. Hidrólise
enzimática. 4. Planejamento de experimentos. I. Costa, Aline
Carvalho da. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Optimization of the pre-treatment with alkaline hydrogen
peroxide at high solids concentration for the enzymatic
hydrolysis of sugarcane bagasse

Palavras-chave em Inglês: Pretreatment, Sugarcane bagasse, Enzymatic hydrolysis,
Experimental design

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo, Vera Lúcia Reis de Gouveia

Data da defesa: 09-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Christiane Curiel dos Santos de Oliveira e aprovada em 9 de Fevereiro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa



Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo



Dra. Vera Lúcia Reis de Gouveia

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Christiane Curiel dos Santos de Oliveira.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
(Orientadora)

“Agrada-te do Senhor, e Ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nEle e o mais Ele fará” (Sl 37:4,5)

Agradecimentos

A Deus em primeiro lugar, pelo amor tão incondicional, a companhia sempre constante e a plena fidelidade.

Aos meus pais João Sinésio e Claudete, por serem sido exemplos tão maravilhosos mesmo na ausência física. Eternas saudades.

Ao meu único e excelente irmão Giovanni, pelo apoio e amor sempre especiais que fizeram toda a diferença no meu caminhar.

Ao marido mais especial do mundo, Carlos Henrique, pela companhia sempre carinhosa e pelo apoio físico, psicológico e espiritual.

À Maria Célia, carinhosamente tia Célia, que sempre me estendeu a mão e o abriu o seu coração para que pudesse me abrigar em épocas de tormentas da vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, pela orientação, confiança, paciência e entusiasmo durante todo o trabalho e imensa colaboração na elaboração dessa dissertação.

Às colegas de laboratório Luiza e Olga, que dividiram comigo alegrias e tristezas no caminho para obtenção de resultados. À Sarita, pela paciência com as inacabáveis dúvidas. São pessoas que se tornaram amigas, e por quem tenho grande estima e respeito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

RESUMO

No presente trabalho o desempenho do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com alta concentração de sólidos utilizando peróxido de hidrogênio alcalino foi avaliado. O objetivo foi aumentar a concentração de sólidos no pré-tratamento em relação a trabalhos anteriores (RABELO, 2007; GARCIA, 2009). Inicialmente um planejamento fatorial 2^3 foi realizado para avaliar a influência da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino (% v/v) no pré-tratamento, assim como da concentração de celulase (FPU/g bagaço) usada na hidrólise, na concentração de glicose obtida após a hidrólise enzimática. Este planejamento resultou em um modelo linear, que foi usado para determinar o caminho de máxima inclinação, seguindo o procedimento descrito por BARROS NETO et al. (2001). Novos experimentos foram realizados, determinando-se a vizinhança do ponto ótimo e, finalmente, um planejamento em estrela foi realizado em torno desta região, determinando-se as condições de pré-tratamento que resultam em concentração máxima de glicose após hidrólise (0,4014 g glicose/ g de bagaço bruto) quando o pré-tratamento foi realizado com 15% de sólidos e a hidrólise com 3% de sólidos. Este valor corresponde ao rendimento de 95,38% em glicose, obtido realizando-se o pré-tratamento por 1 hora, a 65°C e concentração de peróxido de 8% v/v em pH de 11,5 e a etapa de hidrólise com concentração de celulase de 15 FPU/g e de β -glicosidase de 25 CBU/g. Concentração de glicose de $0,3846 \pm 0,0014$ g glicose/ g de bagaço bruto, correspondente a rendimento de $90,87 \pm 0,33\%$ em glicose, foi obtida realizando-se o pré-tratamento a 55°C e com 7% v/v de peróxido de hidrogênio alcalino, na mesma concentração de sólidos e tempo de pré-tratamento e considerando as mesmas condições de hidrólise. Esta concentração de peróxido corresponde a 0.47 mL de peróxido/ g de bagaço ou 0.69 g de peróxido/g bagaço, concentração bastante menor do que a usada nos trabalhos anteriores, que era superior a 2g de peróxido/g bagaço.

Palavras-chave: pré-tratamento, bagaço de cana, hidrólise enzimática, planejamento de experimentos

ABSTRACT

In this work the performance of the pretreatment of sugarcane bagasse with high solids concentration using alkaline hydrogen peroxide was evaluated. The objective was to increase the solids concentration in the pretreatment in relation to previous work (RABELO, 2007; GARCIA, 2009). Initially, a 2^3 factorial design was performed to evaluate the influence of temperature ($^{\circ}\text{C}$) and alkaline hydrogen peroxide concentration (% v / v) in the pretreatment, as well as of the cellulase concentration (FPU / g pulp) used in the hydrolysis, in the concentration of glucose obtained after enzymatic hydrolysis. This design resulted in a linear model that was used to determine the maximum slope direction by following the procedure described in BARROS NETO et al. (2001). Further experiments were performed to identify the optimal region and, finally, a central composite design was performed around this region to determine the pretreatment conditions that result in maximum concentration of glucose after hydrolysis (0.4014 g glucose / g of raw bagasse) when the pre-treatment was conducted at 15% solids and the hydrolysis with 3% solids. This corresponds to a 95.38% glucose yield, obtained by performing pretreatment for 1 hour at 65 $^{\circ}\text{C}$ using 8% (v/v) of hydrogen peroxide at pH 11.5. Hydrolysis was conducted using 15 FPU cellulase/g bagasse and 25 CBU β -glucosidase/g bagasse. Glucose concentration of 0.3846 ± 0.0014 g glucose/g of raw bagasse, corresponding to a $90.87 \pm 0.33\%$ glucose yield, was obtained by performing pretreatment at 55 $^{\circ}\text{C}$ with 7% v/v of alkaline hydrogen peroxide at the same concentration of solids and pre-treatment time and considering the same hydrolysis conditions. This concentration corresponds to 0.47 mL peroxide/g bagasse or 0.69 g peroxide/g bagasse, much lower than the concentrations used in previous studies, that were higher than 2 g peroxide/g bagasse.

Keywords: pretreatment, sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, experimental design

Sumário

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	3
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	3
CAPÍTULO 2	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Cana-de-açúcar	4
2.2 Bagaço da cana-de-açúcar.....	6
2.3 Materiais Lignocelulósicos	7
2.3.1 Celulose.....	9
2.3.2 Hemicelulose.....	13
2.3.4 Lignina.....	13
2.3.5 Extrativos.....	15
2.4 Pré-tratamento	16
2.4.1 Pré-tratamento Físico.....	18
2.4.2 Pré-tratamento Biológico	20
2.4.3 Pré-tratamento Químico	20
2.4.4 Pré-tratamento Combinado (físico-químico)	21

2.5 Hidrólise	24
2.5.1. Enzimas celulase.....	27
2.5.5.1 Endoglicanases (EGs)	27
2.5.1.2. Celobiohidrolases (CBHs).....	28
2.5.1.3. β -glicosidases (BGs)	28
CAPÍTULO 3	30
METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	30
3.1 Materiais e Reagentes.....	30
3.2 Equipamentos.....	31
3.3. Matéria-prima	32
3.3.1. Armazenagem do Bagaço da cana	32
3.3.2. Enzimas.....	32
3.4. Caracterização Química do Bagaço de Cana de açúcar.....	32
3.4.1 Teor de umidade.....	33
3.4.2 Teor de cinzas	33
3.4.3 Determinação de Extrativos	34
3.4.4 Determinação de Carboidratos, Lignina Solúvel e Insolúvel	35
3.4.4.1 Hidrólise Ácida	35
3.4.4.2 Determinação de Lignina Klason (lignina insolúvel).....	36
3.4.4.3 Determinação de Lignina Solúvel	37
3.4.4.4 Determinação de Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.5 Determinação de Atividade Enzimática	39
3.5.1 Preparo da solução tampão.....	39
3.6 Determinação da atividade da enzima celulase	39

3.6.1 Determinação da atividade da enzima β -glicosidase	41
3.7 Reação de pré-tratamento.....	42
3.8 Hidrólise do bagaço pré-tratado	42
CAPÍTULO 4	44
RESULTADO E DISCUSSÕES	44
4.1 Análise de Composição Química do Bagaço de Cana de Açúcar	44
4.2 Planejamento fatorial 2^3 das condições de pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio.....	45
4.3 Experimento de máxima inclinação.....	51
4.4 Experimento com planejamento estrela	53
CAPÍTULO 5	66
CONCLUSÕES.....	66
Sugestões de trabalhos futuros	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICE A	79
APÊNDICE B.....	80
APÊNDICE C.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Representação da cana-de-açúcar (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011)	5
Figura 2.2 Bagaço da cana-de-açúcar (LENÇO, 2010).	7
Figura 2.3 Modelo da estrutura da parede celular (GOODWIN E MERCER, 1974).	8
Figura 2.4 Modelo da estrutura da parede celular e relação da lignina, hemicelulose e celulose na parede secundária (CANILHA et al, 2010).	9
Figura 2.5 Modelo da estrutura da microfibrila da celulose, a partir das cadeias de glucanos (adaptado de TAIZ E ZEIGER, 2009).	11
Figura 2.6 Ligações inter e intramolecular dentro das cadeias de celulose (adaptado de TAIZ E ZEIGER, 2009).	12
Figura 2.7 Moléculas de Celulose (β -glucopirranose) e Amilose (α -glucopirranose).	12
Figura 2.8 Precursores da biossíntese da lignina (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WENEGER, 1989)	15
Figura 2.9 Proposta para da estrutura química da lignina da palha de trigo (SUN et al, 1997)	15
Figura 2.10 Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 2006 e BALLAT, 2011).	17
Figura 2.11 Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs e BG de <i>Trichoderma reesei</i> . R= grupos terminais redutores, NR= grupos terminais não-redutores. CBH I e II: exoglicanases, EG: endoglicanases. (TEERI, 1997).	29
Figura 4. 1 Gráfico de Pareto, para as condições de trabalho citadas, com intervalo de confiança de 90%.	48
Figura 4.2 Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/g bagaço bruto) em função da temperatura (°C) e concentração de peróxido (% v/v) no pré-tratamento.	50
Figuras 4. 3: Perfis de hidrólise dos ensaios do planejamento estrela.	59
Figura 4. 4 Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores na concentração de glicose em g glicose/g bagaço bruto considerando nível de confiança de 90%. Efeito padronizado (efeito dividido pelo erro padrão).	60

Figura 4.5 - Superfície de resposta da concentração de glicose (g/g bagaço bruto) em função da temperatura (°C e da concentração de peróxido (%v/v).....61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Composição da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) e dos sólidos do caldo (CLARKE e GODSHALL, 1988).	6
Tabela 2. 2 - Vantagens e desvantagens de diversos tipos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos (adaptado de BALAT, 2011).	23
Tabela 2.3 - Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise para análise da eficiência de conversão(HAMELINCK et al, 2005).	26
Tabela 4. 1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar	44
Tabela 4. 2 - Matriz de planejamento 2^3 com três pontos centrais para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e tempo reacional de 60 minutos, e suas respectivas respostas.	46
Tabela 4. 3 - Matriz de planejamento 2^3 com três pontos centrais para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e tempo reacional de 90 minutos, e suas respectivas respostas.	46
Tabela 4. 4 - Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento 2^3 + pontos centrais, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g) produzida. Os efeitos significativos a 90% de confiança são marcados com asterisco.	48
Tabela 4. 5 - Análise da Variância para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.....	49
Tabela 4. 6 - Valores de coeficiente de regressão para o modelo utilizado.....	49
Tabela 4. 7 - Matriz de planejamento para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, com hidrólise de bagaço pré-tratado seco.	52
Tabela 4. 8 - Matriz de planejamento para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, com hidrólise de bagaço pré-tratado úmido	52
Tabela 4. 9 - Matriz de planejamento estrela para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.	54
Tabela 4. 10 - Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento estrela, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g bagaço bruto) produzida. Todos os efeitos são significativos a 90% de confiança	59
Tabela 4. 11 - Análise da Variância para o modelo de concentração de glicose em g glicose/g bagaço bruto.	60
Tabela 4. 12 - Balanço de massa para os ensaios 1, 2, 3 e 4 do planejamento estrela.	62
Tabela 4. 13 - Balanço de massa para os ensaios 5A, 5B e 5C do ponto central, do planejamento estrela.	62

Tabela 4. 14 - Balanço de massa para os ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento estrela.	62
Tabela 4. 15 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 1, 2, 3 e 4 do planejamento estrela.....	63
Tabela 4. 16 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 5A, 5B e 5C (pontos centrais) do planejamento estrela.....	63
Tabela 4. 17 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento estrela.....	63
Tabela 4. 18 Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 1, 2, 3 e 4 da matriz de planejamento.	64
Tabela 4. 19 - Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 5A, 5B e 5C (pontos centrais) da matriz de planejamento.	64
Tabela 4. 20 - Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 6, 7, 8 e 9 da matriz de planejamento.	64
Tabela A. 1: Dados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 para o tempo de 60 minutos.....	79
Tabela A. 2: Dados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 para o tempo de 90 minutos.....	79
Tabela B. 1: Dados obtidos para Concentração de glicose (g/L) e rendimento do pré-tratamento para o Planejamento estrela	80
Tabela C.2: Tabela comparativa entre os melhores resultados dos trabalhos anteriores e o presente trabalho.....	81

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Atualmente, o petróleo é uma das mais importantes fontes de energia do mundo. Cerca de 80% da energia primária produzida no mundo são provenientes de combustíveis fósseis, dos quais 58% só no setor de transportes (ESCOBAR et al, 2009). A expansão do seu consumo foi causada principalmente pela popularização dos automóveis produzidos em série e da industrialização (AGARWAL, 2007).

O petróleo é proveniente de limitadas reservas fósseis. A dependência da importação de petróleo bruto leva países que não detém essas reservas ficarem sujeitos a enfrentar crise cambial e de energia (AGARWAL, 2007). A variação do preço do barril no mercado internacional é capaz de provocar crises econômicas de grandes proporções. O aumento do preço do barril é proveniente, principalmente, da produção e da crescente pressão sobre a demanda exercida principalmente pelos países emergentes (CGEE, 2009)

A Crise do Petróleo na década de 70, motivada por disputas políticas e econômicas que elevaram o preço do barril a US\$ 80,00, estimularam a produção de biocombustíveis para uso no setor de transportes em escala significativa (NIGAM E SINGH, 2011; GOLDENSTEIN E AZEVEDO, 2006).

Em termos de bioenergia, no entanto, o maior crescimento nas pesquisas nos últimos anos tem sido na área de produção de biocombustíveis líquidos para transporte, principalmente biodiesel e bioetanol (AGARWAL, 2007).

O etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar, o que permite que além da sacarose da cana-de-açúcar, também possa ser empregado o bagaço de cana. A utilização do bagaço tem como principal vantagem aumentar a produção de etanol sem aumentar a área plantada.

O Brasil possui cerca de 9.000.000 ha de área plantada com cana-de-açúcar em 2010, e colheita de 719.156.742 toneladas (fonte: IBGE, 2010). Pelo clima ideal do Brasil e pela vasta área plantada, o país possui grande disponibilidade de matéria-prima para produção a baixo custo, o que torna viável o desenvolvimento de tecnologias para aprimorar processos produtivos. te da produção das próprias indústrias, já estando disponível no local.

Combustíveis líquidos ou gasosos produzidos a partir de biomassa são chamados de “biocombustíveis” (FAO, 2008). Os combustíveis produzidos a partir de resíduos de culturas agrícolas são chamados de “combustíveis de segunda geração” (NIGAM E SINGH, 2011).

O uso de biocombustíveis é associado com baixa emissão de gases do efeito estufa, além de serem produzidos a partir de fontes renováveis de energia, tornando-os uma opção atrativa para combater as mudanças climáticas (LUO et al, 2009). É relatado que o bioetanol tem o potencial de reduzir a emissão de gases do efeito estufa em 86% (WANG et al, 2007).

A biomassa celulósica é resistente a ser quebrada em açúcares fermentescíveis devido, principalmente, à resistência natural originada pela presença da lignina e pela cristalinidade da celulose. Conversão de celulose em etanol envolve basicamente a quebra da celulose e hemicelulose em açúcares menores para que, posteriormente, estes açúcares sejam fermentados para se obter etanol. A quebra das moléculas envolve etapas de pré-tratamento, onde a resistência natural da biomassa é reduzida, permitindo assim a realização da hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática.

A conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis é um desafio técnico, pois o processo deve ser eficiente e com custo viável. A falta de viabilidade comercial dos processos de produção de etanol de segunda geração tem inibido sua produção de forma significativa.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é otimizar a etapa de pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar usando peróxido de hidrogênio alcalino. Os trabalhos de RABELO (2007), GARCIA (2009) e RABELO (2010) avaliaram este pré-tratamento, que se mostrou muito eficaz. No presente trabalho será realizada a otimização das condições de pré-tratamento para se trabalhar com concentração de 15% (p/v) de bagaço no pré-tratamento, mais alta do que a usada em trabalhos anteriores, tentando diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio usada por grama de bagaço.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Para melhor entendimento do trabalho apresentado a seguir, sua estrutura foi dividida em 5 capítulos. O Capítulo 1 “Introdução” apresenta os objetivos e estrutura do presente trabalho. No Capítulo 2 “Revisão Bibliográfica”, os principais conceitos referentes à pesquisa são apresentados, como exemplo, cana-de-açúcar, bagaço, e suas respectivas composições. Trata também dos tipos de pré-tratamentos atuais mais utilizados, enfatizando o peróxido de hidrogênio. A hidrólise e suas características também são abordadas neste capítulo.

No Capítulo 3 “Metodologia Experimental”, a parte experimental tem sua descrição detalhada. Expõe todas as características dos procedimentos utilizados para obtenção dos resultados posteriormente analisados.

O Capítulo 4 “Resultados e Discussões” apresenta todos os resultados obtidos e suas análises, além das análises estatísticas e suas observações pertinentes.

Já no Capítulo 5 “Conclusões” está presente a conclusão do trabalho, além de sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana de açúcar é um exemplar do gênero *Saccharum* (LEME e BORGES, 1985); pertencente à família das gramíneas, com mais de 5.000 espécies de plantas. É originária da Índia, e foi introduzida no Brasil na época colonial. A estrutura física da cana-de-açúcar é composta basicamente por córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. A presença de fibras altamente lignificadas no córtex confere a este o papel de proteção e sustentação da planta, conferindo a característica da espessura da parede celular, a rigidez e o comprimento das fibras. A parte interna está dividida em: tecido parenquimatoso, o qual é caracterizado por um tecido não fibroso com a função de armazenar o suco adocicado produzido pela planta; e as hastes fibrovasculares, que estão mergulhadas no tecido parenquimatoso, atuando no sistema de condução e sustentação dos alimentos e outros produtos ao longo da planta (PARTURAU, 1989).

A cana de açúcar é composta por parte subterrânea e aérea. A parte subterrânea é representada pelos rizomas e raízes. Já a aérea é representada pelos colmos, folhas e flores. Os colmos, caracterizados por nós bem marcados e entrenós distintos, quase sempre fistulosos, são espessos e repletos de suco açucarado.

Os colmos são caracterizados por possuir uma casca dura envolvida por cera (chamada de epiderme) e coberta por um tecido mais macio (chamado de parênquima), sendo intercalada com fibras (feixes vasculares). A camada de cera previne desidratação por evaporação e as fibras promovem rigidez e força. A figura 2.1 mostra o colmo de cana-de-açúcar.



Figura 2.1 Representação da cana-de-açúcar (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011)

A composição da cana-de-açúcar é variável entre as linhagens, mas mantém regularidade quantitativa e qualitativamente. Essa composição é determinada por fatores internos e externos, incluindo variedade, idade da cana, condições de crescimento da planta, tipo de solo, fertilizantes, água, pestes e doenças que a atingiram (CASTAÑEDA AYARZA, 2007). A maioria das variedades da *Saccharum officinarum* contém mais água e relativamente menos fibra e sacarose em relação às outras espécies do gênero *Saccharum* (Tabela 2.1) (CLARKE e GODSHALL, 1988).

Os dois principais açúcares da cana-de-açúcar são a celulose e a sacarose, presentes na fibra e no caldo, respectivamente. A sacarose é um dissacarídeo, composto pelos monossacarídeos frutose e glicose (CLARKE e GODSHALL, 1988). A tabela 2.1 representa os valores de cada composto da cana-de-açúcar.

Cana para moenda		Cana (%)
Água		73-76
Sólidos		24-27
Sólidos Solúveis		10-16
Fibra(base seca)		11-16
Constituintes do caldo		Sólidos Solúveis (%)
Açúcares		75-92
	Sacarose	70-88
	Glucose	2-4
	Frutose	2-4
Ácidos		3,0-4,5
Ácidos Inorgânicos		1,5-4,5
Ácidos Orgânicos		1,0-3,0
	Ácidos Carboxílicos	1,1-3,0
	Aminoácidos	0,5-2,5
Outros compostos		
Proteínas		0,5-0,6
Amido		0,001-0,05
Gomas		0,3-0,6
Ceras, gorduras, fosfatos		0,05-0,15

Tabela 2. 1 - Composição da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e dos sólidos do caldo (CLARKE e GODSHALL, 1988).

2.2 Bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço da cana de açúcar é um dos subprodutos da indústria da cana, assim como a sacarose e a palha. Trata-se do resíduo fibroso resultante da extração do caldo da cana de açúcar, caracterizado por diferentes tamanhos de partículas (PANDEY et al, 2000a). É composto principalmente pela parte fibrosa que dá resistência ao vegetal, como fibras exteriores do colmo ou da casca, feixes fibrovasculares, e também pelas frações polissacarídicas, como hemicelulose, celulose e lignina. A figura 2.2 mostra o bagaço bruto.

Segundo CHESF (1987), a composição média do bagaço é de 36% de celulose, 32% de hemicelulose, 19% de lignina e 13% de ceras, proteínas e cinzas. Já segundo FENGEL e WENEGER (1989), o bagaço se distribui em 20-30% lignina, 38-50% celulose, 25-27% de hemicelulose e 5-20% outros. Para PANDEY et al (2000a), a composição média do bagaço é de 50% de celulose e 25% de

hemicelulose e 25% de lignina. Por possuir um baixo teor de cinzas, oferece maiores vantagens em processos de bioconversão se comparado com resíduos de outras culturas, como palha de arroz e palha de trigo (PANDEY et al, 2000b).

Para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos disponíveis para utilização para a bioconversão em etanol (SANTOS E GOUVEIA, 2009).



Figura 2.2 Bagaço da cana-de-açúcar (LENÇO, 2010).

2.3 Materiais Lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de planta e consistem principalmente de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007).

O citoplasma da maioria das células de plantas é protegido por uma membrana conhecida como “parede celular”, que delimita também sua função e tamanho. A estrutura química e física da parede celular varia entre os grupos de plantas. Seus componentes químicos podem ser divididos em dois grupos: ligninas e polissacarídeos da parede celular (GOODWIN E MERCER, 1974).

A parede celular típica de plantas, anual ou perene, é composta de três camadas distintas morfologicamente: a lamela média, a parede primária, a parede secundária e uma fina camada interna algumas vezes chamada de parede terciária (FAN et al, 1982, TAIZ E ZEIGER, 2009). A lamela média é uma camada amorfa, intermediária entre as paredes primárias das células adjacentes. Em células maduras, é retratada como composta principalmente por substâncias pécticas, com alta

quantidade de lignina. Estudos mais recentes sugerem que a lamela média pode ser uma matriz de polissacarídeos, além da pectina. Pode-se acompanhar sua origem na placa celular formada durante a divisão celular (TAIZ E ZEIGER, 2009).

A parede primária é a estrutura que está presente enquanto a célula está crescendo, e é capaz de expandir para acomodar o novo tamanho da célula (TAIZ E ZEIGER, 2009). Durante o crescimento, é composta largamente por celulose com algumas substâncias pécicas. É a camada mais fina da parede celular, e a primeira a ser depositada nas células. Quando o crescimento cessa, a parede primária torna-se espessa e consideravelmente lignificada (FAN et al, 1982; GOODWIN E MERCER, 1974), dando origem à parede secundária. Devido ao novo estado diferenciado da célula, a parede secundária pode tornar-se altamente especializada, tanto em estrutura quanto em composição (TAIZ E SEIGER, 2009)

Do lado de dentro da parede primária há a parede secundária, em uma seqüência de três lamelas S1, S2 e S3. A camada central dessa parede, S2, é usualmente mais grossa que as outras. Sua representação esquemática é dada na figura 2.3.

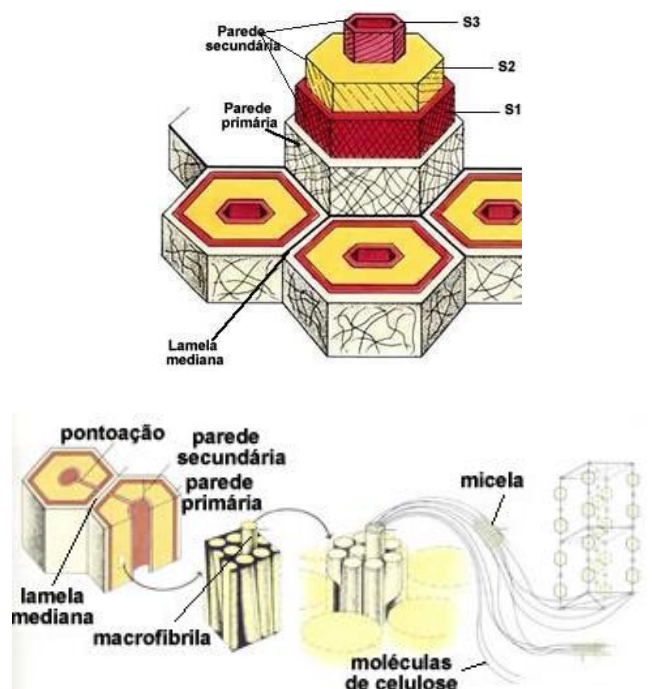


Figura 2.3 Modelo da estrutura da parede celular (GOODWIN E MERCER, 1974).

Cada camada da parede primária contém microfibrilas de celulose que se encontram mais ou menos paralelas umas às outras, mas suas hélices se diferenciam no seu interior. As microfibrilas de celulose da parede primária estão embebidas em uma matriz altamente hidratada, composta primariamente de hemicelulose, para síntese e deposição de substâncias pécicas (TAIZ E ZEIGER, 2009). É possível visualizar essa divisão na figura 2.4.

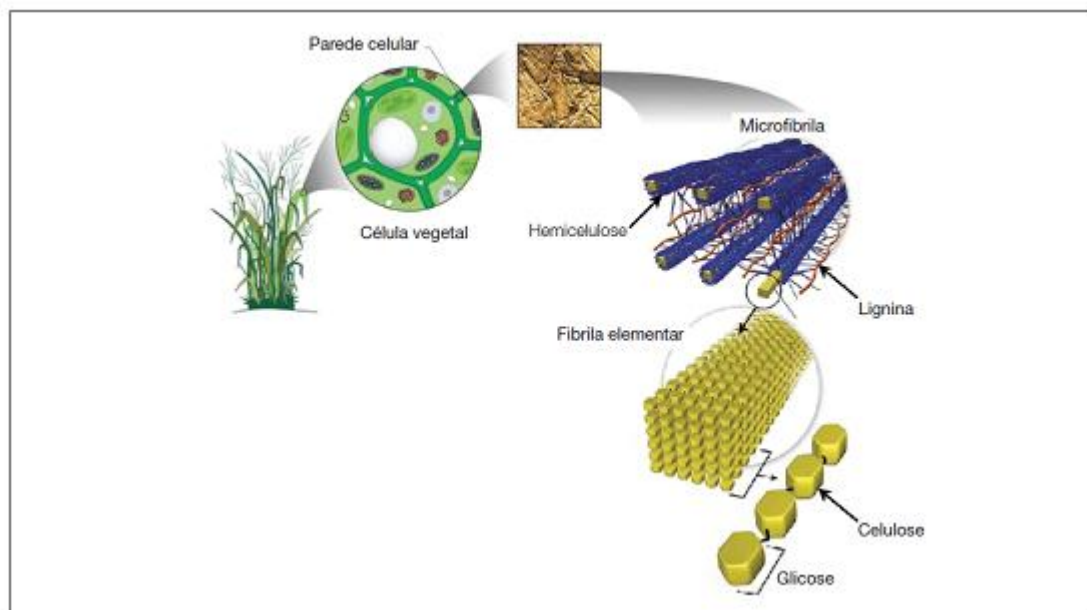


Figura 2.4 Modelo da estrutura da parede celular e relação da lignina, hemicelulose e celulose na parede secundária (CANILHA et al, 2010).

2.3.1 Celulose

A celulose está presente nas paredes celulares de plantas, e algumas bactérias, e é o polímero natural mais abundante na Terra. É o componente principal das plantas, servindo como material estrutural e de sustentação. Moléculas de celulose são homopolímeros de anidroglicose unidas por ligações β -D (1-4) (FAN et al, 1982, NOBEL, 1999; TAIZ E ZEIGER, 2009). Elas variam muito no peso, mas o número médio de unidades de glicose é de 3000 por molécula (GOODWIN E MERCER, 1974). Segundo TAIZ E ZEIGER (2009), esse número pode ser entre 2.000 e 25.000 unidades. Contribuem para a resistência e disposição estrutural da parede celular (TAIZ E ZEIGER, 2009).

A celulose tem uma estrutura linear e fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das distintas cadeias de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais e que são resistentes a ataques enzimáticos e, conseqüentemente, à degradação (TEERI, 1997; TAIZ E ZEIGER, 2009). O firme alinhamento e as ligações entre si das moléculas de glicose determinam a linearidade e cristalinidade das moléculas de celulose (OKAMURA, 1990; TAIZ E ZEIGER, 2009).

Em sua estrutura, duas unidades de glicose adjacente são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxílicos, no carbono um e no carbono quatro, dando origem à molécula de celobiose, dissacarídeo que é o monômero da celulose (FENGEL E WENEGER, 1989; GOODWIN E MERCER, 1974). Estudos comprovaram que as ligações existentes entre todas as unidades glicosídicas são uniformes (OKAMURA, 1990). Experimentos de raios-X e difração de elétrons mostraram que a celulose forma agregados de estruturas laminares com as moléculas de celulose em conformação alongada (WINGER et al, 2009).

Muitas cadeias de celulose começam juntas a formar uma rede cristalina, a qual é estabilizada tanto por ligações de hidrogênio intramoleculares quanto intermoleculares. Ligações de hidrogênio intramoleculares são formadas entre o oxigênio do anel de um resíduo e o hidrogênio do C3 de outro resíduo vizinho. Ligações de hidrogênio intermoleculares ocorrem entre o grupo hidroxila e átomos de oxigênio em cadeias adjacentes. Estabilidade adicional é providenciada pela força de Van der Waal's. Várias dezenas dessas cadeias posicionadas umas contra as outras são mantidas juntas para formar o que é conhecido como microfibrila de celulose. Muitos dos grupos hidroxilas em uma cadeia de celulose são usados nessas ligações, resultando em uma macromolécula linear de considerável força.

As fibrilas de celulose são enroladas helicoidalmente com um ângulo de microfibrilas na camada dominante da parede celular. O ângulo da microfibrila é em grande parte responsável pelas propriedades da parede celular. De fato, o arranjo espiral das fibras de celulose permite um ajuste da rigidez e da extensibilidade da célula vegetal. Quando as fibras rígidas de celulose são paralelas na direção da célula, a rigidez é maior e a extensibilidade menor e principalmente dependente da extensibilidade da celulose. Aumentando o ângulo da microfibrila para acima de 40°, diminui-se a rigidez, e aumenta-se a extensibilidade por aproximadamente o mesmo fator (FRATZEL, 2003).

As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (FAN et al, 1982, TAIZ E ZEIGER, 2009), como se pode visualizar na figura 2.5.

Cadeia de β -D-(1-4)-glucano $\rightarrow$ microfibrila de celulose

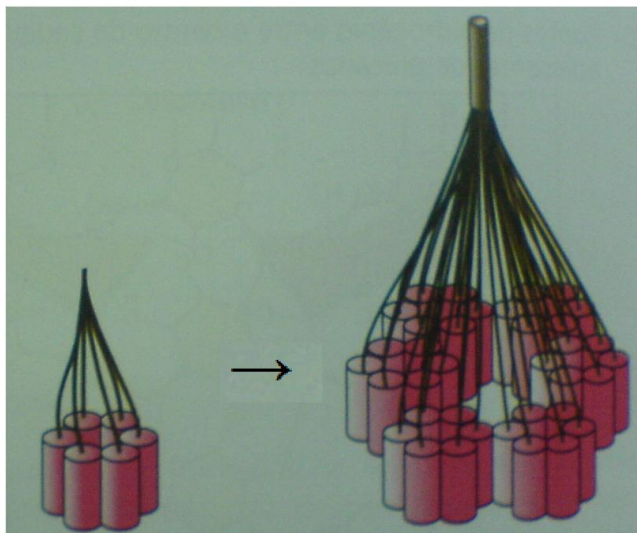


Figura 2.5 Modelo da estrutura da microfibrila da celulose, a partir das cadeias de glucanos (adaptado de TAIZ E ZEIGER, 2009).

Fibras de celulose têm tanto regiões amorfas quanto regiões cristalinas. Nas regiões cristalinas as cadeias individuais são precisamente arranjadas e nas regiões amorfas não o são (BOWES E MAUSETH, 2008). Estas possuem grupos hidroxilas mais disponíveis para reagir. As ligações inter e intramoleculares da celulose podem ser visualizadas na figura 2.6.

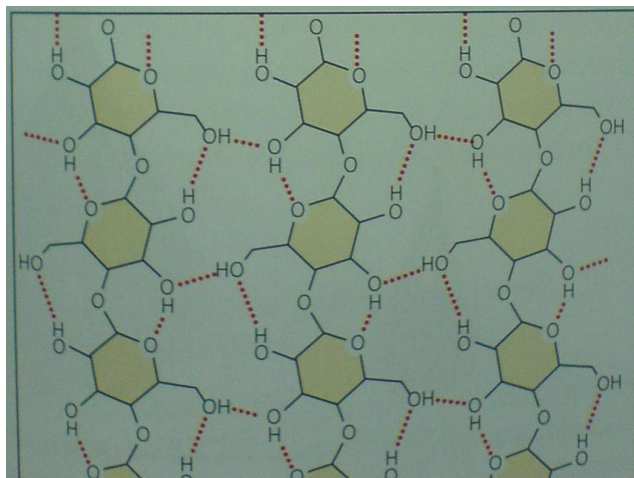


Figura 2.6 Ligações inter e intramolecular dentro das cadeias de celulose (adaptado de TAIZ E SEIGER, 2009).

O carbono anomérico aloja a hidroxila, que pode estar na posição α ou β . É esta posição que determina a diferença entre celulose e amilose. Quando a hidroxila está na posição α forma a amilose (α -D (1-4) glucopiranoose), e quando a posição é β , o composto formado é a celulose (β -D (1,4) glucopiranoose) (OKAMURA, 1990, FAN et al, 1982), conforme mostrado na figura 2.7. Essas diferenças estruturais são a razão porque a amilose e celulose têm diferentes propriedades físicas e biológicas. Amilose é pouco solúvel em água, e forma suspensões, nas quais sua forma helicoidal é preservada. Fibras de celulose são insolúveis em água (WINGER et al, 2009).

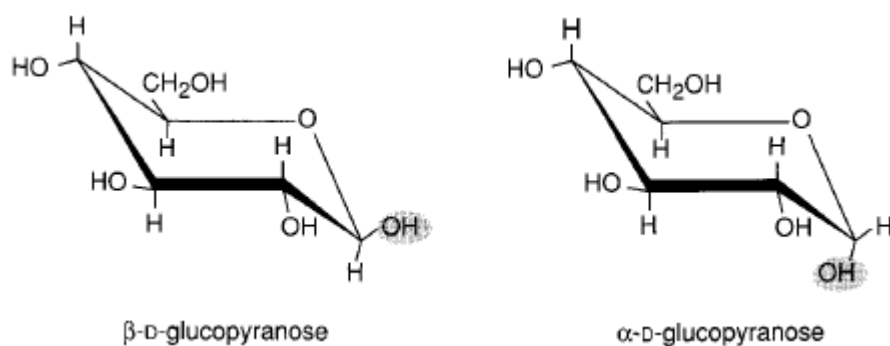


Figura 2.7 Moléculas de Celulose (β -glucopiranoose) e Amilose (α -glucopiranoose).

2.3.2 Hemicelulose

Durante a síntese da parede celular, a hemicelulose é depositada como um constituinte amorfo que ocupa espaço entre as fibrilas tanto na parede primária quanto na secundária e então, cada microfibrila pode ser considerada como uma rede de fibrilas elementares de celulose embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina (WAN et al, 2010; TAIZ E ZEIGER, 2009). Hemicelulose e pectina são heteropolissacarídeos ramificados, não-celulósicos (considerado como não-celulósicos e não-pécticos) (GOODWIN E MERCER, 1974) e são compostos por mais de 20 diferentes monossacarídeos em diversas combinações. Em geral, hemicelulose e pectina formam também ligações covalentes entre outros polímeros da parede celular, como a lignina.

Com o decréscimo da porcentagem de hemicelulose, há aumento do tamanho médio do agregado de fibrilas e mais estruturas fibrilares compactas são formadas (WAN et al, 2010).

A hemicelulose pode ser considerada como composta por três grupos principais de polissacarídeos, as xilanas, mananas e glucomananas (manose e glicose), e as galactanas e arabogalactanas (galactose e arabinose) (TAIZ E ZEIGER, 2009), sendo a xilana o maior componente (BADHAN et al, 2007, GOODWIN E MERCER, 1974).

As mananas e as glucomananas são moléculas essencialmente lineares, compostas por mistura de ligações β - 1,4 de unidades de glucopirranose e ligações β - 1,4 de unidades de manopirose. Já as galactanas e arabogalactanas são moléculas altamente ramificadas. A unidade básica aparece como uma estrutura com ligações 1-3 e 1-6 de D-galactopirranose (GOODWIN E MERCER, 1974).

A hemicelulose é definida como substância solúvel em álcali, depois de removidas as substâncias pécticas, e tem um grau muito menor de polimerização se comparada com a celulose (TAIZ E ZEIGER, 2009). Aditivos alimentares e outros polímeros podem ser produzidos com hemiceluloses solubilizadas. Depois da hidrólise, a xilose (maior componente da hemicelulose) pode ser convertida em produtos de alto valor agregado, como por exemplo, o xilitol (XIAO et al, 2001).

2.3.4 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante da Terra, depois da celulose. Caracteriza-se pelo elevado número de grupos -CH₃ e de grupos -OH. Sua estrutura química difere dependendo da sua origem ser de madeira folhosa ou de coníferas. Constitui a fração não-

carboidrato da madeira livre de extrativos, extremamente complexa e difícil de caracterizar. Representa de 20 a 35% da massa total da biomassa lignocelulósica (FAN et al, 1982).

É essencialmente uma macromolécula tridimensional de fenilpropano, amorfa, com as unidades deste ligadas entre si por ligações pelo éter e ligações carbono-carbono (FAN et al, 1982), e com propriedades hidrofóbicas (BOWES E MAUSETH, 2008). As ligações entre as unidades básicas de fenilpropano não ocorrem de forma regular e repetitiva, mas sim através de acoplamento aleatório de radicais, a partir de três alcoóis precursores: alcoóis p-cumárico, coniferílico e sinapílico (BURANOV E MAZZA, 2008). As fórmulas químicas destes alcoóis estão representadas na figura 2.8. A junção dos alcoóis p-cumárico, coniferílico e sinapílico tem como resultado unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas. A figura 2.9 (SUN et al, 1997) retrata a complexidade da estrutura de lignina, através da análise de lignina de palha de trigo.

Alguns autores relatam perda de água da parede celular a partir da ligação entre as macromoléculas da matriz (hemicelulose, celulose e lignina), e que essa desidratação pode alterar a estrutura das microfibrilas de celulose, e confere à parede secundária caráter inapto para degradação por microrganismos (BOWES E MAUSETH, 2008).

A lignificação é a última e importante etapa do desenvolvimento da parede celular, e é caracterizada pelo aumento da força mecânica e proteção contra ataque patogênico. O propósito da lignificação é ser um dos reforços da parede celular pela cimentação das microfibrilas e protegê-las de ataque químico e físico (GOODWIN E MERCER, 1974; TAIZ E ZEIGER, 2009).

A presença de lignina afeta a produção de biocombustível à medida que impede a penetração de enzimas, atuando como um adsorvente não-específico, e pode dar origem a produtos de degradação, que são inibitórios para a sacarificação e fermentação (SUN E CHENG, 2002).

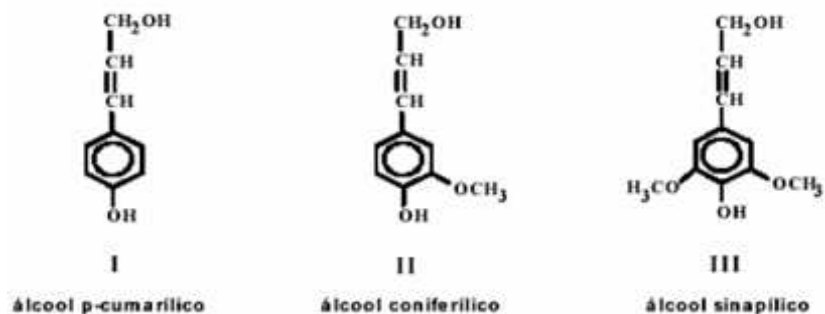


Figura 2.8 Precusores da biossíntese da lignina (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL e WENEGER, 1989)

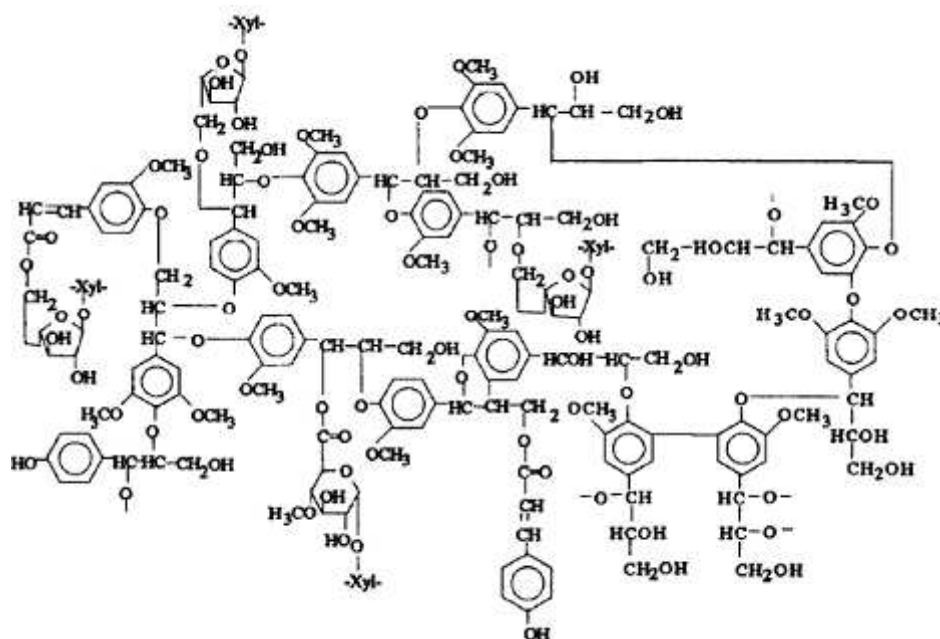


Figura 2.9 Proposta para da estrutura química da lignina da palha de trigo (SUN et al, 1997)

2.3.5 Extrativos

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo vegetal. São responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, o sabor e as propriedades abrasivas (DALMEIDA, 1998).

Entretanto, possui efeito inibitório no processo de conversão da biomassa (FENGEL E WENEGER, 1989) A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como potássio, sódio, cálcio, etc. (YU; LOU; WU, 2008).

Referem-se a todos os componentes que não estão presentes na parede celular. Consiste em um grande número de compostos químicos. Conforme sua solubilidade em água ou solventes orgânicos neutros, podem ser classificados em extrativos e não-extrativos. Os extrativos, por sua vez, podem ser divididos grosseiramente em terpenos, resinas e fenóis. Já os não-extrativos consistem principalmente de substâncias inorgânicas como carbonatos e oxalatos (FAN et al, 1982).

Segundo FENGEL e WENEGER (1989), seu teor pode variar de 5 a 20%. Já segundo DALMEIDA (1998), para madeiras de folhosas esse teor pode ser na faixa de 3 a 10%, e para coníferas entre 5 a 8%.

2.4 Pré-tratamento

A presença da lignina nas lignoceluloses atua como uma barreira natural, que previne ataque por fungos e bactérias na célula vegetal. Aliadas a isso, a cristalinidade da celulose e a presença de hemicelulose tornam a biomassa muito resistente à ação enzimática (FAN et al, 1982, CHEN et al, 2009). A hidrólise natural dos materiais lignocelulósicos é lenta (PANDEY et AL, 2000a). Destruir essa resistência tem sido o grande desafio para produção de combustíveis a partir de materiais lignocelulósicos.

Bioetanol de segunda geração pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos (resíduos de cultura) usando pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática e fermentação, como mostra a figura 2.10. O objetivo do pré-tratamento é romper essa resistência natural, alterando a matriz lignocelulósica da biomassa, através do aumento de porosidade do material, da quebra do elo da lignina, do rompimento da estrutura cristalina da celulose, aumentando a facilidade de acesso das enzimas à celulose (ÖHGREN et al, 2007, PANDEY et AL, 2000b).

O uso de resíduos de culturas vegetais como matéria-prima para produção de energia tem como vantagem a possibilidade de uma matéria-prima sem custos altos, além de evitar competição direta e indireta com culturas destinadas a alimentação humana e animal (GNANSOUNOU E DAURIAT, 2010).

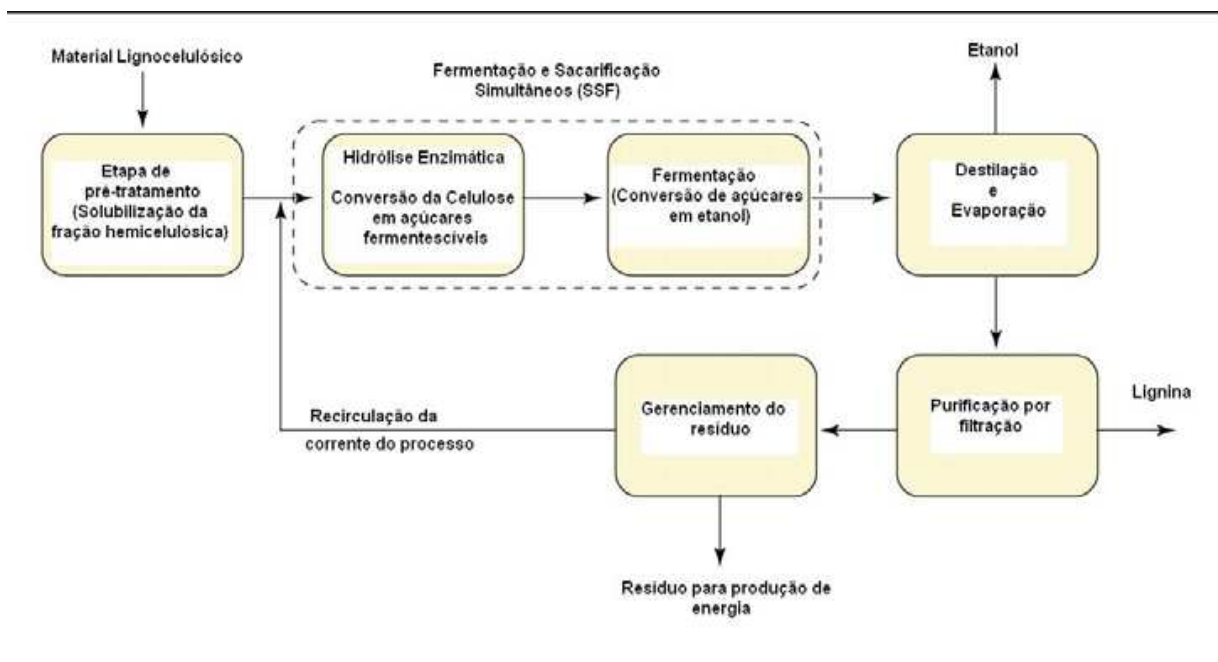


Figura 2.10 Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 2006 e BALLAT, 2011).

A velocidade e a extensão pelas quais a celulose pode ser enzimaticamente sacarificada são limitadas por dois fatores importantes: 1) o fechamento físico e a associação química entre a lignina e os polissacarídeos da parede celular, 2) o grau de cristalinidade dentro do polímero de celulose. Tentativas de melhorar a eficiência da produção enzimática de glicose a partir de materiais lignocelulósicos têm envolvido o uso de pré-tratamentos químico, físico ou biológico, no esforço de remover a lignina e/ou diminuir a cristalinidade da celulose. Muitos desses pré-tratamentos resultam em aumento do rendimento de glicose (GOULD, 1984, CHEN et al, 2009). Entretanto, alguns pré-tratamentos freqüentemente utilizam reagentes tóxicos e/ou geram inibidores que interferem no crescimento microbiano durante as reações subseqüentes de fermentação (GOULD, 1984, HODGE et al 2008, HU et al, 2008)

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo de conversão de biomassa a açúcares fermentescíveis (WHEALS et al, 1999; HSU et al, 1980, SOUSA et al, 2009; MOSIER et al, 2005). Pela sua importância econômica, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo através de pesquisa e desenvolvimento (LEE et al, 1994; LYND et al, 1996; ALVIRA et al, 2010).

Um pré-tratamento adequado e eficaz possui como características (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999; SUN e CHENG, 2002; ALVIRA et al, 2010):

- Resultar em alta recuperação de todos os carboidratos;
- Tornar a biomassa facilmente hidrolisável com baixas cargas enzimáticas;
- Ocasionar pouca ou nenhuma formação de produtos de degradação de açúcares e lignina;
- Demandar pouca energia ou permitir que a energia empregada possa ser reutilizada em outras etapas na forma de calor;
- Ser de custo mínimo e ambientalmente compatível

A literatura registra várias técnicas de pré-tratamento químicos, físicos e biológicos, que podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (HSU, 1980). Todos os processos aumentam a digestibilidade e a bioconversão da biomassa, mas a deslignificação varia conforme o pré-tratamento escolhido (ALVIRA et al, 2010).

2.4.1 Pré-tratamento Físico

O pré-tratamento físico tem como objetivo a redução do tamanho da partícula, reduzindo também a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose e aumentando a superfície de contato (ALVIRA et al, 2010; CHANDRA et al, 2007). Isso torna a matriz lignocelulósica mais acessível às enzimas do complexo celulase.

Uma das vantagens do pré-tratamento físico é o fato de este ser insensível às características físicas e químicas da biomassa utilizada (CHANDRA et al, 2007). Entretanto, a energia consumida para este processo depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa utilizada, e não há remoção de lignina (KUMAR et al, 2009; ALVIRA et al, 2010). Esta técnica de pré-tratamento consome energia e tempo, podendo ser a parte de alto custo do processo (BALAT, 2011).

O pré-tratamento físico pode ser classificado em duas categorias gerais: mecânicos e não-mecânicos (FAN et al, 1982).

O pré-tratamento mecânico tem como resultado a divisão do material lignocelulósico em finas partículas, que estão suscetíveis à hidrólise ácida ou enzimática (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Neste processo, o material apresenta tamanho reduzido, após combinação de moagem e trituração, dependendo do tamanho desejado de partícula (ALVIRA et AL, 2010; SUN e CHENG, 2002). A eficácia desse tipo de pré-tratamento depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa. Pequenas partículas têm uma grande superfície para contato, permitindo maior facilidade para hidrólise.

Os pré-tratamentos não-mecânicos causam decomposição do material lignocelulósico por intensas forças externas não-mecânicas, como irradiação, pirólise e extrusão.

A pirólise tem sido utilizada como pré-tratamento para materiais lignocelulósicos que possam ser usados como substrato para pirólise rápida (que possuam alto teor de lignina e celulose), convertendo termicamente celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis com bons rendimentos (BALAT, 2008). Utiliza tratamento com temperaturas maiores que 300°C, onde a celulose é rapidamente decomposta em produtos gasosos e resíduos. A decomposição é muito mais lenta e menos produtos voláteis são formados em baixas temperaturas. Hidrólise ácida (ácido sulfúrico a 1N, por 2,5 horas a 97°C) de resíduos provenientes de pré-tratamento por pirólise resulta em rendimentos de aproximadamente 80% de conversão de celulose em açúcares redutores (SUNG e CHENG, 2002).

A irradiação é feita através de raios gama, microondas e raios de elétrons. A combinação entre irradiação e outros métodos (como o ácido) pode acelerar as reações de hidrólise enzimática, aumentando a conversão de celulose em glicose.

Entretanto, os efeitos da irradiação estão relacionados com a presença de lignina e a cristalinidade da celulose.

O método de irradiação é caro e de grande dificuldade para aplicação industrial (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Já a extrusão é um promissor pré-tratamento para biomassa lignocelulósica. Neste processo, os materiais são submetidos a aquecimento, mistura e corte, resultando em modificações químicas e físicas durante a passagem pelo extrusor. A velocidade de saída e a temperatura do cilindro do extrusor causam alterações na estrutura lignocelulósica (como redução das fibras) aumentando a área de superfície (ALVIRA et al, 2010).

2.4.2 Pré-tratamento Biológico

Microorganismos podem ser usados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica no intuito de aumentar a hidrólise enzimática. Estes microorganismos degradam lignina e hemicelulose. Podem atacar pequena parte da celulose, embora a celulose deva ser mais resistente a este tipo de ataque (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). O pré-tratamento biológico usa vários tipos de fungos, o que não afeta de maneira significativa o ambiente e não requer aplicação de produtos químicos, sendo considerado um método seguro, inclusive do ponto de vista ambiental (ALVIRA et al, 2010). É considerado um processo que não requer alta energia para remover lignina a partir da biomassa celulósica, nem para reduzir o grau de polimerização da celulose e hemicelulose.

No pré-tratamento biológico, microrganismos como fungos White-rot e Brown-rot são usados para degradar a lignina e hemicelulose (KUMAR et al, 2009; SUNG e CHENG, 2002). Fungos White-rot atacam mais efetivamente a lignina (CHANDRA et al, 2007). Já a celulose é atacada tanto pelos fungos Brown-rot quanto pelo White-rot (FAN et al, 1982; SUNG e CHENG, 2002). Entretanto, a principal desvantagem da utilização de pré-tratamento biológico é ser um processo que costuma ser demorado, podendo chegar a semanas (SUN E CHENG, 2002; ALVIRA et al, 2010, CHANDRA et al, 2007).

2.4.3 Pré-tratamento Químico

O pré-tratamento químico ocasiona deslignificação, diminuição de cristalinidade da celulose, redução do grau de polimerização e aumento da porosidade (CHANDRA et al, 2007). Como exemplos, têm-se métodos Organosolv, ácido diluído, alcalino e ozonólise.

O método Organosolv se utiliza de mistura de solventes orgânicos ou misturas aquosas com ácidos inorgânicos catalisadores (como HCL ou H_2SO_4) para quebrar as ligações entre lignina e hemicelulose (KUMAR et al, 2009). Quando comparado com outros pré-tratamentos, o organosolv tem como vantagem a recuperação da lignina pura como subproduto (ALVIRA et al, 2010). Remover os solventes do sistema é necessário, porque podem agir como inibidores das reações de hidrólise e fermentação (SUNG e CHENG, 2002).

Já o principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a hemicelulose, deixando a celulose disponível para enzimas. Este tipo de pré-tratamento utiliza ácidos como ácido sulfúrico e ácido clorídrico, concentrados ou diluídos. O uso de ácidos concentrados torna o processo mais caro,

principalmente pelo fato de ser necessário uso de equipamentos anti-corrosivos e a recuperação dos ácidos utilizados no final do processo (KUMAR et al, 2009).

Dois tipos de pré-tratamento com ácidos diluídos são utilizados: altas temperaturas ($>160^{\circ}\text{C}$), processo de fluxo contínuo para baixo teor de sólidos, e a baixas temperaturas ($<160^{\circ}\text{C}$), com processo em batelada e alto teor de sólidos (entre 10 a 40%).

É pouco atrativo devido à formação de inibidores, e ao fato dos ácidos serem perigosos para manuseio e corrosivos (ALVIRA et al, 2010, MOSIER et al, 2005; SUN e CHENG, 2002).

O pré-tratamento alcalino tem por fundamento o efeito que bases têm sobre a lignina, sendo efetivas em sua solubilização, aumentando assim a digestibilidade da celulose. Exibem baixa solubilização da celulose e hemicelulose se comparados com os pré-tratamentos ácidos ou hidrotérmicos, sendo conduzidos em condições ambientes, podendo levar de alguns segundos a dias de duração (ALVIRA et al, 2010; MOSIER et al, 2005; KUMAR et al, 2009). No entanto, deve-se levar em consideração a perda de açúcares fermentescíveis e produção de compostos inibidores neste processo. A adição de agente oxidante (como oxigênio ou peróxido de hidrogênio) pode favorecer a remoção da lignina (ALVIRA et al, 2010).

O processo de ozonólise utiliza ozônio, um poderoso oxidante, que degrada grande quantidade de lignina e hemicelulose causando aumento no rendimento da hidrólise enzimática. Este pré-tratamento é conduzido usualmente em temperatura e pressão ambiente, não gerando nenhum composto inibidor. Entretanto, a quantidade de ozônio necessária para conduzir o pré-tratamento é muito alta (ALVIRA et al, 2010, SUN e CHENG, 2002). O pré-tratamento por ozonólise tem como vantagens: 1) efetivamente remove lignina; 2) não produz resíduos tóxicos; 3) as reações são realizadas em condições ambiente de temperatura e pressão. Entretanto, é necessária alta quantidade de ozônio, o que torna o processo caro.

2.4.4 Pré-tratamento Combinado (físico-químico)

O Pré-tratamento combinado (físico-químico) combina os físicos e os químicos (CHANDRA et al, 2007). Os que merecem destaque são o de explosão a vapor, água quente e o AFEX (Explosão das fibras com emprego de amônia).

O pré-tratamento com explosão a vapor é o método mais comumente utilizado. A biomassa é submetida a vapor (pressurizado) por um período de tempo, e então repentinamente despressurizada.

É relatado que a hemicelulose é hidrolisada pelo ácido acético (ou por outro ácido) durante a explosão a vapor. Já a lignina é rearranjada na superfície das fibras devido às reações de polimerização e despolimerização (KUMAR et al, 2009).

Este tipo de pré-tratamento requer pouco ou nenhum produto químico, não gerando grandes problemas ao meio ambiente (KAAR et al, 1997; ALVIRA et al, 2010). Tem como resultados a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina, aumentando assim o potencial de hidrólise da celulose. Os mais importantes fatores que alteram o rendimento do pré-tratamento por explosão a vapor são o tamanho da partícula, temperatura, tempo de residência e a combinação entre tempo/temperatura (ALVIRA et al, 2010).

As vantagens da explosão a vapor são a baixa necessidade de energia quando comparadas com o pré-tratamento mecânico, e a ausência de necessidade de reciclo ou custos ambientais (SUNG e CHENG, 2002).

A principal desvantagem deste método é o fato de que a degradação parcial da hemicelulose pode gerar produtos tóxicos que poderão afetar a hidrólise e a fermentação (KUMAR et al, 2009; ALVIRA et al, 2010).

O pré-tratamento AFEX é outro tipo de pré-tratamento combinado. Emprega amônia a alta temperatura e pressão e, em seguida, a pressão é reduzida. A temperatura de 90°C e tempo de 10-60 minutos são empregados, utilizando-se de 1 a 2 kg de amônia/kg de biomassa seca, sendo, por isso, considerado um processo poluente. Para CHANDRA et al (2007), este processo pode efetivamente reduzir o teor de lignina em culturas agrícolas. Segundo SUN (2002), este processo não gera inibidores que possam afetar processos biológicos. Para o pré-tratamento com água quente utiliza-se água em altas temperaturas (160° a 240 °C), mantida líquida com uso de pressão. Esse pré-tratamento tem como principal objetivo a solubilização da hemicelulose, causando também alterações na estrutura da lignina (ALVIRA et al, 2010).

O pré-tratamento com uso de água quente é realizado submetendo-se a biomassa em água quente a alta pressão durante um período determinado. Este processo normalmente utiliza temperaturas entre 200 a 230°C por 15 minutos aproximadamente (BALAT, 2008). Este processo tem como vantagem a solubilização da hemicelulose. É relatado que o pré-tratamento com uso de água quente remove cerca de 80% da hemicelulose (ALVIRA et al, 2010). O risco de produção de compostos inibitórios é reduzido (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

As vantagens e desvantagens de cada tipo de pré-tratamento estão representadas na tabela

2.2

<i>Pré-tratamento</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Limitações e desvantagens</i>
Cominuição mecânica	Reduz a cristalinidade da celulose	Alto consumo de energia
Explosão a vapor	Causa degradação da hemicelulose e transformação da lignina	Destruição da fração de xilana; rompimento incompleto da ligação de lignina na matriz; geração de compostos inibidores para a hidrólise
AFEX	Aumenta a área de superfície acessível	Não é eficiente para biomassa com alto teor de lignina
Explosão de CO ₂	Aumenta a área de superfície acessível; possui boa relação custo/benefício; não forma compostos inibidores	Não modifica os teores de lignina e hemicelulose
Ozonólise	Reduz o teor de lignina; não produz resíduos tóxicos	Grande quantidade de ozônio necessário, tornando-se muito caro.
Hidrólise ácida	Hidrolisa hemicelulose a xilose e outros açúcares; altera a estrutura da lignina	Alto custo; necessidade de equipamento resistente à corrosão; formação de substâncias tóxicas
Hidrólise alcalina	Remove hemicelulose e lignina; aumenta a área de superfície acessível	Produce sais irrecuperáveis que são incorporados à biomassa
Organosolv	Hidrolisa lignina e hemicelulose	Solventes precisam ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados, ocasionando alto custo
Biológico	Degrada lignina e hemicelulose, baixo consumo de energia	Velocidade de reação é muito lenta

Tabela 2. 2 - Vantagens e desvantagens de diversos tipos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos (adaptado de BALAT, 2011).

Dentro dos pré-tratamentos químicos, o processo alcalino é um método mais vantajoso comparado ao ácido, pois há menor degradação dos açúcares (CHEN et al, 2009). A formação de furfural e hidroximetilfurfural nesse processo pode ser evitada, além de permitir a recuperação de muitos sais cáusticos. Este tipo de pré-tratamento diminui a cristalinidade da biomassa e da lignina de maneira mais eficiente do que em outros pré-tratamentos (KUMAR et al, 2009; TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

É sabido que o pré-tratamento alcalino permite a maior deslignificação efetiva (CHEN et al, 2009) e remoção da hemicelulose, deixando as fibras de celulose altamente suscetíveis à digestão

enzimática. A reação de deslignificação é fortemente dependente do pH da mistura, com um ótimo entre 11,5 a 11,6 (XIAO et al, 2001, GOULD, 1984, GOULD, 1985).

Entretanto, HSU (1996) relata que o pré-tratamento alcalino é geralmente mais efetivo em resíduos da agricultura e culturas herbáceas do que em madeiras. Esses efeitos aumentam a acessibilidade das enzimas e a digestão da celulose.

Segundo KONG ET AL (1992) a tecnologia alcalina remove grupos acetila e, principalmente, xilana da hemicelulose, reduzindo o impedimento estérico das enzimas hidrolíticas e a digestibilidade dos carboidratos é reforçada.

GOULD (1984) relata que cerca de metade da lignina e grande quantidade de hemicelulose de materiais lignocelulósicos, como palha e outros resíduos de agricultura, foram solubilizados quando aplicado pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Os pré-tratamentos químicos têm recebido uma maior atenção, já que os pré-tratamentos físicos são relativamente ineficientes no aumento da digestibilidade da biomassa (FAN et al, 1982; BALAT, 2011) e os tratamentos combinados raramente têm digestibilidade melhorada quando comparados aos tratamentos simples (GHARPURAY et al, 1983). Com essas considerações, o pré-tratamento químico foi escolhido como objeto de estudo para esse trabalho.

2.5 Hidrólise

Quando a lignina é removida e a hemicelulose hidrolisada pelo pré-tratamento, a celulose então deve ser hidrolisada à glicose. Essa reação é catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas (celulases). As hidrólises são afetadas principalmente pela composição da matéria-prima e uso de pré-tratamento anterior (CHANDRA et al, 2007). Sem pré-tratamento anterior rendem em torno de < 20%, enquanto as que tiveram pré-tratamento anterior podem render acima de 90% (HAMELINCK et al, 2005).

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas, usando soluções de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (< 100°C).

A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (HAMELINCK et al, 2005, BALLAT et al, 2008).

O processo com ácido diluído é a mais antiga tecnologia para converter celulose de biomassa em etanol. Em alguns processos, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. O primeiro estágio é essencialmente a hidrólise da hemicelulose. Se a reação continuar, os açúcares produzidos seriam convertidos em outros produtos químicos, tipicamente furfural. A degradação de açúcares não somente reduz o rendimento de açúcar, mas o furfural e outros co-produtos podem inibir o processo de fermentação. Portanto, o primeiro estágio é conduzido sobre condições de processo brandas para recuperar açúcares de cinco carbonos, enquanto no segundo estágio somente os sólidos restantes, com a celulose mais resistente, sofre condições mais duras para recuperar açúcares de seis carbonos. A solução de hidrolisado é recuperada em ambos os estágios e fermentada a álcool (HAMELINCK et al, 2005). A grande vantagem do processo com ácido diluído é sua alta velocidade de reação, o que facilita processo contínuo. Sua grande desvantagem é o baixo rendimento de açúcar e o uso de temperaturas maiores que 100°C (BALLAT et al, 2008).

Na hidrólise enzimática, o processo de quebra da celulose em açúcares menores é realizado por enzimas do complexo celulase (SUN e CHENG, 2002). As enzimas são utilizadas como catalisadores para separar ou hidrolisar as cadeias de hemicelulose e celulose, formando seus respectivos açúcares redutores, inclusive a glicose.

Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação (SEGEL, 1975, SUN e CHENG, 2002)

Esse tipo de hidrólise tem muitas vantagens: as condições de processo são suaves, resultando em rendimentos potencialmente altos, e os custos de manutenção são pequenos se comparados com ácido ou hidrólise alcalina (não há problemas de corrosão) (SUN E CHENG, 2002; BALAT et al, 2008).

Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para

atingir uma alta conversão da celulose, são necessárias altas concentrações da enzima, o que aumenta o custo da produção (EKLUND et al. 1990; DWIVEDI et al, 2009).

Enzimas podem ser recuperadas e recicladas, logo, a concentração de enzima pode ser maior contra menor custo, embora a qualidade da enzima decresça gradualmente.

O processo enzimático é compatível com muitos pré-tratamentos, embora métodos puramente físicos não sejam adequados. Muitos autores consideram a hidrólise enzimática como a chave de produção de etanol viável economicamente, em longo prazo. Embora processos com ácidos sejam tecnicamente maduros, o processo enzimático tem custos de projeto comparáveis e redução de custos com a melhoria da tecnologia. Na tabela 2.3 são mostradas as condições de processo para hidrólise com ácido concentrado, ácido diluído e a enzimática.

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	<1% H ₂ SO ₄	215	3 minutos	50-70%
Ácido concentrado	30 a 70% H ₂ SO ₄	40	2-6 horas	90%
Enzimática	celulase	70	1,5 dia	75-95%

Tabela 2.3 - Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise para análise da eficiência de conversão(HAMELINCK et al, 2005).

Diversos fatores devem ser considerados importantes para realizar a hidrólise enzimática, tais como porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose do material, entre outras (SEWALT et al, 1997; SUN E CHENG, 2002,. NLEWEM AND TRASH JR, 2010). Quanto maior a área superficial acessível, maior quantidade de substrato estará disponível para ser hidrolisado.

A cristalinidade atua como barreira proveniente da própria celulose. A celulose presente em materiais lignocelulósicos compõe-se de duas regiões: amorfa e cristalina. A região amorfa é mais acessível ao ataque enzimático, dado sua pouca organização entre as moléculas de celulose. Entretanto, para a região cristalina, as moléculas de celulose estão precisamente arranjadas, dificultando o acesso das celulasas. Quanto maior a precisão de arranjo, maior a dificuldade em acessar as moléculas de celulose.

A lignina atua como barreira física no acesso à celulose, além de atuar como atrativo das enzimas, gerando ligações não-produtivas com estas e causando a perda do sinergismo do complexo enzimático. Atuando como a lignina, a hemicelulose também atua como barreira, impedindo o acesso à celulose pelas enzimas celulases (CHANDRA et al, 2007).

Enzimas celulase são, na verdade, uma complexa mistura de enzimas que trabalham juntas sinergisticamente para atacar partes típicas da fibra de celulose. São produzidas por microrganismos que vivem em materiais celulósicos, sendo uma ampla variedade de bactérias e fungos, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos (SUN e CHENG, 2002). Os fungos merecem mais atenção para pesquisa por suas condições de crescimento aeróbicas e sua taxa de produção.

Uma completa degradação da celulose exige a ação sinérgica do complexo celulolítico, como é o caso do complexo produzido pelos fungos do gênero *Trichoderma reesei*, o qual é formado por diversas enzimas endo- e exoglicanases (HENRISSAT et al, 1998), e dois tipos de β -glicosidase (CHEN et al, 1992). A sinergia entre as enzimas ocorre quando a ação combinada de duas ou mais enzimas conduz a uma taxa de reação mais elevada do que a soma das duas ações individuais (MANSFIELD et al, 1999).

2.5.1. Enzimas celulase

As enzimas celulósicas são produzidas por uma ampla variedade de bactérias e fungos, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos (SUN e CHENG, 2002). A classificação das celulases pode ser feita de diferentes formas, mas os dois modos amplamente usados são os baseados na especificidade do substrato e nas semelhanças estruturais da enzima. Com base na especificidade do substrato (afinidade pela cadeia de glicose) se encontram as celobiohidrolases (CBHs), também chamadas de exo-1,4- β -D-glicanases (E.C.3.2.1.91), e em endo-1,4- β -D-glicanases (EGs) (E.C. 3.2.1.4). E uma terceira classe de enzima que trabalha em conjunto e de forma sinérgica com as CBHs e EGs, que são as β -glicosidases (BG) (E.C.3.2.1.21) (FUENTES, 2009).

2.5.5.1 Endoglicanases (EGs)

As endoglicanases são responsáveis por quebras aleatórias nas regiões amorfas internas da cadeia de celulose, sendo responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas. Essa diminuição produz novos lugares de ataques complementados pelas exoglicanases.

O melhor substrato para a medição da atividade das endoglicanases é um derivado solúvel da celulose tal como é a carboximetilcelulose (CMC) (KUBICEK, 1992).

2.5.1.2. Celobiohidrolases (CBHs)

As extremidades da celulose são atacadas pelas exoglicanases (ou CBHs) liberando subunidades de celobiose (SUN e CHENG, 2002).

As EGs e as CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto (celobiose e glicose). A celobiose apresenta um efeito inibidor nas enzimas maior que a glicose (MANSFIELD et al, 1999). SUNG e CHENG (2002) mencionam o possível modo de ação das exoglicanases como constituído dos seguintes passos: 1) adsorção e formação do complexo enzima-substrato, 2) formação do produto, 3) desorção e readsorção da enzima ou movimento da enzima ao longo da molécula de celulose.

2.5.1.3. β -glicosidases (BGs)

As β -glicosidases hidrolisam a celobiose e celooligossacarídeos solúveis à glicose (MANSFIELD et al, 1999). A remoção da celobiose é importante para diminuir o efeito inibitório desta nas exo e nas endoglicanases. A celobiose apresenta capacidade de inibição da atividade da celulase. Para evitar seu acúmulo, é necessário que β -glicosidase seja adicionada ao meio reacional, para que ocorra uma diminuição na concentração de celobiose no meio reacional, e um aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SUN e CHENG, 2002).

O mecanismo de ação das enzimas celulase inicia-se com o ataque das endoglicanases, que são as encarregadas de atacar as regiões amorfas das fibras de celulose e criam extremos para que seguidamente as exoglicanases ataquem as regiões cristalinas da fibra. Por último as β -glicosidases são encarregadas de impedir o acúmulo de celobiose, realizando a degradação dela em glicose. As β -glicosidases diminuem o efeito inibitório que a celobiose exerce nas exoglicanases. Todo o processo está representado na Figura 2.11.

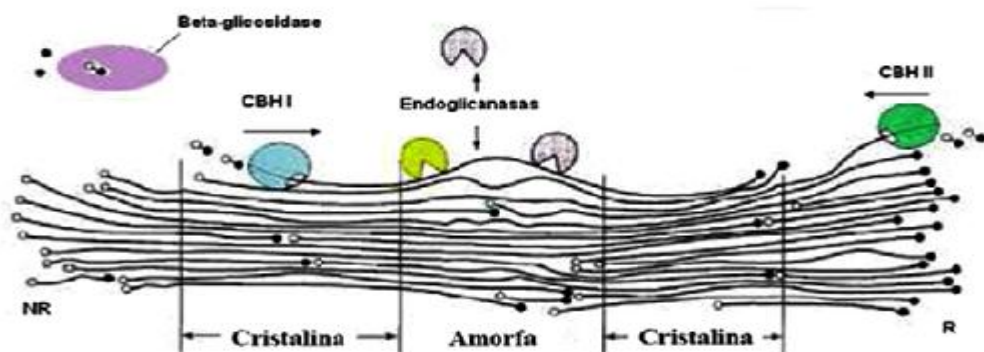


Figura 2.11 Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs e BG de *Trichoderma reesei*. R= grupos terminais redutores, NR= grupos terminais não-redutores. CBH I e II: exoglucanases, EG: endoglicanases. (TEERI, 1997).

A hidrólise enzimática da celulose consiste de três passos: adsorção da enzima celulase sobre a superfície da celulose, biodegradação da celulose em açúcares fermentescíveis, e desorção da celulase (SUN E CHENG, 2002).

A taxa de velocidade de uma reação enzimática, quando colocada em gráfico, tipicamente possui uma fase inicial com alta velocidade de produção. A velocidade decresce com o passar do tempo, até que se atinja um valor próximo do constante (SUN E CHENG, 2002, CHANDRA et al, 2007). Isso se deve a vários fatores, podendo-se considerar principalmente os relacionados ao material lignocelulósico, como o teor de lignina e hemicelulose e o grau de polimerização da celulose, e também relacionados à enzima, tais como desativação térmica ou em ligações com o próprio substrato originando ligações irreversíveis e perda no sinergismo do complexo enzimático (CHANDRA et al, 2007).

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

Os experimentos foram realizados com os seguintes reagentes:

Reagente, (Pureza)	Marca
- Ácido Sulfúrico, (95-98%)	Synth
- Ácido dinitro-3,5-salicílico, (99%)	Vetec
- Ácido Clorídrico, (37%)	Merck
- Ácido cítrico mono hidratado, (99,5%)	Dinâmica
- Álcool Etílico (99,5%)	Synth
- Fenol, (99%)	Vetec
- Hidróxido de Sódio, (95-100%)	Nuclear
- Hidróxido de Cálcio, (96%)	Merck
- Kit Glicose God-Pap	Laborlab
- Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, (99%)	Synth
- D-(+)-glicose, (>=99%)	Merck
- D-(+)-celobiose, (>=99%)	Fluka
- DL-xilose, (>= 99%)	Fluka
- D-Manose, (>=99%)	Chem Service
- DL-arabinose, (>=99%)	Sigma

Além dos reagentes, foram utilizados outros materiais para os experimentos deste trabalho:

- Membrana GS em éster de celulose com poro de 0,22 μm e 13 mm de diâmetro da marca Millipore;
- Membrana HA em ésteres de celulose com 0,45 μm e 47 mm de diâmetro da marca Millipore;
- Seringa descartável 10 mL;
- Seringa Hamilton 25 μL ;

3.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos são:

- Agitador magnético com aquecimento modelo MA-085 Marconi;
- Aparato soxhlet modelo MA – 188 da marca Marconi;
- Autoclave vertical modelo AV 50 da marca Phoenix;
- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostatzado modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Cromatógrafo líquido de Alta Eficiência (CLAE) da Waters, bomba de injeção modelo 515, com detector de índice de refração modelo 410 e software Empower 2;
- Destilador de água da marca Quimis;
- Espectrofotômetro UV mini-1240 Shimadzu com precisão na quarta casa decimal;
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi;
- Incubadora refrigerada com agitação (shaker) modelo MA-832 Marconi;

- Medidor de pH marca Marconi com precisão de 0,01;
- Mufla modelo Q-318D24 da marca Quimis.

3.3. Matéria-prima

A matéria-prima para os experimentos foi o bagaço de cana-de-açúcar fornecido pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), qual foi colhido mecanicamente, sem queima do bagaço, e posteriormente lavado e seco. Durante todo este trabalho foi utilizado apenas um lote da matéria-prima, proveniente de uma mesma safra.

3.3.1. Armazenagem do Bagaço da cana

O bagaço fornecido pelo CTBE apresentava-se lavado e seco. O mesmo foi armazenado em sacos plástico Zip-lock, em ambiente ausente de umidade. Para cada etapa do presente estudo a umidade do bagaço utilizado foi determinada. O bagaço permaneceu com sua estrutura original, sem que houvesse moagem ou trituração em qualquer etapa deste estudo, exceto para caracterização.

3.3.2. Enzimas

Foram utilizadas as enzimas celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e β - glicosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). As atividades enzimáticas, e o pH e temperatura ótimas, foram determinados experimentalmente, como descritos no item 3.5.

3.4. Caracterização Química do Bagaço de Cana de açúcar

Para caracterização do bagaço a ser estudado, primeiramente foi realizada a moagem e trituração do bagaço armazenado. Em seguida, foram realizadas análises do bagaço bruto, tais como: teor de umidade, cinzas, extrativos, análise de carboidratos, lignina solúvel e insolúvel. As metodologias utilizadas são descritas a seguir. Os mesmos procedimentos foram realizados para caracterização do bagaço em todas as etapas deste trabalho.

3.4.1 Teor de umidade

A umidade foi determinada nas amostras para que os resultados possam ser expressos em termos de biomassa seca. Essa análise foi determinada segundo a norma NREL “Determination of Total Solids in Biomass”, SLUITER (2005a).

Cadinhos foram pesados (M_1), previamente secos em uma estufa a 105°C durante quatro horas, no mínimo, e inseridos em um dessecador até atingirem temperatura ambiente. Amostras de 2 g de bagaço foram pesadas nos cadinhos (M_2), e levadas à estufa a 105°C para secagem até peso constante com variação em $\pm 0,1\%$ na umidade atual após 1 hora de reaquecimento da amostra. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa, colocadas num dessecador e pesadas novamente (M_3).

Para calcular o teor de umidade das amostras, foi utilizada a equação 3.1:

$$\% \text{ umidade} = \left[1 - \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right] \times 100 \quad 3.1$$

Onde:

M_1 = massa do cadinho vazio (g)

M_2 = massa da amostra úmida com o cadinho (g)

M_3 = amostra absolutamente seca com cadinho (g).

3.4.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas do bagaço de cana foi determinado RABELO (2010). Pesou-se amostras de $1,0 \pm 0,1\text{mg}$ do material, com teor de umidade reconhecido e descontado, em cadinhos de porcelana de 50mL previamente tarados. Em seguida, as amostras foram inicialmente calcinadas em uma mufla a 800°C por 20 minutos. Após esse tempo, esperou-se o resfriamento da mufla, e então os cadinhos

foram retirados e colocados em dessecador. Após resfriamento, a calcinação foi repetida por mais 15 minutos para se verificar massa constante. O teor de cinzas foi calculado pela equação 3.2:

$$\% \text{ Teor de cinzas} = \left[\frac{M_{\text{cinzas}} - M_c}{M_{cl} - M_c} \right] \times 100 \quad 3.2$$

Onde:

M_c = massa do cadinho vazio (g)

M_{cl} = massa do cadinho + massa do bagaço absolutamente seco (g)

M_{cinzas} = massa do cadinho + cinzas (g)

3.4.3 Determinação de Extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na norma NREL “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al, 2005b) e adaptada por RABELO (2010).

Amostras de 4 g de bagaço de cana, moídos e secos, foram colocados em cartuchos feitos com papel filtro de extração e colocados para ser extraídos em um aparelho soxhlet. A extração foi iniciada colocando-se 200mL de água destilada em cada balão de extração juntamente com pérolas de vidro. A água foi trocada por água fresca depois de 8 horas. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor.

Após extração em água, as amostras foram novamente submetidas à extração, utilizando aproximadamente 200mL de álcool etílico em cada balão do extrator. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração. O solvente foi trocado a cada ciclo de oito horas.

Ao término da extração, os sólidos foram transferidos para um funil de Buchner, lavados com aproximadamente 100mL de etanol, filtrados a vácuo e secos em estufa a 105°C até massa constante,

$$\% \text{ Extrativos} = \left[\frac{M_b - M_f}{M_b} \right] \times 100 \quad 3.3$$

Onde:

M_b = massa de bagaço seco descontado o teor de umidade(g)

M_f = massa de bagaço livre de extrativos (g)

3.4.4 Determinação de Carboidratos, Lignina Solúvel e Insolúvel

As análises seguintes tiveram como objetivo a determinação de xilose, arabinose, glicose, celobiose, lignina solúvel e insolúvel foram baseadas nos procedimentos padrões do NREL “Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis-Spectroscopy (HYMAN et al, 2007), “Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass” (TEMPLETON e EHRMAN, 1995), “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (SLUITER, 2008), “Determination of Sugars, Byproducts and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples (SLUITER et al, 2005b), nas normas ASTM “Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography” (ASTM E1758, 1996) e “Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass” (ASTM e1721, 1995).

3.4.4.1 Hidrólise Ácida

Para a realização dos experimentos segundo as normas citadas anteriormente é necessário que o bagaço tenha umidade menor que 10% e esteja livre de extrativos.

Amostras de 0,3 g de bagaço moído (moídos a 20 mesh) foram pesadas (M_b) e colocadas em tubo de ensaio. Os tubos foram colocados, em seguida, em banho maria a 30°C e foram adicionados 3 mL de H_2SO_4 72% (p/p) em cada tubo. Os tubos foram agitados a cada 10 minutos com bastão de vidro, no intervalo de 1 hora. Os tubos permaneceram no banho para permitir uma hidrólise homogênea. Após este tempo, interrompeu-se a reação utilizando um banho de gelo fundente. Em seguida, foram adicionados 84 mL de água destilada, e transferiu-se quantitativamente para

erlenmeyers de 250 mL. As amostras foram então fechadas, e autoclavadas a 121°C por 1 hora, com a finalidade de hidrolisar totalmente os oligômeros formados. No final de 1 hora, descompressou-se a autoclave, os erlenmeyers foram retirados, resfriados antes de remover o papel alumínio que tampava os erlenmeyers. Então, foram filtrados em funil, com papel de filtro previamente seco, tarado e pesado. O hidrolisado, após filtragem, foram neutralizados com carbonato de cálcio até pH entre 5 e 6 (o carbonato foi adicionado lentamente, evitando formação de espuma). O filtrado foi então transferido para balões de 100 mL, tiveram seu volume completado com água destilada e foram analisados posteriormente quanto à lignina solúvel e carboidratos.

3.4.4.2 Determinação de Lignina Klason (lignina insolúvel)

Após a filtragem anteriormente citada, o material retido no filtro foi lavado com água destilada, até que o pH da água resultante da lavagem fosse o mais próximo de 7. Quando atingido esse ponto, o material retido no filtro foi então colocado em uma estufa a 105°C até massa constante (M_{kla}). O material insolúvel também é constituído de cinzas. Para que não ocorra superestimação dos valores de lignina insolúvel, a determinação das cinzas foi realizada conforme procedimento descrito em 3.3.2, para que possa ser feita a correção no cálculo da lignina Klason. O teor de lignina Klason foi então calculado segundo a equação 3.4:

$$\% \text{ Teor de lignina Klason} = \left[\frac{M_{kla} - M_p}{M_b} \right] \times 100 - \% \text{ cinzas} \quad 3.4$$

Onde:

M_b = massa do bagaço absolutamente seco (g)

M_p = massa do papel filtro tarado (g)

M_{kla} = massa do papel filtro + lignina insolúvel seca (g).

3.4.4.3 Determinação de Lignina Solúvel

Alíquotas de 10 mL do hidrolisado ácido foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, e o volume foi completado com água destilada. As leituras foram realizadas antes de completar 6 horas de hidrólise, em espectrofotômetro UV-visível a 205 nm. O cálculo para determinação da concentração de lignina solúvel é descrito pela equação 3.5:

$$\% \text{ Lignina Solúvel} = \left[\frac{\text{abs} * V_f * D_F}{\epsilon_{\text{lig}} * B * M_b} \right] \times 100 \quad 3.5$$

Onde,

Abs= absorbância da amostra a 205 nm

V_f = volume final do hidrolisado 0,087 L

D_F = fato de diluição

B = caminho óptico, 1 cm

ϵ_{lig} = absortividade da lignina solúvel a 205 nm, 105 L/g.cm (FERRAZ, 2000)

M_b = massa do bagaço absolutamente seco (g)

3.4.4.4 Determinação de Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os açúcares celobiose, xilose, glicose e arabinose presentes no filtrado da hidrólise do material lignocelulósico (com ácido sulfúrico a 72%, descrito no item 3.3.4.1) tiveram seus teores determinados por CLAE. Amostras de 2 mL foram filtradas em um cartucho de extração seringa de poros 0,45 μm da marca Whatman. Em seguida, as amostras filtradas foram injetadas em uma coluna Sugar Parks (Waters) utilizando como fase móvel água filtrada e degaseificada, com fluxo de 0,5 ml/min, à temperatura de 75°C. O Detector de Índice de Refração (IR) modelo 410 da Waters monitorou a 40°C, a separação dos compostos na fase estacionária. As concentrações dos açúcares estudados foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e suas respectivas curvas-

padrão. As curvas-padrão foram previamente determinadas com amostras de concentrações conhecidas de D-(+) celobiose, D-glicose, D-xilose, D-arabinose.

Para converter celobiose e glicose em celulose, usa-se o fator de conversão de 0,95 e 0,90 respectivamente. Já para a conversão de xilose e arabinose em hemicelulose, usa-se 0,88.

Para os cálculos, foi utilizada a equação 3.6:

$$\% \text{ açúcares} = \left[\frac{C_{\text{clae}} * F_t * V_{\text{filtrado}}}{M_b} \right] \times 100 \quad 3.6$$

Onde

C_{clae} = concentração do açúcar quantificado por CLAE (g/L)

F_t = Fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose=0,95; glicose=0,90; xilose=0,88)

V_{filtrado} = volume do hidrolisado filtrado (0,087 L)

M_b = massa do bagaço seco (g).

As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram:

Volume de injeção: 10 μ L

Fase móvel: água deionizada e degaseificada

Taxa de fluxo: 0,5mL/min

Temperatura do forno: 90°C

Temperatura do detector: 40°C

Detector: índice de refração

Tempo de corrida: 15 minutos.

3.5 Determinação de Atividade Enzimática

3.5.1 Preparo da solução tampão

A metodologia descrita por RABELO (2010) foi seguida para o preparo do tampão citrato, 0,05 mol/L pH 4,8, com 0,07g de azida, sendo este meio utilizado com o fim de evitar a proliferação de microrganismos.

Para isso, foram pesados 10,5 g de ácido cítrico monohidratado e dissolvidos em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,3. O volume da solução foi completado para 50 mL e, em seguida, mediu-se o pH. Quando necessário, mais hidróxido de sódio foi adicionado à solução, para que o pH atingisse 4,5 e assim, fosse obtida uma solução tampão de citrato pH 4,5 a 1 mol/L. Para obter a concentração de 0,05 mol/L, a solução de 50 mL foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Neste momento o pH subiu para 4,8.

3.6 Determinação da atividade da enzima celulase

A atividade foi determinada em “Unidades de Papel Filtro” (FPU) por volume de enzima original, segundo a IUPAC (GHOSE, 1987) e seguindo a descrição feita por FUENTES (2009) e RABELO (2010). A quantificação dos açúcares liberados no meio reacional foi determinada de acordo com o método DNS descrito por MILLER (1959) e modificado por BAZÁN (1993).

Juntamente com as amostras foram preparados tubos controle das diluições das enzimas sem o substrato, e do substrato sem enzimas, que também passaram pelo procedimento citado a seguir. Isso foi feito para diminuir qualquer tipo de interferência tanto do substrato quanto da enzima na medição da atividade enzimática. Os valores das absorbâncias obtidos para os tubos controle foram descontados dos valores obtidos das amostras, para que não ocorresse superestimação dos valores obtidos.

Para se determinar a atividade enzimática da celulase, inicialmente foi feita uma solução de celulase (da marca Sigma-Aldrich), com diluição de 1:20 e 5 novas diluições foram feitas a partir

desta. Para cada tubo de ensaio, foram adicionados 50 mg de papel de filtro picado (para facilitar o contato com a solução tampão), e em seguida 1,0 mL da solução tampão citrato. Os tubos de ensaio foram colocados em um banho a 50°C durante 10 minutos, para que ocorra equilíbrio de temperatura. Com os tubos imersos ainda no banho, foram colocados em cada um 0,5 mL da enzima diluída, e deixados reagir por 60 minutos. Para interromper a reação, ao final desse período, foram adicionados 3 mL de DNS misturado. Os tubos foram fervidos durante 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Quando a polpa de papel restante foi assentada, a amostra foi lida no espectrofotômetro, a 540 nm.

Para o preparo dos tubos controle da enzima, foram adicionados 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada diluição da enzima. Já o tubo controle do substrato foi feito adicionando-se 50 mg de papel de filtro em 1,5 mL de solução tampão.

O reagente DNS foi preparado segundo BAZÁN (1993) descrito por RABELO (2010). Dissolveu-se 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. Adicionou-se a esta mistura 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio. O reagente foi guardado em um frasco âmbar para proteger da luz e nomeado como solução mãe de DNS.

Para a quantificação dos Açúcares Redutores Totais (ARTs), foram transferidos 1000 mL da solução mãe para um béquer, sendo adicionados 30,6 g de tartarato de sódio e potássio e submetendo a aquecimento até total dissolução dos sólidos. Após dissolução, o volume foi aferido para 1416 mL, estando assim a solução pronta para uso.

Segundo GHOSE (1987), o cálculo da atividade enzimática é baseado em que uma unidade da atividade enzimática (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente em mols ($2,0/0,18016 \mu\text{mol}$) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5mL), e no tempo de incubação requerido (60 minutos) para geração do equivalente (enzima diluída). Este conceito é mostrado na equação descrita por FUENTES (2009) e RABELO (2010), representada pela equação 3.8

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \left[\frac{2,0}{0,1816 * 0,5 * 60(\text{enzima diluída})} \right] \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mL}^{-1} \quad 3.8$$

3.6.1 Determinação da atividade da enzima β -glicosidase

A enzima utilizada para determinação da atividade da β -glicosidase foi uma solução de celobiose (marca Novozymes) 15mmol/L, e expressa em unidades de celobiose (CBU), como recomendado pela IUPAC, e a metodologia foi seguida segundo Wood e Bhat (1988) descrita por FUENTES (2009).

Para determinar a atividade enzimática, partiu-se de uma solução de β -glicosidase, na diluição 1:1000. Foram realizadas 5 novas diluições em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 a partir da solução inicial.

Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 1,0 mL de cada diluição da enzima, e estes foram colocados em banho termostático a 50°C durante 10 minutos, para que a temperatura se equilibrasse. Em cada tubo, ainda dentro do banho, foram adicionados 0,5 mL de cada diluição da enzima, e deixados reagir por 30 minutos. Ao final desse tempo, os tubos foram então imersos em banho de água fervente por 5 minutos, para posteriormente serem transferidos para um banho de gelo.

Para determinar a glicose que foi liberada, foram colocados 20 μ L de solução final com 2 mL de mono-reagente do kit glicose GOD-PAP. Os tubos foram então colocados em banho a 37°C, por 10 minutos. Findo este tempo, adicionou-se 0,2 mL de H₂SO₄ 72% em cada tubo, realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 540nm.

O conceito de unidade da atividade de β -glicosidase é a base para se calcular a sua atividade. Nele, 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μ mol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. O cálculo da atividade é representado pela equação 3.9:

$$\frac{\text{CBU}}{\text{mL}} = \left[\frac{0,5}{0,1816 * 1,0 * 30(\text{enzima diluída})} \right] \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{ml}^{-1} \quad 3.9$$

3.7 Reação de pré-tratamento

O pré-tratamento foi feito adicionando-se amostras de aproximadamente 15,0 g de bagaço seco em erlenmeyers de 500mL, onde se adicionou 100 mL da solução contendo H_2O_2 alcalino, com concentrações determinadas pelo planejamento experimental. Os erlenmeyers foram mantidos em shaker com rotação de 150 rpm e temperatura também determinada pelo planejamento experimental. Ao término de cada uma das reações o líquido reacional foi descartado e os resíduos restantes lavados com água destilada até que toda a coloração e a sensação escorregadia desaparecessem. As amostras foram espremidas com a mão para tirar o excesso de água, pesadas em uma balança analítica e armazenadas na geladeira em sacolas plásticas identificadas, estando assim prontas para etapa de hidrólise enzimática.

3.8 Hidrólise do bagaço pré-tratado

Após a determinação da umidade de cada uma das amostras de bagaço submetidas ao pré-tratamento em cada uma das condições de estudo, aproximadamente 3,0 g (massa seca) de cada material pré-tratado foram pesados em erlenmeyers e 100 mL de tampão citrato foram adicionados (descontando do tampão a água contida no bagaço pré-tratado). O pH das amostras foi ajustado para o valor de pH ótimo da enzima, de 4,8. Para o planejamento experimental ²³, variou-se a concentração de enzima celulase, estando o valor de β -glicosidase fixo em 25 CBU/g bagaço, de acordo com RABELO (2007) e RABELO (2010). Para o planejamento posterior, o valor de celulase foi fixado em 15 FPU/g bagaço e o valor de β -glicosidase permaneceu 25 CBU/g bagaço. Os erlenmeyers foram então fechados para que não houvesse uma alteração considerável dos volumes reacionais e encubados em um shaker com rotação mantida a 100 rpm durante toda a hidrólise. A temperatura utilizada durante a hidrólise corresponde ao valor encontrado para a temperatura ótima da enzima (50°C), onde sua atividade é máxima (RABELO 2007; RABELO, 2010).

Para investigar as condições de pré-tratamento e verificar quais variáveis do processo influenciam esta etapa, amostras do líquido reacional da hidrólise enzimática (aproximadamente 2 mL) foram coletas em períodos de tempo pré-determinados, isto é, 1, 2, 3, 6, 10, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h, e então, colocadas sob ebulição por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas.

Ao final das 72 h de hidrólise e após coleta do líquido reacional nos diferentes tempos, a reação foi paralisada com adição de água destilada fria nos erlenmeyers. Em seguida, os resíduos restantes foram lavados com água destilada. As amostras foram levadas para a estufa, secas a uma

temperatura de 100°C, pesadas em uma balança analítica e armazenadas na geladeira em sacolas plásticas previamente identificadas.

CAPÍTULO 4

RESULTADO E DISCUSSÕES

4.1 Análise de Composição Química do Bagaço de Cana de Açúcar

Para caracterização química do bagaço utilizado neste trabalho, foram previamente determinados os conteúdos de umidade e cinzas, conforme procedimentos descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Os valores encontrados foram de 6,53% para umidade e 2,43% para cinzas.

Para determinar o teor de seus constituintes, o bagaço foi então submetido à hidrólise ácida, relatada no item 3.3.4.1. Os resultados obtidos para a composição química do bagaço de cana de açúcar estão descritos na tabela 4.1

Componentes	Porcentagem(%)	Desvio Padrão
Umidade	6,97	±0,0245
Cinzas	2,32	±0,2274
Celulose	38,09	±0,1003
Hemicelulose	18,91	±0,3128
Lignina total	23,02	±0,8929
Extrativos	9,64	±0,0112
Total	91,98	

Tabela 4. 1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Pela análise da tabela, é possível confirmar que os compostos presentes em maiores quantidades no bagaço de cana foram a celulose, a lignina e a hemicelulose, respectivamente, em ordem decrescente de teores. E em menores quantidades estão os extrativos e cinzas.

O teor de lignina calculado na tabela 4.1 é composto por lignina solúvel e insolúvel. A parte solúvel de lignina está presente na fração que sofre degradação durante a hidrólise ácida, permanecendo assim no líquido filtrado. Já a porção insolúvel encontra-se na parte retida no papel de filtro, após a hidrólise ácida. Esta é definida como um resíduo não-solubilizado em ácido.

Os valores obtidos na análise estão, de um modo geral, dentro de uma faixa de valores encontrados na literatura. Para celulose, BOUSSARSAR et al (2009) encontrou valor de 45%, enquanto que RABELO et al (2008) encontrou o valor de 39,6%, GARCIA (2009) obteve o valor de 37,35% e RABELO (2010) encontrou o valor de 40,5%. Para a porcentagem de hemicelulose, BOUSSARSAR et al (2009) obteve o valor de 26%, RABELO et al (2008), o valor de 19,7%, GARCIA (2009) obteve 23,66% e RABELO (2010) obteve o valor de 24,5%. Tais variações são comumente encontradas na literatura, pois a composição química de cada espécie de cana de açúcar sofre vários tipos de influência como, por exemplo, temperatura, umidade, constituição do solo, época de colheita, entre outros.

Para tratamento de dados deste estudo foram utilizados os softwares Statistica 7.0 para análise estatística e Microsoft Excel 2007 para tratamento de dados.

4.2 Planejamento fatorial 2³ das condições de pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio

Baseado em RABELO (2007), GARCIA (2009) e RABELO (2010), as variáveis do processo de pré-tratamento estudadas foram: temperatura e concentração de peróxido no pré-tratamento. RABELO (2007) determinou que, realizando o pré-tratamento com 4% de sólidos, tempos de pré-tratamento de mais de 1 h não aumentavam o rendimento da hidrólise. GARCIA (2009) chegou à mesma conclusão para concentração de sólidos de 8% no pré-tratamento. No presente trabalho, como foi usada concentração de sólidos maior, os experimentos foram realizados para tempos reacionais de 60 e 90 minutos com o objetivo de determinar se o tempo de pré-tratamento influenciava a hidrólise enzimática de forma distinta do trabalho de RABELO (2007) e GARCIA (2009).

Como no trabalho de RABELO (2010) a concentração ótima de celulase foi determinada como 3,5 FPU/g bagaço e no trabalho de GARCIA (2009) como 15 FPU/g bagaço, a concentração de celulase usada na hidrólise também foi variada neste primeiro planejamento de experimentos, que teve como objetivo fazer uma avaliação inicial do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino realizado com 15% de sólidos. Como nos trabalhos anteriores a concentração de β -glicosidase determinada como ótima foi de 25 CBU/ g de bagaço, esta permaneceu fixa nesta etapa do estudo, assim como as demais variáveis: pH de 11,5 no pré-tratamento, temperatura de 50°C e pH de 4,8 na hidrólise enzimática, realizada com 3% de sólidos.

Foi realizado um planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central considerando como fatores a temperatura e concentração de peróxido no pré-tratamento, assim como a concentração de celulase na hidrólise enzimática. A resposta considerada foi a concentração de

glicose obtida ao final da hidrólise enzimática. As tabelas 4.2 e 4.3 mostram as variáveis e seus respectivos valores, codificados e decodificados, e a concentração de glicose e o rendimento obtidos para o tempo reacional de 60 e 90 minutos, respectivamente. O rendimento é calculado por:

$$\text{Rendimento Global} = \frac{\text{g glicose/g bagaço bruto} * \text{fator} * 100}{\text{Teor de celulose no bagaço bruto}}$$

onde fator = 0,9.

Ensaio	Temperatura	Peróxido (% v/v)	Celulase (FPU/ g bagaço)	g glicose/g bagaço bruto	Rendimento (%)
1	25 (-1)	3,0 (-1)	3,5 (-1)	0,14	33,27
2	65 (+1)	3,0 (-1)	3,5 (-1)	0,133	31,51
3	25 (-1)	7,0 (+1)	3,5 (-1)	0,191	45,22
4	65 (+1)	7,0 (+1)	3,5 (-1)	0,349	82,35
5	25 (-1)	3,0 (-1)	15,5 (+1)	0,144	33,98
6	65 (+1)	3,0 (-1)	15,5 (+1)	0,202	47,80
7	25 (-1)	7,0 (+1)	15,5 (+1)	0,273	64,41
8	65 (+1)	7,0 (+1)	15,5 (+1)	0,327	77,56
9A	45 (0)	5,0 (0)	9,5 (0)	0,262	62,22
9B	45 (0)	5,0 (0)	9,5 (0)	0,297	70,33
9C	45 (0)	5,0 (0)	9,5 (0)	0,313	74,07

Tabela 4. 2 - Matriz de planejamento 2³ com três pontos centrais para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e tempo reacional de 60 minutos, e suas respectivas respostas.

Ensaio	Temperatura (°C)	Peróxido % (v/v)	Celulase (FPU/ g bagaço)	g glicose/ g bagaço bruto	Rendimento (%)
1	25(-1)	3(-1)	3,5(-1)	0,058	13,80
2	65(+1)	3(-1)	3,5(-1)	0,168	39,63
3	25(-1)	7(+1)	3,5(-1)	0,101	23,81
4	65(+1)	7(+1)	3,5(-1)	0,235	55,43
5	25(-1)	3(-1)	15,5(+1)	0,103	24,34
6	65(+1)	3(-1)	15,5(+1)	0,133	31,41
7	25(-1)	7(+1)	15,5(+1)	0,098	23,22
8	65(+1)	7(+1)	15,5(+1)	0,259	61,50
9A	45(0)	5(0)	9,5(0)	0,261	61,55
9B	45(0)	5(0)	9,5(0)	0,205	48,34
9C	45(0)	5(0)	9,5(0)	0,258	61,05

Tabela 4. 3 - Matriz de planejamento 2³ com três pontos centrais para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e tempo reacional de 90 minutos, e suas respectivas respostas.

No apêndice A são mostradas as concentrações de glicose em g/L obtidas em todos os ensaios das tabelas 4.2 e 4.3, assim como o rendimento do pré-tratamento (massa de bagaço pré-tratado/massa inicial de bagaço).

Na tabela 4.2, observa-se que a maior quantidade de glicose liberada para o tempo de 60 minutos foi para os ensaios 4 e 8, onde foram produzidos 0,349 g glicose/g bagaço bruto e 0,327 g glicose/g bagaço bruto, respectivamente. Estes ensaios demonstram que a quantidade de celulase utilizada não teve influência muito grande no rendimento de glicose na faixa estudada. Esse fato pode ser confirmado pela análise dos ensaios 1 e 5, onde também foi variada apenas a quantidade de celulase, e o aumento do rendimento foi de apenas 0,0039 g/g bagaço bruto. O mesmo se verifica para os ensaios 2 e 6, 3 e 7, onde o aumento dos rendimentos foi muito pequeno. Este resultado é o mesmo encontrado no trabalho de RABELO (2010), que mostrou que concentrações de celulase acima de 3,5 FPU/g de bagaço não aumentavam o rendimento de glicose. Isto corrobora aquele resultado mesmo quando trabalhamos com bagaço de safra diferente e submetido a tratamentos anteriores diferentes e realizamos o pré-tratamento com concentração de sólidos 3.75 vezes maior.

Os valores de concentração de glicose obtidos para tempo reacional de 90 minutos foram inferiores aos obtidos para tempo de 60 minutos, como pode ser visto ao compararmos as Tabelas 4.2 e 4.3. Isso se deve principalmente ao fato de que maior tempo de exposição da matriz lignocelulósica aos agentes de pré-tratamento ocasiona perda de celulose, gerando assim baixo rendimento na hidrólise final. Novamente este resultado é o mesmo obtido nos trabalhos de RABELO (2007) e GARCIA (2009), que mostraram que o tempo de pré-tratamento ótimo quando se usa peróxido de hidrogênio alcalino é de 1 hora. Este resultado parece independe da safra do bagaço e do tipo de tratamento anterior a que foi submetido, já que RABELO (2007, 2010) e GARCIA (2009) trabalharam com bagaços diferentes entre si e diferentes do usado neste trabalho. O aumento do tempo de pré-tratamento causa solubilização da celulose, que sai no licor de pré-tratamento, com consequente diminuição do teor de celulose no sólido pré-tratado (GARCIA, 2009), o que diminui o rendimento em glicose na etapa de hidrólise enzimática. Assim, os ensaios posteriores de pré-tratamento serão realizados por 60 minutos.

Os dados foram analisados pelo software Statistica 7.0. Os resultados obtidos para os efeitos principais e de interação de tempo, temperatura e concentração de celulase na concentração de glicose constam na tabela 4.4.

	Efeito	Erro Puro	t(2)	P
Média	0,239	0,008	30,583	* 0,0011
(1)Temperatura	0,066	0,018	3,587	* 0,0697
(2) Peróxido	0,130	0,018	7,095	* 0,0193
(3) Celulase	0,033	0,018	1,804	0,2130
1*2	0,041	0,018	2,214	0,1573
1*3	-0,010	0,018	-0,525	0,6520
2*3	-0,003	0,018	-0,182	0,8726

Tabela 4. 4 - Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento 2^3 + pontos centrais, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g) produzida. Os efeitos significativos a 90% de confiança são marcados com asterisco.

O gráfico de Pareto é apresentado na figura 4.1.

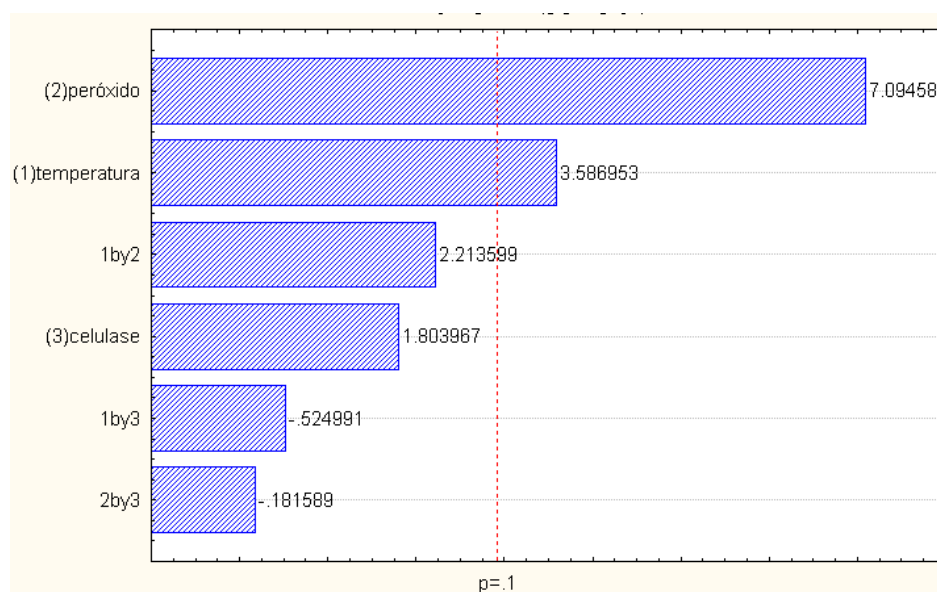


Figura 4. 1 Gráfico de Pareto, para as condições de trabalho citadas, com intervalo de confiança de 90%.

Pela tabela 4.4 e pela análise do gráfico de Pareto (Figura 4.1) pode-se observar que os efeitos principais significativos, a 90% de confiança, são a temperatura e a concentração de peróxido. É possível também confirmar que a quantidade de celulase não tem influência significativa na concentração de glicose obtida após hidrólise. Todos os efeitos de interação das variáveis não apresentaram significância, sendo, então, eliminados do modelo, assim como o efeito da celulase. Este resultado apresenta diferença do trabalho de Rabelo (2007), que concluiu que o aumento da

temperatura não tinha influência no rendimento de glicose. Esta diferença pode ser devida ao uso de bagaço diferente ou ao uso de maior concentração de sólidos na etapa de pré-tratamento.

A tabela 4.4 mostra a tabela ANOVA para o modelo apenas com os efeitos significativos, obtida usando o software Statistica 7.0.

De acordo com a tabela 4.5, de Análise de Variância (ANOVA), pode-se observar que o valor do F calculado de 7,8981 é superior ao tabelado $F_{2,8}(\text{Tab.})=3,11$, demonstrando que o modelo apresenta significância estatística. O valor de 5,0030, calculado para $F_{6,2}$, é menor que o $F_{6,2}(\text{tab.})=9,32$, comprovando que o modelo não apresenta evidência de falta de ajuste.

Os dados obtidos pelo software Statistica 7.0 para coeficientes de regressão do modelo estão na tabela 4.6.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,0426	2	0,0213	7,8981 ¹
Resíduo	0,0216	8	0,0027	5,0030 ²
Falta de Ajuste	0,0202	6	0,0034	
Erro Puro	0,0013	2	0,0007	
Total	0,0641	10		

Tabela 4. 5 - Análise da Variância para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

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

* $F(\text{tab.})_{2,8} = 3,11$ no nível de 90% para a regressão

* $F(\text{tab.})_{6,2} = 9,32$ no nível de 90% para a falta de ajuste

	Coeficiente de Regressão	Erro Puro	t(2)	P
Média	0,002512	0,031833	0,078909	0,944289
(1) Temperatura	0,001645	0,000459	3,586953	0,069695
(2) Peróxido	0,032543	0,004587	7,094586	0,019294

Tabela 4. 6 - Valores de coeficiente de regressão para o modelo utilizado

Portanto, pode-se escrever o modelo para cálculo da quantidade de glicose(g/g bagaço bruto):

$$\text{Concentração de glicose (g/g bagaço bruto)} = 0,002512 + 0,032543 * P + 0,001645 * T$$

Onde T= temperatura e P= Concentração de Peróxido

A superfície de resposta está na figura 4.2, constando apenas os efeitos significativos.

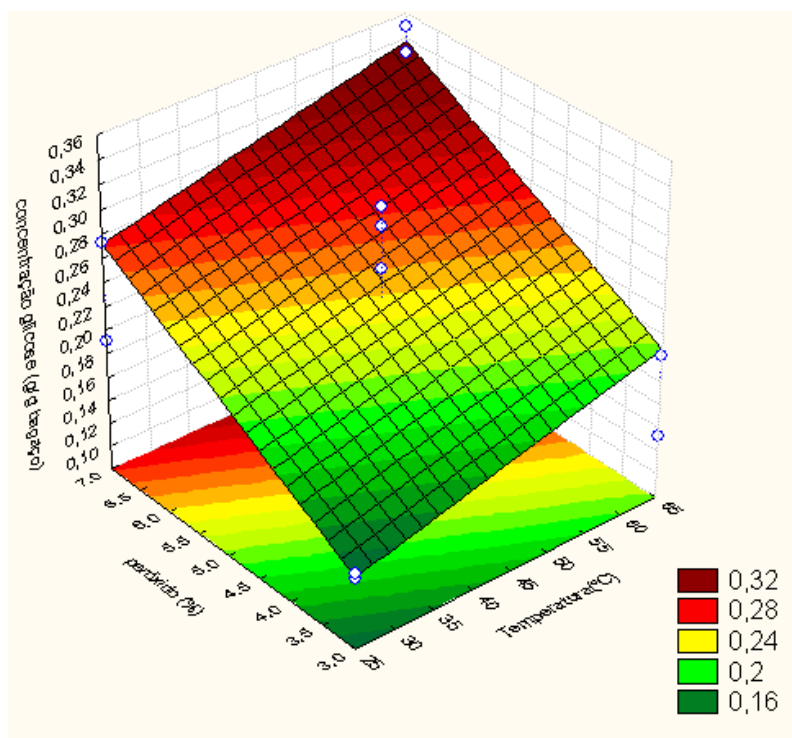


Figura 4.2 Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/g bagaço bruto) em função da temperatura (°C) e concentração de peróxido (% v/v) no pré-tratamento.

Analisando a figura 4.2, observa-se que a maior quantidade de glicose produzida ocorre quando há aumento na temperatura e na concentração de peróxido. É possível observar também que a variável concentração de peróxido apresenta uma maior influência se comparada com a temperatura, pois maiores valores de glicose produzida são encontrados em uma ampla faixa de temperatura. Concentrações altas de peróxido, a baixas temperaturas, já levam a concentrações de glicose relativamente altas. Para altas temperaturas, encontra-se maior quantidade de glicose produzida também a concentrações de peróxido intermediárias.

A maior quantidade de glicose foi obtida na temperatura de 65°C e com 7% v/v de peróxido de hidrogênio, sendo de 0.35 g/g bagaço bruto, correspondente a um rendimento global de glicose de 82,83%.

4.3 Experimento de máxima inclinação

Pelo planejamento fatorial anterior, pode-se observar que ainda não atingimos o máximo, já que os maiores valores encontrados se encontram na extremidade da superfície. Para encontrá-lo foram realizados novos experimentos no caminho de máxima inclinação. Para calcular o caminho de máxima inclinação segue-se o procedimento descrito por BARROS NETO et al., (2001).

Primeiro escreve-se o modelo codificado:

$$\text{Concentração de glicose (g/g bagaço bruto)} = 0,239 + 0,033 x_1 + 0,065 x_2$$

Onde x_1 é a temperatura codificada, definida como $x_1 = (T - 45)/20$ e x_2 é a concentração de peróxido codificada, definida como $x_2 = (P - 5)/2$, sendo T a temperatura em °C e P a concentração de peróxido em % (v/v)

Escolhemos como variável de referência a variável com maior coeficiente em módulo no modelo (a concentração de peróxido) e modificamos seu nível em $\Delta x_2 = +1$ na escala codificada, a partir do ponto central. A mudança é positiva porque o coeficiente é positivo e queremos maximizar a resposta. A mudança no nível da temperatura é calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\Delta x_1 = (b_1 / b_2) * \Delta x_2 = (0.033 / 0.065) * (+1)$$

Assim, para cada mudança de nível de +1 para a concentração de peróxido temos uma mudança de +0.51 para a temperatura. Decodificando, chegamos aos valores de temperatura e concentração de peróxido usados para realização dos novos ensaios experimentais. Estes ensaios foram realizados e os resultados em termos de concentração de glicose e rendimento obtidos estão mostrados nas tabelas 4.7 e 4.8. Nos ensaios das tabelas 4.7 e 4.8 a concentração de celulase usada foi de 15 FPU/g. Embora nos primeiros ensaios a concentração de celulase não tenha se mostrado significativa, aquela análise é válida somente para a faixa estudada. Como nos novos ensaios a faixa de temperatura e concentração de peróxido é ampliada, resolveu-se usar uma concentração de 15 FPU/g bagaço para evitar que a concentração de celulase pudesse vir a ser um fator limitante.

Nos primeiros planejamentos (Tabelas 4.2 e 4.3), a hidrólise foi realizada com o bagaço pré-tratado seco (seco em estufa a 80 °C por 24 horas, logo após a etapa de pré-tratamento), conforme estudos anteriores (RABELO, 2007; GARCIA, 2009). A secagem era feita para ser possível determinar o rendimento do pré-tratamento (massa de bagaço pré-tratado/massa de bagaço bruto). Juntamente com os experimentos de máxima inclinação foram realizados ensaios para determinação da influência da umidade no bagaço pré-tratado a ser hidrolisado. Assim, os pré-tratamentos foram realizados duas vezes com os valores determinados pelo caminho de máxima inclinação. Para obter os resultados apresentados na Tabela 4.7, a hidrólise foi realizada com o bagaço pré-tratado seco e para obter os resultados apresentados na Tabela 4.8 a hidrólise foi realizada com bagaço pré-tratado úmido (guardado em geladeira após etapa de pré-tratamento, sem a etapa de secagem). Para a etapa de hidrólise de bagaço pré-tratado úmido foi descontada a umidade do material pesado.

	Temperatura (°C)	Peróxido (%)	g glicose/ g bagaço bruto	Rendimento (%)
Ponto central+□	55,12	7	0,29	68,52
Ponto central+2□	65,22	9	0,23	54,34
Ponto central+3□	75,34	11	0,20	47,26
Ponto central+4□	85,45	13	0,18	42,53
Ponto central+5□	95,56	15	0,13	30,72

Tabela 4. 7 - Matriz de planejamento para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, com hidrólise de bagaço pré-tratado seco.

O maior valor obtido para hidrólise com bagaço pré-tratado seco foi no primeiro ensaio do caminho de máxima inclinação com produção de 0, 29 g glicose/g bagaço bruto, como é possível analisar na tabela 4.6, com 68,70% de rendimento.

	Temperatura (°C)	Peróxido (%)	g glicose/ g bagaço bruto	Rendimento (%)
Ponto central+Δ	55,12	7	0,400	94,51
Ponto central+2Δ	65,22	9	0,244	57,56
Ponto central+3Δ	75,34	11	0,243	57,37
Ponto central+4Δ	85,45	13	0,170	40,17
Ponto central+5Δ	95,56	15	0,210	49,62

Tabela 4. 8 - Matriz de planejamento para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, com hidrólise de bagaço pré-tratado úmido

Na tabela 4.8, observa-se que a maior quantidade de glicose liberada também foi no primeiro ensaio, onde foram produzidos 0,40 g glicose/g bagaço bruto com rendimento obtido de 94,51%.

Pelos valores obtidos para os experimentos com hidrólise de bagaço pré-tratado seco e bagaço pré-tratado úmido, pode-se avaliar que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o bagaço úmido na hidrólise. O bagaço provavelmente não volta a se hidratar da mesma forma após secagem, o que justifica a diferença dos rendimentos na hidrólise. Os próximos experimentos serão realizados utilizando bagaço pré-tratado úmido na hidrólise.

Para análise do experimento de máxima inclinação, foram considerados os resultados utilizando bagaço pré-tratado úmido. Estes ensaios demonstram que a região onde se encontra o ótimo foi identificada. Esse fato pode ser confirmado pela análise da sequência dos ensaios, já que quando a temperatura e a concentração de peróxido aumentam, o rendimento atinge seu ponto máximo e a partir do segundo ensaio começa a decrescer.

4.4 Experimento com planejamento estrela

De posse destes dados, foi realizado um novo planejamento, agora um planejamento composto central (estrela), com ponto central de 55°C e concentração de peróxido de 7%, que, de acordo com os ensaios da tabela 4.8, parece ser a região de ótimo. O planejamento em estrela é mostrado na tabela 4.9. Nestes ensaios a concentração de celulase usada na hidrólise foi de 15 FPU/g de bagaço e a concentração de β -glicosidase foi de 25 CBU/g bagaço.

Ensaio	Temperatura (°C)	Peróxido (%)	g glicose/ g bagaço bruto	Rendimento (%)
1	45	6	0,2311	54,6
2	45	8	0,2994	70,74
3	55	5,59	0,2411	56,97
4	55	8,41	0,327	77,26
5A	55	7	0,383	90,5
5B	55	7	0,3851	90,99
5C	55	7	0,3857	91,13
6	65	6	0,3074	72,63
7	65	8	0,4014	94,84
8	40,857	7	0,1998	47,21
9	69,142	7	0,3558	84,07

Tabela 4. 9 - Matriz de planejamento estrela para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.

Na tabela 4.9, observa-se que a maior quantidade de glicose liberada foi quando o pré-tratamento foi realizado a 65°C e com 8% de peróxido de hidrogênio, sendo produzidos 0,4014 g glicose/g bagaço bruto, correspondente a um rendimento de 94.84%. Alta concentração de glicose também foi obtida nos ensaios realizados no ponto central, a 55°C com 7% de peróxido, sendo de 0.3846 ± 0.0014 g glicose/g bagaço bruto, correspondendo a rendimento de $90.87 \pm 0.33\%$.

Os perfis da hidrólise em cada ensaio estão representados nas figuras 4.3 (1-9), em termos de concentração em g glicose /g bagaço bruto, com o objetivo de avaliar a etapa do pré-tratamento. Pode ser observada a conversão de glicose em cada um dos testes, onde após 48 h de hidrólise, a liberação de glicose tornou-se praticamente constante. No apêndice B são mostrados os dados de concentração de glicose em g/L em todos os tempos medidos para os ensaios da tabela 4.9.

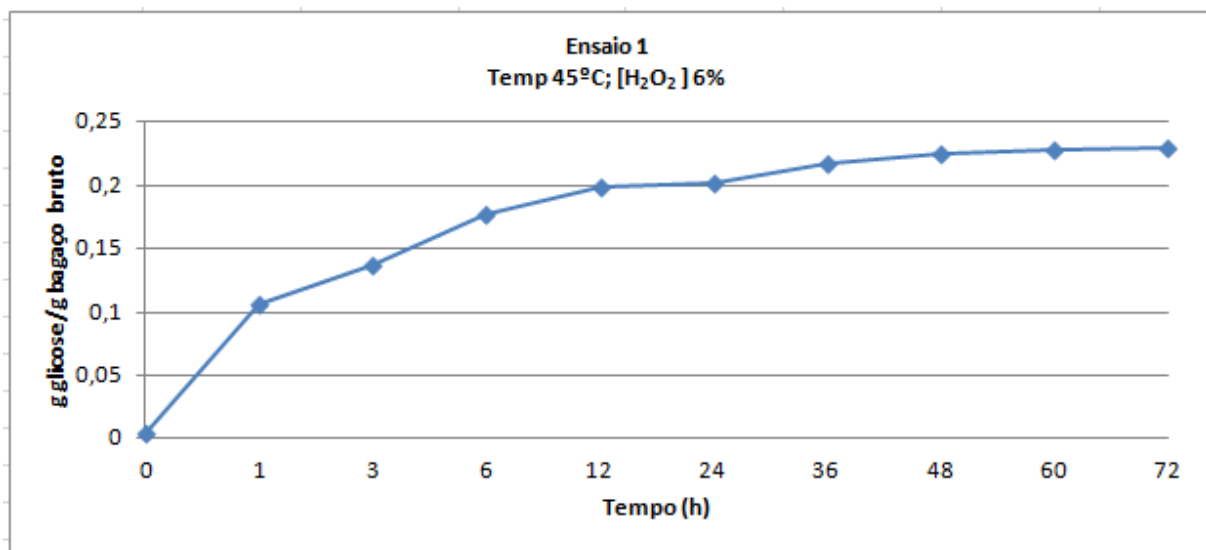


Figura 4.3.1

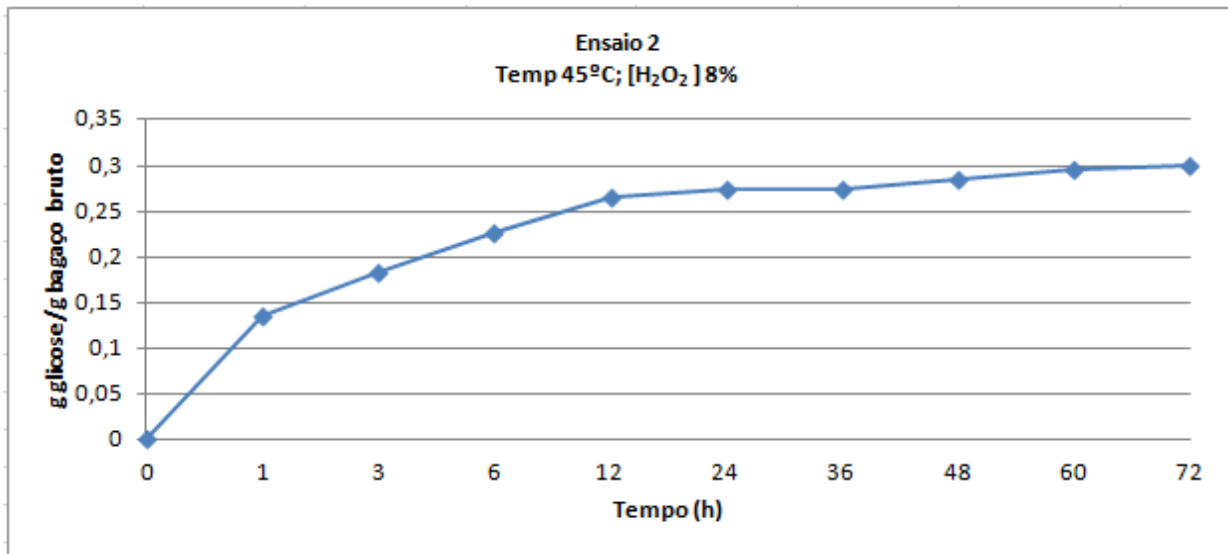


Figura 4.3.2

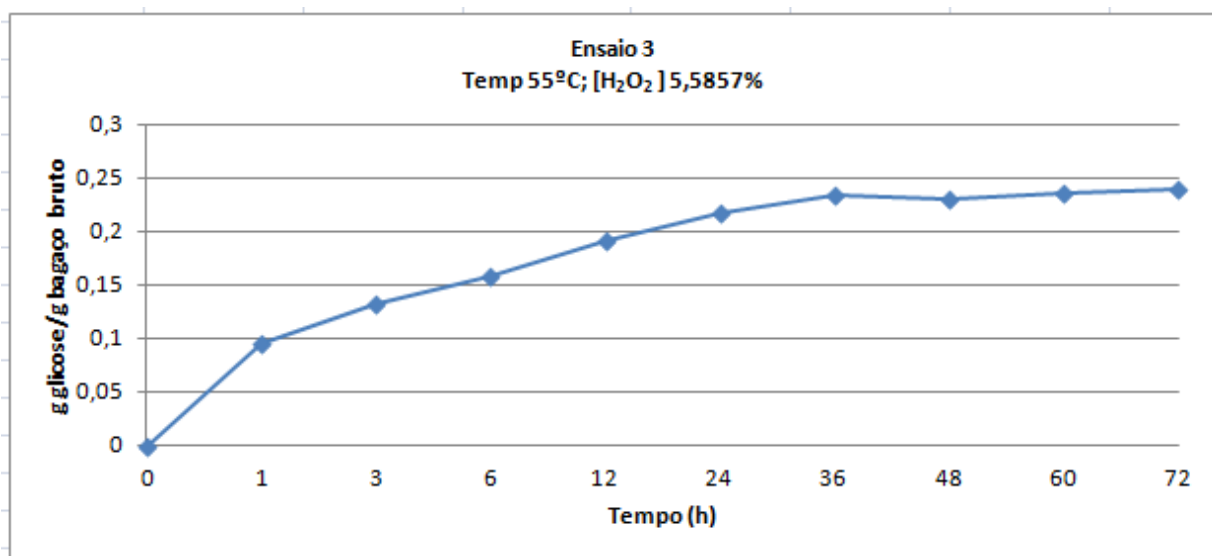


Figura 4.3.3

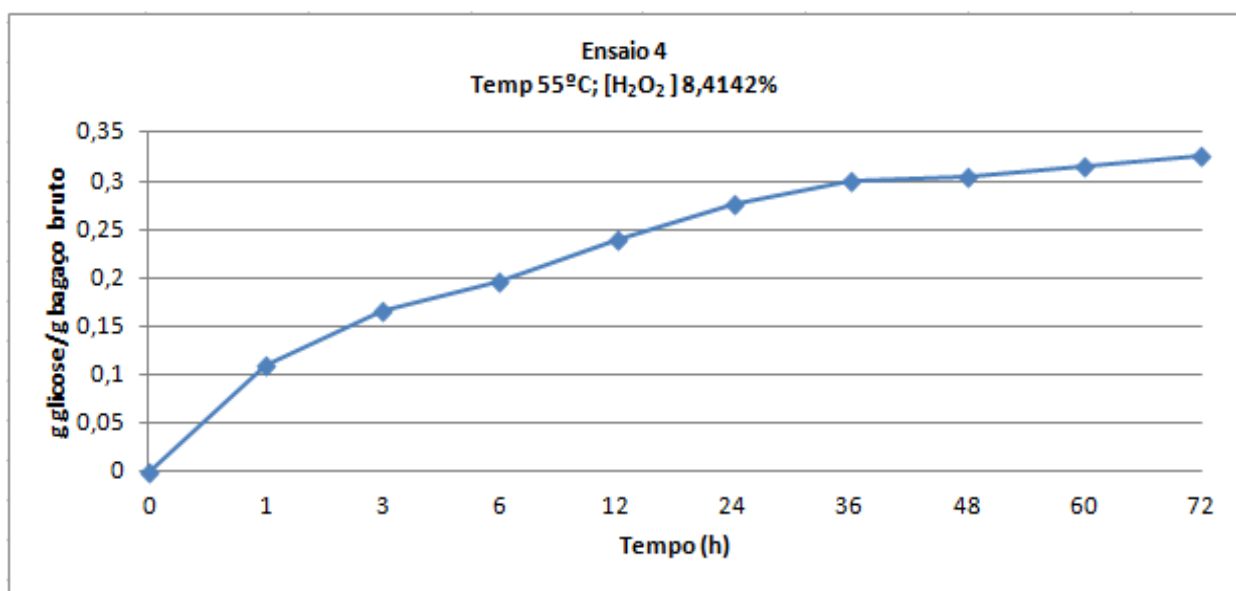


Figura 4.3.4

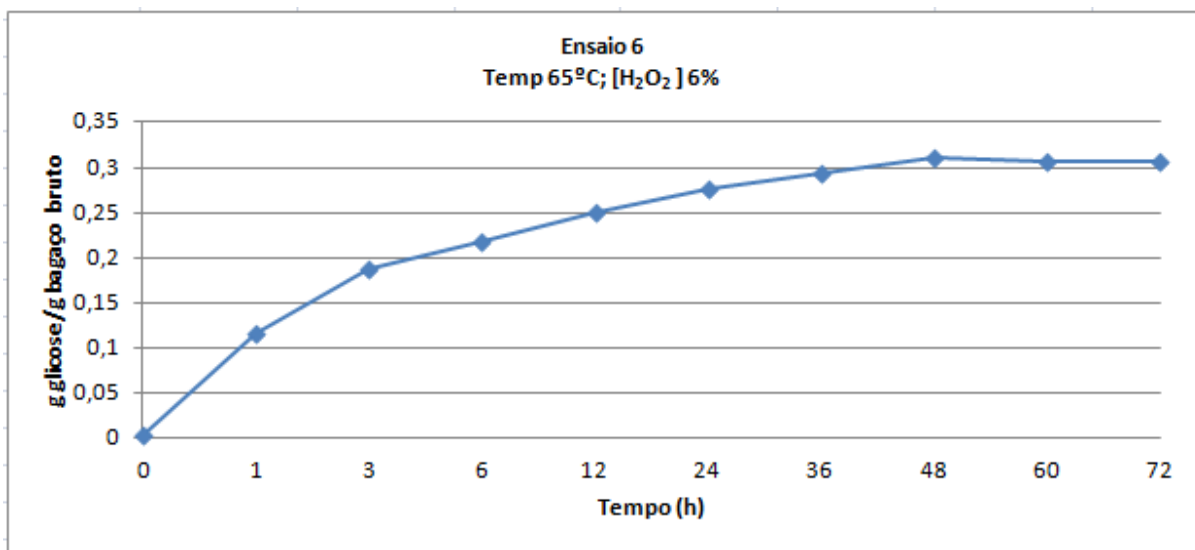


Figura 4.3.5

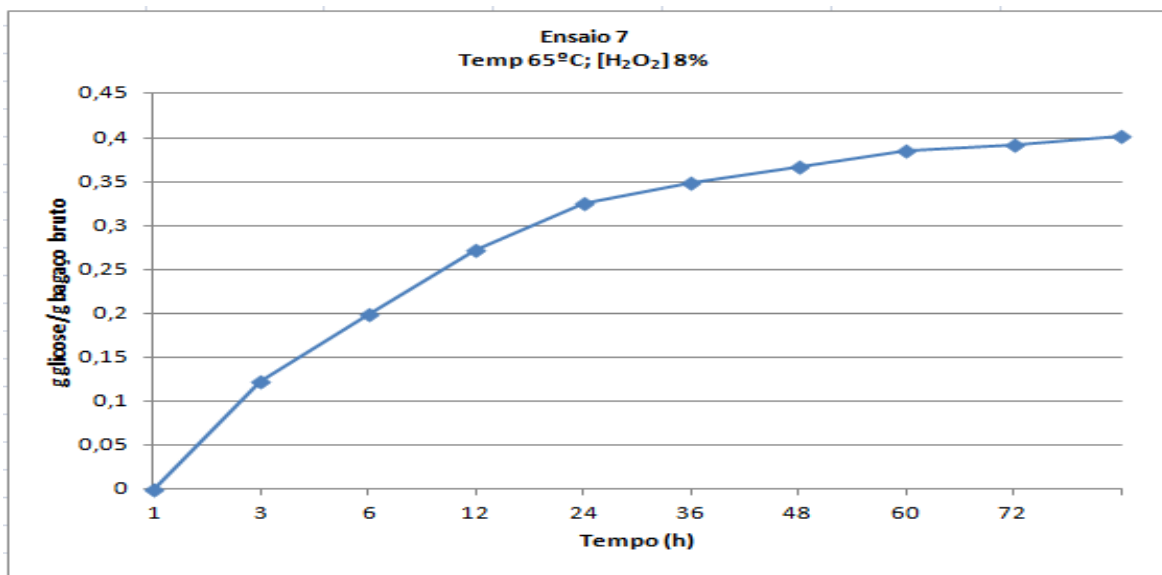


Figura 4.3.6

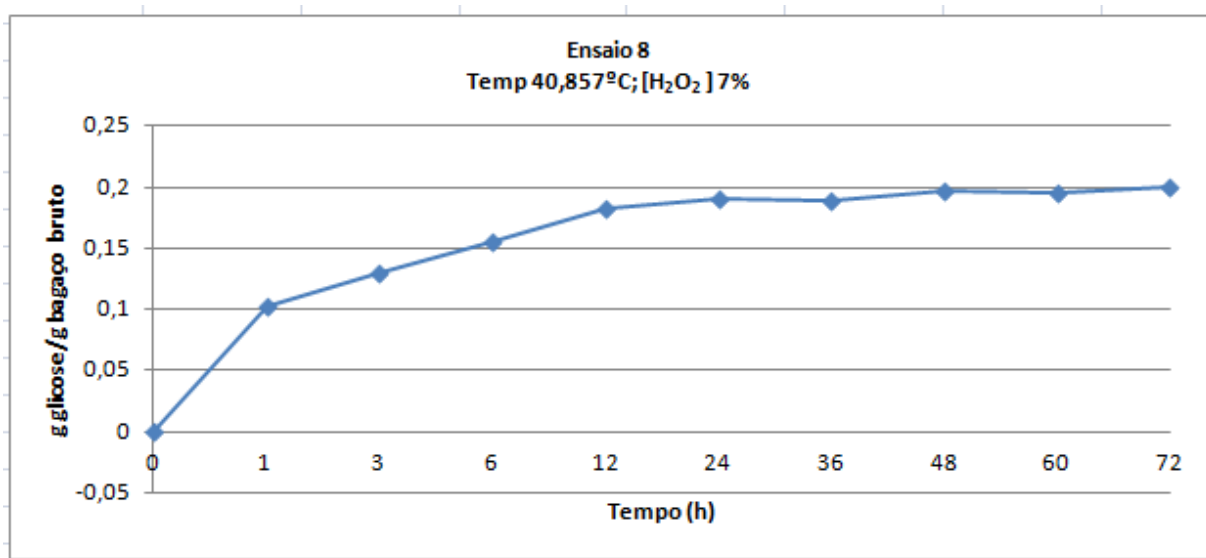


Figura 4.3.7

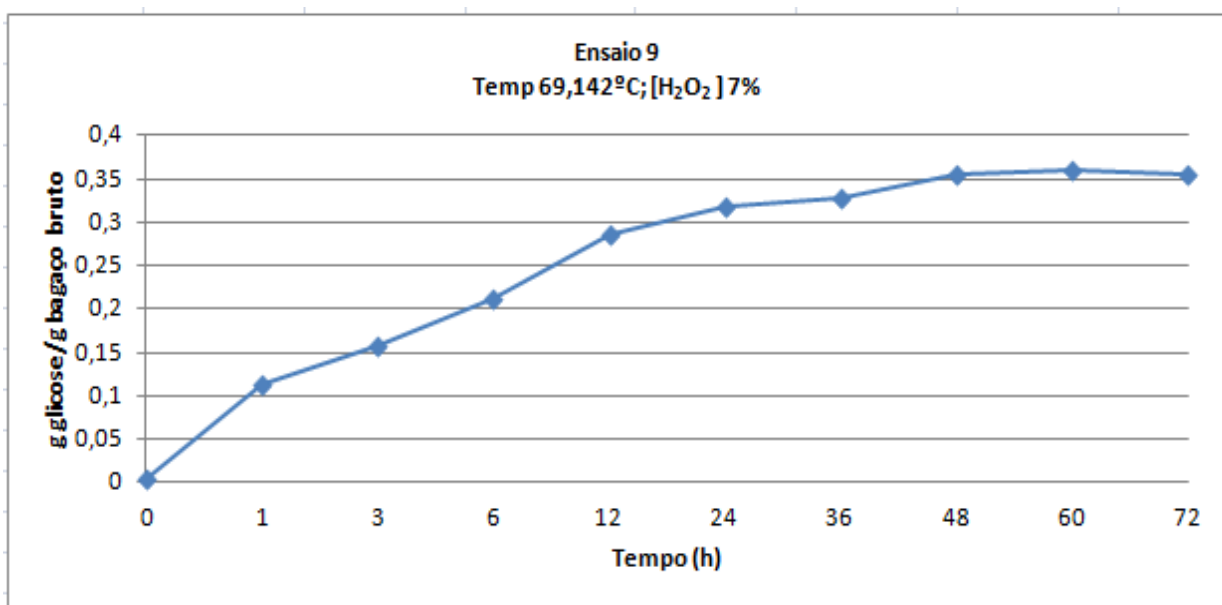


Figura 4.3.8

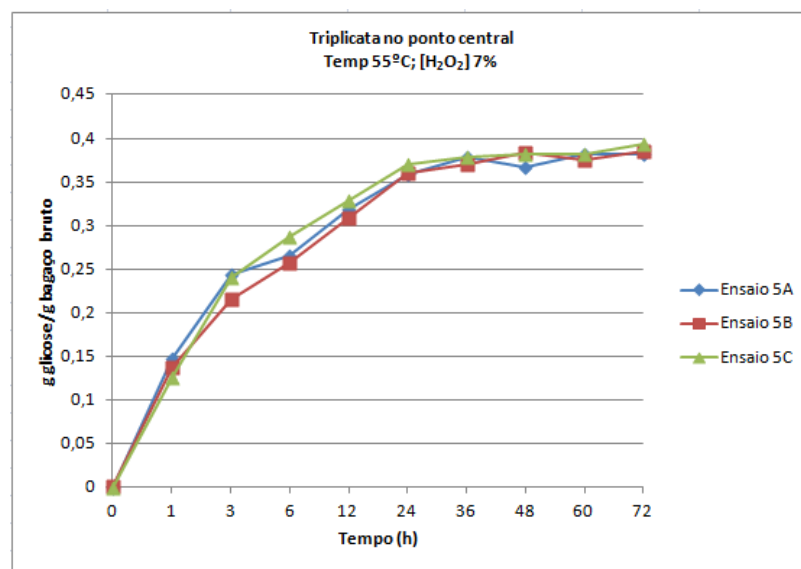


Figura 4.3.9

Figuras 4. 3: Perfis de hidrólise dos ensaios do planejamento estrela

Os dados do planejamento foram analisados pelo software Statistica 7.0. Os resultados obtidos constam na tabela 4.10.

	Efeito	Erro Puro	t(2)	p
Média	0,384604	0,000823	467,3022	0,000005
(1) Concentração de Peróxido (L)	0,070948	0,001008	70,3791	0,000202
(2) Concentração de Peróxido (Q)	-0,086121	0,001200	-71,7659	0,000194
(3) Temperatura (L)	0,099726	0,001008	98,9339	0,000102
(4) Temperatura (Q)	-0,092351	0,001200	-76,9752	0,000169
1(L)*2(L)	0,012843	0,001426	9,0089	0,012098

Tabela 4. 10 - Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento estrela, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g bagaço bruto) produzida. Todos os efeitos são significativos a 90% de confiança

O gráfico de Pareto é apresentado na figura 4.4.

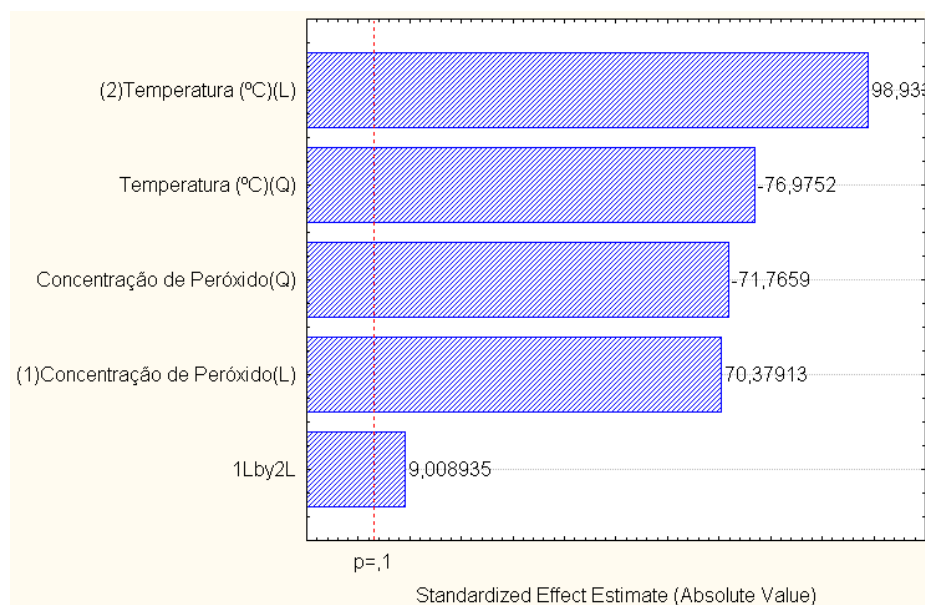


Figura 4. 4 Gráfico de Pareto para os efeitos dos fatores na concentração de glicose em g glicose/g bagaço bruto considerando nível de confiança de 90%. Efeito padronizado (efeito dividido pelo erro padrão).

A análise da tabela 4.10 e do gráfico de Pareto (figura 4.4) permite afirmar que todos os efeitos principais são significativos a 90% de confiança, assim como a interação.

A tabela 4.11 mostra a tabela ANOVA para o modelo, obtida usando o software Statistica 7.0.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	0,047531	5	0,009506	22,55
Resíduo	0,002108	5	0,000422	350,67
Falta de Ajuste	0,002104	3	0,000701	
Erro Puro	0,000004	2	0,000002	
Total	0,049639	10		

Tabela 4. 11 - Análise da Variância para o modelo de concentração de glicose em g glicose/g bagaço bruto.

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística do modelo

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

*F(tab.)5,5 = 3,45 no nível de confiança de 90% para a regressão

*F(tab.)3,2 = 9,16 no nível de confiança de 90% para a falta de ajuste

De acordo com a tabela 4.11, de Análise de Variância (ANOVA), pode-se observar que o valor do teste F calculado de 22,55 é superior ao tabelado $F_{5,5}(\text{Tab.})=3,45$, demonstrando que o modelo apresenta significância estatística. O valor de 350,67, calculado para $F_{3,2}$, no entanto, é maior do que o $F_{3,2}(\text{tab.})=9,16$, e logo o modelo apresenta evidência de falta de ajuste, não podendo ser usado para fins de otimização. Pode, no entanto, ser usado para uma avaliação qualitativa do comportamento da resposta com os fatores, como pode ser visto na superfície de resposta traçada na Figura 4.5.

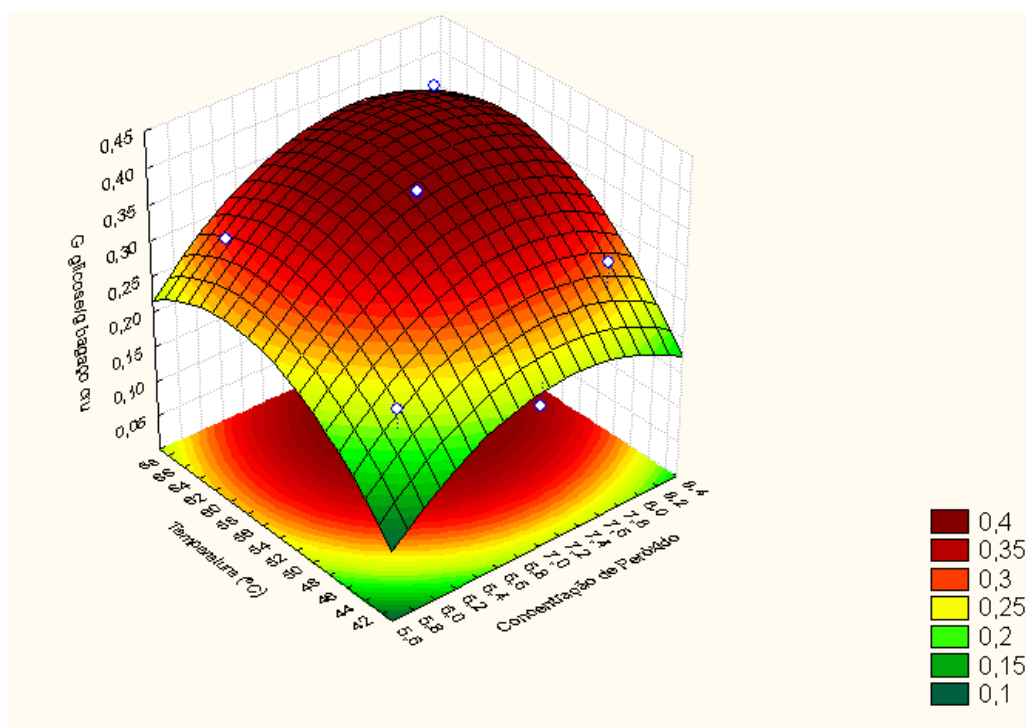


Figura 4.5 - Superfície de resposta da concentração de glicose (g/g bagaço bruto) em função da temperatura (°C e da concentração de peróxido (%v/v).

Como não podemos usar o modelo estatístico para fins de otimização, já que este mostrou evidência de falta de ajuste, consideramos como ponto ótimo o ensaio 7 da matriz de planejamento (Tabela 4.8), quando o pré-tratamento foi realizado a 65°C e com concentração de peróxido de 8%, que levou a um rendimento global de 94.84% após a hidrólise. Outro ponto de interesse são os ensaios do ponto central (5A-C), quando o pré-tratamento foi feito a 55°C e com 7% de peróxido, obtendo-se rendimento global de $90.87 \pm 0.33\%$.

Foi realizada a análise da composição do bagaço pré-tratado em todos os ensaios da matriz de planejamento (Tabela 4.9) e os balanços de massa estão mostrados nas Tabelas 4.12; 4.13; e 4.14.

Massa	Antes do pré-tratamento 100g	Depois do pré-tratamento			
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
		61,19g	64,05g	61,49g	61,22g
Cinzas	2,32	-	-	-	-
Celulose	38,09	37,58	38,05	38,05	37,55
Hemicelulose	18,91	12,05	13,00	11,89	14,07
Lignina	23,02	10,52	12,01	11,07	8,85
Extrativos	9,64	-	-	-	-
Outros	8,02	1,04	0,99	0,48	0,75

Tabela 4. 12 - Balanço de massa para os ensaios 1, 2, 3 e 4 do planejamento estrela.

Massa	Antes do pré-tratamento 100g	Depois do pré-tratamento		
		Ensaio 5A	Ensaio 5B	Ensaio 5C
		61,38g	61,39g	61,58g
Cinzas	2,32	-	-	-
Celulose	38,09	38,06	38,05	38,02
Hemicelulose	18,91	12,31	12,45	12,57
Lignina	23,02	9,63	9,32	9,53
Extrativos	9,64	-	-	-
Outros	8,02	1,38	1,57	1,46

Tabela 4. 13 - Balanço de massa para os ensaios 5A, 5B e 5C do ponto central, do planejamento estrela.

Massa	Antes do pré-tratamento 100g	Depois do pré-tratamento			
		Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9
		62,44g	59,51g	63,3g	62,71g
Cinzas	2,32	-	-	-	-
Celulose	38,09	37,92	38,02	37,82	38,02
Hemicelulose	18,91	12,2	11,82	12,58	12,00
Lignina	23,02	11,85	8,49	11,41	11,09
Extrativos	9,64	-	-	-	-
Outros	8,02	0,47	1,18	1,49	1,60

Tabela 4. 14 - Balanço de massa para os ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento estrela.

As Tabelas 4.15. 4.16, 4.17 foram montadas a partir das Tabelas 4.11 a 4.13 e mostram as perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina, em porcentagem, para cada um dos ensaios da matriz de planejamento.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Massa (%)	38,81	35,95	38,51	38,78
Celulose(%)	1,34	0,11	0,11	1,42
Hemicelulose (%)	36,28	31,25	37,12	25,59
Lignina (%)	54,30	47,83	51,91	61,56

Tabela 4. 15 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 1, 2, 3 e 4 do planejamento estrela.

	Ensaio 5A	Ensaio 5B	Ensaio 5C
Massa (%)	38,62	38,61	38,42
Celulose(%)	0,08	0,11	0,18
Hemicelulose (%)	34,90	34,16	33,53
Lignina (%)	58,17	59,51	58,60

Tabela 4. 16 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 5A, 5B e 5C (pontos centrais) do planejamento estrela.

	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9
Massa (%)	37,56	40,49	36,70	37,29
Celulose(%)	0,45	0,18	0,71	0,18
Hemicelulose (%)	35,48	37,49	33,47	36,54
Lignina (%)	48,52	63,12	50,43	51,82

Tabela 4. 17 - Perdas de massa, celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios 6, 7, 8 e 9 do planejamento estrela.

Pode-se notar que a maior perda de massa se deu no ensaio 7, sendo de 40,49%, o que significa que após o pré-tratamento de 100g de bagaço bruto, recupera-se apenas 59,51g de bagaço pré-tratado. A maior perda de celulose aconteceu no ensaio 4, sendo de 1,42%, bastante baixa. As menores perdas foram nos ensaios 2 e 3, sendo de 0,11% para os dois ensaios, seguidas pela perda nos ensaios do ponto central, que foi de $0,12 \pm 0,05\%$. As maiores perdas de hemicelulose e lignina foram no ensaio 7, sendo de 37,49 e 63,12%, respectivamente, seguidas, no caso da hemicelulose, pela perda no ensaio 3, que é de 37,12% e, no caso da lignina, do ensaio 4, com perda de 61,56% e dos ensaios do ponto central, com perda de $58,76 \pm 0,69\%$ de lignina.

As tabelas 4.18 a 4.20 mostram a composição do bagaço pré-tratado nos diferentes ensaios do planejamento.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
% Celulose	61,42	59,41	61,88	61,34
% Hemicelulose	19,69	20,30	19,34	22,98
%Lignina	17,19	18,75	18,00	14,46
Hemicelulose + Lignina	36,88	39,05	37,34	37,44

Tabela 4. 18 Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 1, 2, 3 e 4 da matriz de planejamento.

	Ensaio 5A	Ensaio 5B	Ensaio 5C
% Celulose	62,01	61,98	61,74
% Hemicelulose	20,06	20,28	20,41
%Lignina	15,69	15,18	15,48
Hemicelulose + Lignina	35,75	35,46	35,89

Tabela 4. 19 - Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 5A, 5B e 5C (pontos centrais) da matriz de planejamento.

	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9
% Celulose	60,73	63,89	59,75	60,63
% Hemicelulose	19,54	19,86	19,87	19,14
%Lignina	18,98	14,27	18,03	17,68
Hemicelulose + Lignina	38,52	34,13	37,90	36,82

Tabela 4. 20 - Composição do bagaço pré-tratado para os ensaios 6, 7, 8 e 9 da matriz de planejamento.

Observando-se as tabelas 4.18, 4.19 e 4.20 pode-se notar que o bagaço pré-tratado com maior porcentagem de celulose e com menor porcentagem de lignina é o resultante do ensaio 7, que teve o maior rendimento global de glicose após a hidrólise. A porcentagem de hemicelulose no bagaço obtido neste ensaio também está entre os valores mais baixos e a porcentagem de hemicelulose+lignina é a mais baixa. O bagaço pré-tratado resultante dos ensaios de ponto central (5 A-C) foi o que levou ao segundo maior rendimento global de glicose após a hidrólise, sendo o que tem a segunda maior porcentagem de celulose, mas não o que tem as segundas menores porcentagens de hemicelulose ou lignina separadamente. Mas, pode-se observar na tabela 4.18 que

os ensaios de ponto central são os que apresentam a segunda menor porcentagem da soma de hemicelulose e lignina.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Com a utilização das técnicas de planejamento de experimentos (planejamento linear, determinação do caminho de máxima inclinação e da região do ótimo e planejamento em estrela em torno do ótimo) foi possível determinar as condições ótimas para pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino com 15% de sólidos para hidrólise realizada com 3% de sólidos e carga enzimática de 15 FPU/g bagaço de celulose e 25 CBU/g bagaço de β -glicosidase.

O peróxido se mostrou um agente de pré-tratamento eficiente, possibilitando altos rendimentos com baixo tempo de pré-tratamento e baixas temperaturas, embora a concentração de peróxido ainda seja alta. RABELO (2007) trabalhou com concentração de peróxido de 7% e 4% de sólidos no pré-tratamento, obtendo 0,3740 g glicose/g bagaço bruto, correspondentes a um rendimento de 84,07% quando a hidrólise foi realizada com 0,33% de sólidos e carga enzimática de 3,47 FPU/g bagaço de celulase e 1,01 CBU/g bagaço de β -glicosidase. Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios para experimentos com 7% de peróxido utilizando 15% de sólidos no pré-tratamento, com aumento de temperatura de 25 para 55°C, obtendo-se assim $0,3846 \pm 0,0014$ g glicose/ g bagaço bruto, correspondendo a rendimento de $90,87 \pm 3,3\%$. Em um trabalho posterior Rabelo (2010) melhorou o rendimento obtido para as mesmas condições de pré-tratamento aumentando a concentração de β -glicosidase na etapa de hidrólise e chegou a praticamente 100% de rendimento trabalhando com 1% de sólidos na hidrólise, 3,5 FPU/g de bagaço de celulase e 25 CBU/g de β -glicosidase. Embora Rabelo (2010) tenha realizado ensaios com o pré-tratamento realizado até 15% de sólidos, usou as condições que foram otimizadas para 4% de sólidos e obteve rendimento de 64,7%.

A concentração de peróxido no pré-tratamento nos trabalhos de Rabelo (2007 e 2011) corresponde a 1,84 mL de peróxido/g bagaço ou 2,71g peróxido/g bagaço.

No trabalho de GARCIA (2009), as condições de pré-tratamento com maior rendimento foram 8% de sólidos a 25°C com 11% v/v de peróxido, com rendimento de 0,36 g glicose/g bagaço bruto. A concentração de peróxido no pré-tratamento para o trabalho de Garcia (2009) corresponde a

2,03g peróxido/g bagaço ou 1,375 mL peróxido/g bagaço. No presente trabalho, para o pré-tratamento a 55°C com 7% v/v de peróxido de hidrogênio alcalino foram usados 0.47 mL de peróxido/ g de bagaço ou 0.69 g de peróxido/g bagaço, o que diminui bastante a quantidade de peróxido necessária para o pré-tratamento de uma determinada quantidade de bagaço.

A tabela C.1, no Apêndice C, representa a comparação entre os melhores resultados obtidos pelos trabalhos anteriores e o presente trabalho.

Sugestões de trabalhos futuros

Como sugestão de trabalhos futuros, sugere-se o desenvolvimento e aprofundamento do aprendizado desenvolvido nesta dissertação de mestrado, como explicitado a seguir:

- Análise de viabilidade econômica do pré-tratamento nestas condições
- Estudo da influência das concentrações de celulase e beta no processo de hidrólise
- Determinação das condições ótimas de pré-tratamento para hidrólise em altas concentrações de sólidos (entre 10 e 15% de sólidos)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, AK. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Prog Energy Combustion Sci*, n.33, p.233-71, 2007.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJO,M., NEGRO, M.J. Pretreatment techonologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.

ASTM E1721. Test Method for the Determination of Acid-Insoluble Residue in Biomass, American Society for Testing and Materials, U.S.A, 1-3, 1995.

ASTM E1758. Standard Test Method for the Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography in Biomass. American Society for Testing and Materials, U.S.A, 1-5, 1996.

BADHAN, A.K., CHADHA, B.S., KAUR, J., SAINI, H.S., BHAT,M.K. Production of Multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus Myceliophthora sp. *Bioresource Technology*, n.98, p.504-510, 2007.

BALAT, M., BALAT, H., ÖZ. Progresso in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, n.34, p.551-573, 2008.

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

BAZÀN, JUAN HERALDO VILOCHE. Estudo de produção enzimática da dextrana clínica. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993. Dissertação (Mestrado).

BOUSSARSAR, H., ROGÉ, B., MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource technology*, n.100, p.6537-6542, 2009.

BOWES, B.G., MAUSETH, J.D. *Plant Structure – a Color Guide*. Jones and Bartlett Publishers, 2008, 2ª edição.

BURANOV, A.U., MAZZA, G. Lignin in Straw of Herbaceous Crops. *Ind. Crops and Prod.*, n. 28, p. 237-259, 2008.

CANILHA, L., MILAGRES, A.M.F., SILVA, S.S., ALMEIDA E SILVA, J.B., FELIPE, M.G.A., ROCHA, G.J.M., FERRAZ, A., CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analytca*, n.44, p.48-53, 2010.

CASTAÑEDA AYARZA, JUAN ARTURO. Alternativa para aumentar a produção mundial do Etanol Anidro combustível no Curto Prazo: O Potencial dos Mês da Cana. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

CCGE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. Disponível em:

www.ccge.org.br Acesso em 12.10.2011.

CHANDRA, R.P., BURA, R., MABEE, W.E., BERLIN, A., PAN, X., SADLEER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocelluloses? *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, n.108, p.67–93, 2007.

CHEN, M., ZHAO, J., XIA, L. Comparison of four different chemicals pretreatment of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and energy*, n.33, p. 1381-1385, 2009.

CHESF. Fontes Energéticas Brasileiras – Inventário/Tecnologia: Bagaço de Cana-de-Açúcar. Pernambuco, 438p., 1987.

CLARKE, M.A., GODSHAL, M.A. *Chemistry and Processing of Sugarbet and Sugarcane*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam; 1988.

D ALMEIDA, M.L.O. Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. In: Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo., 2ª. Ed., vol.1,1998.

DWIVEDI, P., ALAVALAPATI, J.R.R., LAL, P. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion Technologies, current production status, economics, and emerging developments. Energy for Sustainable Development, n.13, p.174-182, 2009.

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

ESCOBAR, J. C., LORA, E. S., et al. Biofuels: environment, technology and food security. Renewable and Sustainable Energy Reviews, n.13, p. 1275-1287, 2009.

FAN, L.T., LEE, Y.H., GHARPURAY, M.M. The nature of lignocelullosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Adv. Biochem. Eng., n.23, p. 157-187,1982.

FENGEL, D., WENEGER, G. Wood Chemistry, Ultrastruture, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

FERRAZ, A., BAEZA, J., RODRIGUEZ, J., FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus Wood by DRIF spectroscopy and multivariate analysis. Bioresource Technology, n.74, p.201, 2000.

FAO - Food and Agriculture Organization. “Biofuels and Agriculture- A Technical Overview”. Disponível em:

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e02.pdf>. Acesso em 12.10.2011

FAO - Food and Agriculture Organization “Forests and Energy on Developing Countries”. Disponível em:

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/k1140e/k1140e00.pdf>. Acesso em 12.10.2011.

FRATZEL, P. Cellulose and Collagin: from fibers to tissue. Colloid and Interface Science., n.8, p.32-39, 2003.

FUENTES, LAURA LILIAN GARZÓN. Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GARCIA, DANIELA DOS REIS. Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

GHARPURAY M.M., LEE, Y.H., FAN, L.T. Structural Modification of Lignocellulosics by Pretreatments to Enhance Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, n.25(1), p.157:172, 1983.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl. Chem.*, n.59, p. 257-268, 1987.

GNANSOUNOU, E., DAURIAT, A. *Techno economic analysis of lignocelulosic ethanol: a review*. *Biores.Techn.*, n. 101, p. 4980-4991, 2010.

GOLDENSTEIN, M., AZEVEDO, R.L.S.. “Combustíveis alternativos e inovações no setor automotivo: será o fim da Era do Petróleo?”, in BNDES, disponível em

http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2308.pdf, acesso em 12.10.2011.

GOODWIN, T.W., MERCER, E.I. *Introduction to plant Biochemistry*. 2ª, Pergamon Press, New York, 343p, 1974.

GOULD, M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, n. 26(1), p. 46-52, 1984.

GOULD, M. Studies on the Mechanism of Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues. *Biotechnology and Bioengineering*, n. 27(3), p. 225-23, 1985.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, n.24, 2006.

HAMELINCK, C.N., HOOIJDONK, G.V., FAALJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-,middle- and lon term. *Biomass and Bioenergy*, n.28, p.384-410, 2005.

HENDRIKS, A.T.W.M., ZEEMAN, G. *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*, n.100, p.10–18, 2009.

HENRISSAT, B., TEERI, T.T., WARREN, R.A.J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*, n.425, p-352-354,1998.

HUGOT,E. *Handbook of Cane Sugar Engineering*. Sugar Series 7. Elsevier, 1986.

HSU, T.A. Pretreatment of Biomass. In: Wyman, C.E. (Ed.), *Handbook on Bioethanol Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington, DC, 1996.

HSU, T.A., LADISCH, M.R., TSAO, G.T. Alcohol from Cellulose. *Chemical Technology*, n.10(5), p. 315-319, 1980.

HU, G., HEITMANN, J.A., ROJAS, O.J. Feedstocks pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark and forest residues. *BioResources*, n.3 (1), p.270–294, 2008.

HYMAN, D., SLUITER, A., CROCKER, D., JOHNSON, D., SLUITER, J., BLACK, S., SCARLATA, C. Determination of acid-soluble lignin concentration curve by UV-VIS spectroscopy. National Renewable Energy Laboratory, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Dados de área plantada de Cana-de-açúcar 2009/2010, disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201008_5.shtm.

Acesso em 12.10.2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Safra de Cana-de-açúcar 2009/2010. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201008_4.shtm.

Acesso em 12.10.2011.

KAAR, W.E., GUTIERREZ, C.V., KINOSHITA, C.N. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment from conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, n.14, p. 277-287, 1997.

KONG, F., ENGLER, C.R., SOLTES, E.J. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen Wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n.34/35, p. 23-35, 1992.

KUBICEK, C.P. The cellulose proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, n.45, p.1-27, 1992.

KUMAR, P., BARRET, M.J., STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomassa for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, n.48, p.3713-3729, 2009.

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

LEME, J.JORGE.,BORGES, M.JOSÉ. Açúcar da Cana. Universidade Rural do Estado de Minas Gerais. Viçosa, 1985.

LENÇO, PAULO CESAR. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar para geração de energia. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Mestrado).

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

LUO, L., VAN DER VOET, E., HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costin of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n.13, p.1613-1619, 2009.

MANSFIELD, S.D., MOONEY, C., SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristitcs the limite cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Progr.*, n.5, p.804-816, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>

Acesso em 19/11/2011.

- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, n.96, p.673–686, 2005.
- MULLER, Z.O. Feeding potential of crop residues in Pakistan. In: *Recycling of organic waste for production purposes. Coordinated National Program for Livestock and Dairy Development. Paquistão*, 1978.
- MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F., ROBERTO, I.C. Effect of Hemicellulose and Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Brewer's Spent Grain. *Enzyme and Microbial Technology*. n.43, p.124-129, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Biobased Industrial Products, Biobased Industrial Products – Priorities for Research and Commercialization. National Academy Press, 1999.
- NIGAM, P.S., SINGH, A. "Production of liquid biofuels from renewable resources". *Progress in Energy and Combustion Science*, n. 37-1, p. 52-68. 2011
- NLEWEM, K.C., TRASH JR, M.E. "Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass". *Bioresource Technology*, n.101, p. 5426–5430, 2010.
- NOBEL, P.S. *Plant Physiology*. Academic Press, 1999.
- OKAMURA, K. Structure of Cellulose. In: *Wood and Wood Cellulosic Chemistry*. 10^a. Marcel Decker Inc, 977p, 1990.
- ÖHGREN, K., BURAR, R., SADDLER, J., ZACCHI, G. Effect of Hemicellulose and Lignin Removal on Enzymatic Hydrolysis of Steam Pretreated Corn Stover. *Bioresource Techn.*, n.98, p.2503:2510, 2007.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R. Economic Utilization of Crop Residues for Value Addition: a Futuristic Approach. *Journal of Scientific and Industrial Research*, n. 59, p.12-22, 2000(a).
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, n.74, p.69-80, 2000(b).

PATURAU, J.M. By-product of the Cane Sugar Industry – an Introduction to their Industrial Utilization. 3^a. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.

RABELO, SARITA CÂNDIDA.C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

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

RABELO, S.C., FILHO, R.M., COSTA, A.C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. Appl. Biochem. Bioethanol, n.144, p.87-100, 2008.

SANTOS, J.R.A., GOUVEIA, E.R. Produção de Bioetanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, n.11, p.27-33, 2009.

SEGEL, I.H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: John Wiley. Cap I: Enzymes as biological catalysts, p.1-17, 1975.

SEWALT, V., GLASSER, W., BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. J. Agric. Food Chem., n.45, p.1823-1828, 1997.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of total solids in biomass. National Renewable Energy Laboratory. 2005a.

SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. National Renewable Energy Laboratory. 2005b.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory. 2008.

SPENCER, E.F., MEADR, G.P. Manual del azúcar de Caña. Tradução de M.G. Menocal. Barcelona: Montaner y Simón; 1967.

- SOUSA, L.C., CHUNDAWAT, S.P.S., BALAN, V., DALE, B.E. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelluloses pretreatment technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.*, n.20, p.1–9, 2009
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. *Biosource Technology*, n.83(1), p.1-11, 2002.
- SUN, R., LAWOTHER, J.M., BANKS, W.B. A Tentative Chemical Structure of Wheat Straw Lignin. *Industrial Crops and Products*, n.6, p.1-8, 1997.
- TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogás production: a review. *Int.J. Mol. Sci.*, n.9, p.1621-1651, 2008.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Editora Armed, 4ª edição, 2009.
- TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, n.15, p.160-167, 1997.
- Tomas-Pejo E, Olive JM, Ballesteros M. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J Sci Ind Res.*, n.67, p.874–84, 2008.
- TEMPLETON, D., EHRMAN, T. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory*, 1995.
- WAN, J., WANG, Y., XIAO, Q. Effects of Hemicellulose removal on cellulose fiber Structure and Recycling Characteristics of Eucalyptus Pulp. *Bioresource Tech.*, n.101, p.4577-4583, 2010.
- WANG, M., WU, M., HUO, H. Life cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environ. Res. Lett.*, n.2, p.1-13, 2007.
- WHEALS, A.E., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., AMORIM, H.V. Fuel Ethanol after 25 years. *Tibtech*, n.17, p.482-487, 1999.
- WINGER, M., CHRISTEN, M., van GUNSTEREN, W.F. On the Conformational Properties of Amylose and Cellulose Oligomers in Solution. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. Article ID 307695:2009.

XIAO, b., SUN, X.F., SUN, R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and Rice straw. *Polymer Degradation and Stability*, n.74, p.307-319, 2001.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, n..22, p.46–60, 2008.

WOOD, T.M., BHAT, K.M. Methods for measuring cellulose activities. W.A.Wood and S.T. Kellog, *Methods in enzymology*, n.160, p.87-116.

APÊNDICE A

Ensaio	Glicose g/L	Rendimento g bagaço pré/ g bagaço cru
1	5,523	0,765
2	6,174	0,648
3	8,382	0,685
4	18,153	0,576
5	7,788	0,554
6	9,252	0,656
7	12,317	0,664
8	11,640	0,846
9A	11,500	0,687
9B	12,117	0,737
9C	11,830	0,795

Tabela A. 1: Dados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 para o tempo de 60 minutos.

Ensaio	Glicose g/L	Rendimento g bagaço pré/ g bagaço cru
1	2,193	0,799
2	5,857	0,859
3	4,624	0,654
4	11,749	0,599
5	4,785	0,646
6	5,953	0,670
7	4,147	0,711
8	14,649	0,533
9A	9,206	0,849
9B	7,616	0,806
9C	10,518	0,737

Tabela A. 2: Dados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 para o tempo de 90 minutos.

APÊNDICE B

Ensaio	Concentração(g/L)									
	Tempo: 0	Tempo: 1 hora	Tempo: 3 horas	Tempo: 6 horas	Tempo: 12 horas	Tempo: 24 horas	Tempo: 36 horas	Tempo: 48 horas	Tempo: 60 horas	Tempo: 72 horas
1	1,762	5,4	8,59	9,814	10,099	10,273	10,641	11,173	11,243	11,329
2	2,108	4,321	6,658	8,739	11,336	12,165	13,359	13,799	13,824	14,023
3	2,014	3,833	5,572	7,421	8,392	9,896	10,952	11,222	11,44	11,763
4	2,01	4,513	6,869	10,069	12,709	13,836	14,766	15,772	15,796	16,024
5A	1,91	5,051	11,047	13,056	15,392	16,51	17,613	18,262	18,44	18,718
5B	1,908	5,058	11,046	13,055	15,386	16,507	17,279	18,444	18,445	18,819
5C	1,909	5,061	11,04	13,055	15,382	16,516	17,674	18,149	18,462	18,79
6	1,783	4,663	8,703	11,11	12,031	12,895	13,822	14,432	14,636	14,769
7	2,307	4,745	11,43	15,835	17,536	18,601	19,401	20,071	20,094	20,235
8	1,984	3,858	5,048	5,955	7,066	7,873	8,445	9,33	9,363	9,469
9	1,757	5,599	9,032	10,626	12,661	14,461	15,394	16,508	16,751	17,021

Tabela B. 1: Dados obtidos para Concentração de glicose (g/L) e rendimento do pré-tratamento para o Planejamento estrela

APÊNDICE C

	Pré-tratamento	Rendimento g glicose/g bagaço bruto
Rabelo, 2007	4% de sólidos, 7,36% de peróxido de hidrogênio	0,374
Garcia, 2009	8% de sólidos, 11% de peróxido de hidrogênio	0,36
Presente trabalho	15% de sólidos, 7% de peróxido de hidrogênio	0,4014

Tabela C.2: Tabela comparativa entre os melhores resultados dos trabalhos anteriores e o presente trabalho.