

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**



**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR CONSIDERANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Autora:

Olga Lucia Bayona Ayala

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-orientadora: Dra. Sarita Cândida Rabelo

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como
Parte dos requisitos exigidos para a
Obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

**Campinas - São Paulo
Junho 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Bayona Ayala, Olga Lucia

B345a Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol / Olga Lucia Bayona Ayala. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.

Coorientador: Sarita Cândida Rabelo.

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

1. Biomassa. 2. Aproveitamento energético. 3. Hidrólise. I. Costa, Aline Carvalho da. II. Rabelo, Sarita Cândida. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation of pretreatments for the enzymatic hydrolysis of sugar cane straw considering the production of ethanol

Palavras-chave em Inglês: Biomass, Energy utilization, Hydrolysis

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Vera Lucia Reis de Gouveia, Jose Geraldo da Cruz Pradella

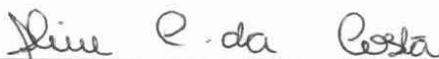
Data da defesa: 11-06-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Olga Lucia Bayona Ayala

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR CONSIDERANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL**

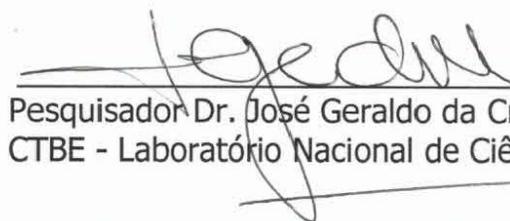
Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como
Parte dos requisitos exigidos para a
Obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.
Aprovação em 11/06/2012.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas



Pesquisadora Dra. Vera Lúcia Reis de Gouvêa
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol



Pesquisador Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol.

Campinas

2012



Olga Lucia Bayona Ayala

**AVALIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR CONSIDERANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL**

Este Exemplar Corresponde À Versão Final Da Dissertação De Mestrado Em Engenharia
Química

Aline C. da Costa

Profª. Dra. Aline Carvalho da Costa (Orientadora)

Campinas

2012

“Me gustan mis errores. No quiero renunciar a la deliciosa libertad de equivocarme

Charles Chaplín”

“Precisamos-nos de uma nova forma de pensar, para resolver os problemas gerados pela antiga forma de pensar”.

Albert Einstein.

DEDICATÓRIA

Dedico este meu trabalho a quem me deu a vida, a Deus,

Aos seres humanos mais maravilhosos do mundo que ele escolheu na terra

Meus pais Luís Jose e Alícia, a Jose Luís meu irmão.

A minha prima e amiga Ayda Karina pela confiança

Aos meus anjos do céu, meus avôs Luís Jose e Rosalina (Q.E.P. D).

A minha razão de seguir em frente cada dia de minha vida, Meu amor Leonel.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente a todas aquelas pessoas, com as quais sem seu apoio e colaboração não seria possível ser realizado este trabalho.

À minha família, aos meus pais Luis Jose e Alicia pelo amor, pela ajuda econômica e emocional, e ao meu irmão Jose Luis pelo apoio e carinho, a minhas tias Lilia e Lucila por serem aquelas mulheres motivadoras e caridosas cada dia, às minhas primas Ayda Karina e Magaly pela força mesmo na distância, pela confiança e o exemplo de ir em frente sempre nunca pensar em voltar.

À Deus por ter me permitido culminar satisfatoriamente uma etapa mais na minha vida.

À minha orientadora, a Professora Dra. Aline Carvalho da Costa pela oportunidade e a minha Co-orientadora a Dra. Sarita Cândida Rabelo pelo conhecimento e motivação.

À CNPQ pelo suporte financeiro.

À minha colega e amiga do LEPFE Luiza muito obrigada pela amizade e por tantas noites de trabalho árduo, forte e difícil, vou lembrar-me de você sempre.

À Monica, Jairo e German pela acolhida na sua casa.

A todos os amigos, especialmente a Vinicius, Jaiver, pela companhia pelo carinho e pela incondicionalidade, além de amigos vocês foram minha família aqui no Brasil.

A Laura, Julian, Lia, Henderson, Anna, Tonny, Giselle, Bianca, Michele, Edison, Marcio, Astrid, Guillermo, e Maria Isabel pela companhia e amizade. Obrigada por tantos momentos inesquecíveis vividos.

Aos colegas do LOPCA/LDPS/BIOEN/UNICAMP Betânia, Patrícia F., Laura P., Leonardo, Betania, e Paulinha pela amizade, atenção, colaboração e empréstimo dos equipamentos. Ao Leonel pelas sugestões, pelo imenso apoio e amor, e por compartilhar juntos esta aventura chamada "Mestrado".

RESUMO

A palha da cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico que pode ser usado na produção de etanol através da hidrólise deste material e da fermentação dos açúcares resultantes. Neste trabalho, dois tipos de pré-tratamento, peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio (cal), foram avaliados para aumentar a susceptibilidade da palha à hidrólise enzimática. Um planejamento experimental 2^3 + configuração estrela com triplicata no ponto central para cada um dos pré-tratamentos foi elaborado considerando as variáveis tempo, temperatura e concentração do reagente no pré-tratamento como fatores e a concentração de glicose obtida após a hidrólise, em g/g de palha de cana, como resposta. As condições ótimas encontradas para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foram 1 h de pré-tratamento a 60°C, usando 0,44 mL de peróxido de hidrogênio/g de palha, em pH 11,5. A solubilização da hemicelulose e lignina foi de 83,10% e 71,85%, respectivamente. A hidrólise enzimática da palha pré-tratada nessas condições levou a um rendimento de glicose de 333 mg/g de palha bruta, equivalente a um rendimento global de 86,97% e a uma conversão na hidrólise de 90,35% quando a hidrólise enzimática foi realizada a 50°C, pH 4,8 e em 48 h com 3% (m/m) de sólidos, empregando uma carga enzimática de 15 FPU de celulase/g de palha seca pré-tratada e 25 CBU de β -glicosidase/g de palha seca pré-tratada. O resultado obtido após a hidrólise da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio nas condições escolhidas como as melhores de pré-tratamento (53h, 90°C e 0,4 g cal/g palha seca) foi de 206 mg glicose/g de palha bruta, correspondendo a um rendimento de glicose global de 53,90% e conversão na hidrólise de 56,58%, quando a hidrólise foi realizada nas mesmas condições usadas para a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio se mostrou mais efetivo em relação à liberação dos açúcares fermentescíveis, além de se trabalhar com uma maior concentração de sólidos quando comparado com o pré-tratamento com hidróxido de cálcio (15% (m/m) e 4% (m/m), respectivamente).

Palavras-chave: palha de cana-de-açúcar, pré-tratamento, peróxido de hidrogênio, hidróxido de cálcio, hidrólise enzimática, etanol de segunda geração.

ABSTRACT

The sugarcane straw is a lignocellulosic waste that can be used to increase the production of ethanol through hydrolysis of this material and fermentation of the sugars produced. In this work, the conditions of two pretreatments, alkaline hydrogen peroxide and calcium hydroxide (lime), were evaluated to enhance the susceptibility of sugarcane straw to enzymatic hydrolysis. A 2^3 central composite design was performed considering pretreatment time, temperature and reagent concentration in the pretreatment as factors and glucose concentration after hydrolysis, in g/g bagasse, as the response. The optimal conditions for the pretreatment with alkaline hydrogen peroxide were 1 h of pretreatment at 60 °C using 0.44 mL (0.65 g) hydrogen peroxide/g straw, at pH 11.5. At these conditions the solubilization of hemicellulose and lignin were of 83.10% and 71.85%, respectively. The enzymatic hydrolysis of the pretreated straw led to a glucose global yield of 86.97% and to hydrolysis conversion of 90.35% when enzymatic hydrolysis was performed at 50 °C, pH 4.8 and 48 hours with 3% (w/w) solids and 15 FPU cellulase / g pretreated straw and 25 CBU β -glucosidase/g pretreated straw. The best results after hydrolysis of straw pretreated with lime in the chosen pretreatment conditions (53.07 h, 90 °C and lime concentration of 0.4 (g/g) dry straw) was of 206 mg glucose/g of raw straw, corresponding to an overall yield of 53.9% and hydrolysis conversion 56.58% when hydrolysis was performed in the same conditions used for peroxide pretreated straw. The alkaline hydrogen peroxide pretreatment was more effective in the release of fermentable sugars, besides working with higher solids concentration as compared with lime pretreatment (15% (w/w) and 4% (w/w), respectively).

Key-words: sugarcane straw, pretreatment, hydrogen peroxide, lime, enzymatic hydrolysis, second generation bioethanol.

SUMÁRIO

Dedicatória	vii
Agradecimentos	viii
Resumo	ix
Abstract.....	x
Sumário.....	xi
Tabela de figuras	xvii
Tabela de tabelas.....	xxi
CAPÍTULO I	xxv
Estrutura da dissertação	xxv
Estrutura da dissertação	xxvi
CAPÍTULO II	xxix
Introdução.....	xxix
Introdução.....	30
CAPÍTULO III	33
Objetivos.....	33
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
CAPÍTULO IV	35
Revisão da literatura.....	35
4.1. Biomassa.....	36
4.2. A cana-de-açúcar	36
4.2.1. A palha de cana-de-açúcar	37
4.3. Composição química da biomassa lignocelulósica	38
4.3.1. Celulose.....	39
4.3.2. Hemiceluloses ou polioses.....	41
4.3.3. Lignina	45
4.3.4. Extrativos	47
4.4. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.....	48
4.5. Pré-tratamento.....	49
4.5.1. Pré-tratamento físico	52
4.5.2. Pré-tratamento biológico.....	52

4.5.3. Pré-tratamento físico-químicos	52
4.5.4. Pré-tratamento químico	53
4.5.4.1. Pré-tratamento alcalino	54
4.5.4.1.1. Pré – tratamento com hidróxido de cálcio (ca(oh) ₂) ou cal.....	55
4.5.4.1.1.1. Modo de ação da cal	55
4.5.1.2. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.....	59
4.6. Formação de inibidores na etapa de pré-tratamento.....	62
4.7. Hidrólise enzimática.....	64
4.7.1. Melhoria na hidrólise enzimática	65
4.7.1.1. Cristalinidade da celulose	66
4.7.1.2. Efeito da lignina	66
4.7.1.3 efeito das hemiceluloses.....	66
4.7.1.4. Substratos	67
4.7.1.5. Atividade da celulase	67
4.7.1.6. Inibição pelo produto final	67
CAPÍTULO V	69
Metodologia experimental	69
5.1. Materiais	70
5.1.1. Reagentes e outros materiais de consumo.....	70
5.2. Equipamentos.....	71
5.3. Biomassa lignocelulósica	72
5.4. Enzimas	72
5.5. Preparação e análise da biomassa	73
5.5.1. Secagem da biomassa	73
5.5.2. Determinação da distribuição do tamanho de partícula na biomassa	73
5.6. Caracterização química da palha da cana-de-açúcar	74
5.6.1. Teor de umidade.....	74
5.6.2. Determinação de cinzas	74
5.6.3 determinação do teor de extrativos.....	75
5.7. Determinação de lignina insolúvel, solúvel e açúcares.	76
5.7.1. Determinação de lignina klason (insolúvel)	77
5.7.2. Determinação de lignina solúvel.....	78

5.7.3. Determinação de carboidratos por cromatografia	79
5.7.4. Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (hmf)	80
5.7.5. Teor de ácido acético.....	81
5.8. Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (mev).....	81
5.9. Análise dos materiais lignocelulósicos por difratometria de raios x (drx)	81
5.10. Análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (ftir).....	82
5.11. Determinação das atividades enzimáticas	83
5.12. Preparação do tampão citrato.....	83
5.12.1. Determinação da atividade da celulase	83
5.12.2. Determinação da atividade da β -glicosidase	84
5.13. Reações do pré-tratamento	85
5.13.1. Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino.....	85
5.13.2. Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio (cal)	87
5.13.2.1. Quantificação do excedente de cal após o pré-tratamento.....	90
5.8. Hidrólise da palha pré-tratada	91
CAPÍTULO VI	93
Resultados e discussões_Do pré-tratamento com peróxidoDe hidrogênio alcalino	93
6.1. Análise de tamanho de partículas da palha de cana-de-açúcar	94
6.2. Caracterização da palha de cana-de-açúcar	95
6.3. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino: planejamento fatorial 2^3+ configuração estrela com triplicata no ponto central.....	96
6.3.1. Caracterização da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino. 98	
6.3.2. Hidrolise enzimática da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.....	101
6.3.3. Análise estatística de produção de glicose (g/g) de palha bruta utilizando planejamento fatorial completo	105
6.3.4. Análises morfológicas da palha de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (mev)	109

6.3.5. Análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (ftir).....	111
6.3.6. Análises do índice de cristalinidade	112
6.3.7. Hidrólise enzimática nas condições 1n e 2s.....	114
6.3.8. Análise da superfície de resposta de glicose do planejamento 2 ³ + configuração estrela com triplicata no ponto central	119
6.3.9. Estudo da carga enzimática no ponto ótimo encontrado no planejamento 2 ³ + configuração estrela.	120
CAPÍTULO VII	123
Resultados e discussões_Do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.....	123
7.1. Pré-tratamento com hidróxido de cálcio: planejamento fatorial 2 ³ + configuração estrela com triplicata no ponto central	124
7.1.1. Quantidade de cal consumida no pré-tratamento	126
7.1.2. Caracterização da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio.....	127
7.1.3. Hidrolise enzimática da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio	131
7.1.4. Análise da produção de glicose (g/g) de palha bruta utilizando planejamento fatorial completo	137
7.1.5. Análise da superfície de resposta de glicose a partir do planejamento 2 ³ + configuração estrela com triplicata no ponto central	139
7.1.6. Análise de ftir do material pré-tratado com hidróxido de cálcio	141
6.4.7. Análise de drx do material pré-tratado com hidróxido de cálcio	142
6.4.8. Estudo da carga enzimática no ponto escolhido no planejamento 2 ³ + configuração estrela.	143
Capítulo viii.....	145
Resultados e discussões.....	145
Comparação dos pré-tratamentos	145
8.1. Comparação do efeito dos pré-tratamentos avaliados sobre a palha de cana bruta.....	146
8.2. Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina	146
8.3. Rendimento de glicose.....	147
8.4. Comparação do ftir.....	148
8.5. Comparação do índice de cristalinidade.....	149

Capítulo ix	151
Conclusão	151
Capítulo x	155
Trabalhos publicados	155
Trabalhos publicados	156
Capítulo xi	157
Sugestões para trabalhos futuros.....	157
Capítulo xii.....	159
Referencias bibliográfica	159
Referencias.....	160

TABELA DE FIGURAS

Figura 4. 1: partes principais da cana-de-açúcar (ctc, 2011).....	37
Figura 4. 2: modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (pereira jr, 2010).....	39
Figura 4. 3: estrutura da celulose na parede vegetal. (rubira <i>et al.</i> , 2009)	40
Figura 4. 4: representação da cadeia linear de celulose (adaptado de fuentes, 2009). ..	40
Figura 4. 5: ligações de hidrogênio entre cadeias contínuas de celulose (nunez, 2011).	41
Figura 4. 6: estrutura da hemicelulose (mussato, 2002).....	42
Figura 4. 7: monômeros precursores das hemiceluloses (fengel e wegner, 1989).	43
Figura 4. 8: estrutura da <i>o</i> -acetil-4- <i>o</i> -metilglucuronoxilana (moutta, 2009).....	44
Figura 4. 9: os três monômeros principais da molécula da lignina (camargo, 2003).....	45
Figura 4. 10: estrutura esquemática da lignina (freudenberg, 1968).....	46
Figura 4. 11: principais tipos de ligações entre unidades fenilpropanóides presentes na molécula de lignina (camargo, 2003).	46
Figura 4. 12: principais grupos de compostos lipídicos presentes no material lignocelulósico. (adaptado de del rio, 2011).....	48
Figura 4. 13: rendimento teórico (ideal) da produção de etanol por hectare. (santos, 2012).....	49
Figura 4. 14: arquitetura da parede celular vegetal (jorgensen, 2007).....	51
Figura 4. 15: as unidades químicas estruturais associadas com a lignina no tecido lenhoso (lopez, 200).....	56
Figura 4. 16: modelo de formação de compostos inibidores da fermentação, adaptado (domínguez, 2003; palmqvist, 2000).....	63
Figura 4. 17: representação esquemática de um sistema celulósico, observando os sítios de maiores atividades das enzimas celulósicas (adaptado de aro <i>et al.</i> , 2005).	65
Figura 5. 1: reator utilizado no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.....	86
Figura 5. 2: palha de cana pré-tratada com hidróxido de cálcio.	88
Figura 6. 1: palha de cana-de-açúcar.	94

Figura 6. 2: porcentagem de palha solubilizada no pré-tratamento partindo de 15 g de palha bruta e a porcentagem de palha hidrolisada partindo de 3 g de palha pré-tratada.....	97
Figura 6. 3: (a – o). Perfis de hidrólise do planejamento estatístico para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	105
Figura 6. 4: gráfico de pareto.	106
Figura 6. 5: gráfico normal dos efeitos na produção de glicose.	107
Figura 6. 6: fotomicrofibrinas da palha de cana-de-açúcar bruta e pré-tratada com peróxido de hidrogênio: (a) palha bruta; (b) palha pré-tratada condições 1n; (c) palha pré-tratada nas condições 2s.	110
Figura 6. 7: espectro de ftir para a palha de cana bruta (-----), palha pré-tratada nas condições 1n (-----) palha pré-tratada nas condições 2s (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para ficarem mais visíveis, por isso o eixo de absorbâncias foi retirado.	112
Figura 6. 8: difratograma da palha de cana bruta e da palha de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio nas condições 1n e 2s.	113
Figura 6. 9: cinética da hidrólise enzimática considerando a $t(q)$ como uma variável significativa.	117
Figura 6. 10: cinética da hidrólise enzimática considerando a $t(q)$ como uma variável não significativa.	117
Figura 6. 11: superfície de resposta para a produção de glicose em função da concentração de peróxido de hidrogênio e da temperatura mantendo o tempo em 60 min. ...	119
Figura 6. 12: cinética da hidrólise enzimática variando a quantidade de enzima celulase.	121
Figura 7. 1: palha pré-tratada com hidróxido de cálcio.....	125
Figura 7. 2: porcentagem de palha solubilizada e hidrolisada.....	125
Figura 7. 3: cal consumida no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.....	126
Figura 7. 4: gráfico de pareto para a solubilização de lignina	134

Figura 7. 5: perfis de hidrólise para os ensaios do planejamento estatístico para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	136
Figura 7. 6: gráfico de pareto da análise do pré-tratamento com hidróxido de cálcio. .	138
Figura 7. 7: gráfico normal de probabilidades da análise do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	138
Figura 7. 8: superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise da palha de cana-de-açúcar em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo -1,68 (a) no ponto central (b) e no ponto máximo +1,68 (c).....	140
Figura 7. 9: espectro de ftir para a palha de cana bruta (-----) e espectro de ftir da palha pré-tratada nas condições do ensaio 9 (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para melhor visualização, logo a escala de absorbância não foi mostrada.....	141
Figura 7. 10: difratograma da palha de cana bruta e da palha pré-tratada nas condições do ensaio 9, corrigido pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.	142
Figura 7. 11: perfis na hidrólise enzimática aumentando a carga enzimática nas condições do ensaio 9.	144
Figura 8. 1: solubilização de celulose, hemicelulose e lignina de cada um dos pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino (p.ppha) e hidróxido de cálcio (p.phc).	147
Figura 8. 2: espectros de ftir da palha bruta (-----) palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (-----) palha pré-tratada com hidróxido de cálcio (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para melhor visualização, por isso não é mostrado o eixo de absorbância.....	149
Figura 8. 3: difratograma para a palha de cana bruta e pré-tratada com peróxido de hidrogênio e com hidróxido de cálcio.	150

TABELA DE TABELAS

Tabela 5. 1: reagentes utilizados no desenvolvimento da pesquisa.....	70
Tabela 5. 2: faixa de valores estudados no planejamento fatorial completo do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	86
Tabela 5. 3: valores decodificados das variáveis tempo, temperatura e concentração de H_2O_2	87
Tabela 5. 4: faixa de valores estudados no planejamento fatorial completo do pré-tratamento com cal.	88
Tabela 5. 5: valores decodificados das variáveis tempo, temperatura e concentração do hidróxido de cálcio.	89
Tabela 6. 1: fração mássica da palha de cana-de-açúcar bruta.	94
Tabela 6. 2: composição química da palha de cana-de-açúcar em base seca.	95
Tabela 6. 3: condições de cada um dos ensaios no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	96
Tabela 6. 4: caracterização química do material pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	98
Tabela 6. 5: valores de caracterização química da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino corrigidos pelos respectivos rendimentos.....	99
Tabela 6. 6: solubilização de celulose, hemicelulose e lignina do material pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	99
Tabela 6. 7: rendimento de glicose, rendimento global e conversão na hidrólise enzimática.	102
Tabela 6. 8: coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.	106
Tabela 6. 9: análise da variância (anova) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose da palha de cana-de-açúcar	

pré-tratada com peróxido de hidrogênio. Onde a temperatura quadrática não foi considerada uma variável significativa.	108
Tabela 6. 10: análise da variância (anova) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com peróxido de hidrogênio. Onde a temperatura quadrática foi considerada uma variável significativa.	108
Tabela 6. 11: condições ótimas dos testes considerando a temperatura quadrática como variável significativa e não significativa.	109
Tabela 6. 12: banda das vibrações dos compostos celulósicos (wang, 2010).....	111
Tabela 6. 13: índices de cristalinidade (cri) para o a palha bruta e a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino nas condições 1n e 2s.	114
Tabela 6. 14: rendimento no pré-tratamento nas duas condições ótimas encontradas.	114
Tabela 6. 15: composição química do material pré-tratado nas duas condições ótimas encontradas.....	115
Tabela 6. 16: caracterização do material pré-tratado corrigido pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.....	115
Tabela 6. 17: solubilização dos componentes da palha de cana-de-açúcar após a etapa de pré-tratamento.....	115
Tabela 6. 18: solubilização de celulose, hemicelulose e lignina na palha de cana-de-açúcar submetida a diferentes pré-tratamentos.	116
Tabela 6. 19: conversão na hidrólise enzimática e rendimento global de glicose.....	118
Tabela 6. 20: rendimentos de glicose, conversão e rendimento global.....	120
Tabela 7. 1: matriz do planejamento.	124
Tabela 7. 2: composição química da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com hidróxido de cálcio.....	127
Tabela 7. 3: caracterização química da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio corrigida pelos respectivos rendimentos.	128

Tabela 7. 4: solubilização de celulose hemicelulose e lignina após o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.	129
Tabela 7. 5: matriz de planejamento composto central para o pré-tratamento com cal com as respostas de produção de glicose e rendimento global.	132
Tabela 7. 6: comparação do pré-tratamento com hidróxido de cálcio em diferentes fontes de biomassa.	133
Tabela 7. 7: análise dos efeitos e interações do planejamento experimental para o da massa de glicose (g de glicose/g de palha bruta) produzida.....	137
Tabela 7. 8: análise da variância (anova) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 para análise da concentração de glicose da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio.	139
Tabela 7. 9: rendimentos de glicose, conversão e rendimento global.	143
Tabela 8. 1: composição química da palha de cana-de-açúcar bruta e da palha de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio.	146
Tabela 8. 2: comparação do rendimento na produção de glicose, na conversão e o rendimento global, da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e pré-tratada com hidróxido de cálcio.	148
Tabela 8. 3: índices de cristalinidade (cri) para a palha bruta e para a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio e com hidróxido de cálcio.	150

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A estrutura da dissertação foi organizada da seguinte forma:

No capítulo I é apresentada a estrutura da dissertação, descrevendo cada um dos capítulos que serão encontrados ao longo da dissertação.

No capítulo II é apresentada uma introdução sobre o assunto, mostrando a importância e a justificativa da escolha do tema da dissertação.

No capítulo III é apresentado o objetivo geral do projeto junto com os objetivos específicos.

No capítulo IV é apresentada uma revisão da literatura, tratando conceitos sobre a cana-de-açúcar e a importância da utilização da palha de cana para a produção de etanol de segunda geração. Também são descritos os diferentes tipos de pré-tratamentos, os mais utilizados e os escolhidos para esta pesquisa, bem como a etapa de conversão da glicose e etapa de hidrólise enzimática.

No capítulo V é apresentada a metodologia experimental utilizada para o desenvolvimento da dissertação.

No capítulo VI são apresentados os resultados obtidos do pré-tratamento da palha de cana de açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino junto com a discussão dos mesmos.

No capítulo VII são apresentados os resultados obtidos do pré-tratamento da palha de cana de açúcar com hidróxido de cálcio junto com a discussão dos mesmos.

No Capítulo VIII é apresentada a comparação dos dois pré-tratamentos avaliados (peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio).

No capítulo IX é apresentada a conclusão do trabalho.

No capítulo X são apresentados os trabalhos publicados e/ou submetidos, que surgiram ao longo da dissertação.

No capítulo XI são apresentadas as sugestões para trabalhos futuros.

E finalmente no capítulo XII são apresentadas as referências bibliográficas.

CAPÍTULO II

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A crescente industrialização e o aumento massivo de meios de transporte a nível mundial têm proporcionado grande aumento na demanda de combustíveis derivados do petróleo. Atualmente, os combustíveis fósseis ocupam 80% da energia primária consumida no mundo, dos quais aproximadamente 58% são consumidos somente pelo setor de transporte (NIGAM e SINGH, 2011). Estes combustíveis permitem o desenvolvimento da indústria de transporte, com meios cada vez mais rápidos e eficientes. No entanto, as reservas de petróleo, por não serem fontes renováveis, podem se tornar escassas (ROSA, 2009).

A Agência Internacional de Energia (AIE) estimou as emissões de CO₂ durante o ano 2010 como as mais altas da história, com cerca de 30,6 giga toneladas (Gt). O aumento foi de 5% em relação às emissões de 2008 (29,3 Gt), maior quantidade conhecida anteriormente. Em 2009, as emissões foram reduzidas devido à crise econômica mundial. Calcula-se que 44% do CO₂ emitido é proveniente do carvão, 36% do petróleo e 20% do gás natural (MINISTÉRIO DE RELAÇÕES EXTERIORES, 2011). Como resposta à preocupação pelo possível esgotamento do petróleo somado aos problemas causados pelas emissões dos gases de efeito estufa, há um crescente aumento no interesse pelo uso de fontes alternativas de energia nos últimos tempos.

Dentro deste contexto, o etanol tem-se destacado como uma alternativa viável para substituir os combustíveis fósseis. Este biocombustível destaca-se dos demais devido às suas vantagens econômicas, sua capacidade de renovação, biodegradabilidade e à geração de gases com qualidade aceitável (NIGAM e SINGH, 2011). O etanol pode ser obtido a partir da fermentação direta do caldo de cana (conhecido como etanol de primeira geração) ou a partir da hidrólise de biomassa lignocelulósica, com obtenção de glicose, a qual pode ser fermentada produzindo o etanol (etanol de segunda geração ou etanol celulósico) (OGEDA, 2010). O etanol de segunda geração pode ser obtido a partir de diversos resíduos agrícolas, com destaque, no Brasil, para o bagaço e a palha da cana (FREITAS, 2011). A biomassa, até agora, é o único material adequado e principal fonte de energia renovável para produzir combustíveis alternativos para uso em transporte (etanol ou biodiesel) em curto prazo (ALVIRA, 2010).

Até o ano de 2020, o Brasil tem previsto o aumento da produção de etanol dos atuais 28 bilhões para 65 bilhões de litros por ano (CONAB, 2011; UNICA, 2010). Para atingir este nível de produção, pretende-se realizar aumentos na área de plantio, aprimoramento do processo de

produção já existente, melhoramento genético da cana-de-açúcar e dos microrganismos fermentadores, e por último, o desenvolvimento de tecnologias de conversão dos resíduos agroindustriais celulósicos em fontes de açúcares fermentescíveis (ZHAO, 2007; OLIVEIRA, 2010). De acordo com SOARES E ROSSELL (2006), os custos de produção de biomassa no Brasil são os menores do mundo, portanto, a possibilidade de obter resultados viáveis é elevada. Além desse fator, a produção de etanol celulósico (segunda geração) tem como perspectiva aumentar até 50%, o que evitaria a necessidade de expandir a área de plantio (SILVA *et al.*, 2010).

Uma prática comum no setor sucroalcooleiro, realizada há muito tempo, é a queima do canavial antes do corte da cana para a retirada da palha. Este procedimento facilita o corte manual da cana e o traslado da mesma até as usinas. Além dos problemas ambientais e de saúde pública que este processo ocasiona, pode-se considerar que, energeticamente, o processo é ineficiente, visto que a palha da cana pode ser aproveitada para a geração de energia (MOUTTA, 2009). Com a implementação da colheita mecanizada pode-se gerar cerca de 140 kg de palha por tonelada de cana colhida (GONÇALVES *et al.*, 2005). Destes, estima-se que 50% deste material devem ser mantidos no campo (SILVA *et al.*, 2010; CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2004; CAVENAGHI *et al.*, 2002; GUIMARÃES *et al.*, 2002; CAMPOS *et al.*, 2009) e a outra metade possa ser aproveitada para queima em caldeiras ou produção de etanol de segunda geração.

Um dos grandes desafios para a obtenção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos é o fracionamento dos principais constituintes químicos da biomassa: celulose, hemicelulose e lignina. Devido a uma estreita associação entre estes constituintes, o material se torna resistente à conversão, dificultando a hidrólise da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis. Por isso, para aumentar a acessibilidade da celulose pelas enzimas é preciso realizar um pré-tratamento na biomassa. O objetivo principal do pré-tratamento é romper o complexo celulose-hemicelulose-lignina, tornando, assim, a celulose mais acessível e aumentando a digestibilidade enzimática. Os pré-tratamentos podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação entre eles. O tipo de pré-tratamento a ser escolhido vai depender do grau de separação requerido e da finalidade para o qual se destina o processo (ALVIRA, 2010).

Este trabalho de dissertação situa-se no âmbito do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da indústria sucroalcooleira, tendo-se como objetivo geral o estudo do pré-

tratamento da palha da cana-de-açúcar, visando à obtenção de etanol mediante a sacarificação de sua fração celulósica. Para tanto, foram empregados os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio, uma vez que estes pré-tratamentos apresentaram resultados expressivos quando usados para pré-tratar bagaço de cana-de-açúcar no grupo de pesquisa em que este trabalho se insere.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi avaliar dois pré-tratamentos (peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio) na palha de cana-de-açúcar para a posterior hidrólise enzimática, visando à produção de etanol de segunda geração.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência das variáveis tempo, temperatura e concentração de reagente nos dois pré-tratamentos a serem estudados, realizando planejamentos fatoriais 2^3+ configuração estrela com triplicata no ponto central.

Determinar a eficiência na hidrólise enzimática mediante a conversão de açúcares fermentescíveis.

Determinar as condições ótimas dos pré-tratamentos, em função da conversão da hidrólise.

Comparar os dois tipos de pré-tratamentos para avaliar a eficiência do processo

CAPÍTULO IV

REVISÃO DA LITERATURA

4.1. BIOMASSA

Na atualidade, o termo de biomassa é aceito para denominar o grupo de produtos energéticos e matérias primas (tipo renovável) originadas a partir de matéria orgânica animal ou vegetal. Já a biomassa lignocelulósica é aquela constituída de celulose, hemicelulose e lignina, ou seja, é toda biomassa de origem vegetal, sendo que as três frações constituem mais de 90% da massa seca total. A disponibilidade de biomassa lignocelulósica despertou o interesse para seu uso como matéria prima para produção de álcool de segunda geração desde o final do século XIX. Entretanto, somente nos últimos vinte anos a biomassa começou a ser considerada como uma potencial fonte de energia (MACHADO, 2010; CARVALHO, 2009).

Em geral, a biomassa pode ser processada para obter formas bioenergéticas de maior valor agregado, mais elaboradas e adequadas para o uso final (SILVA, 2010). No contexto da bioenergia, a produção de bicomcombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido considerada para atender às necessidades geradas no setor de transporte veicular (ZHANG, 2004 e SMITH, 2007).

A biomassa é a forma mais antiga de energia renovável e vem sendo utilizada há milhares de anos. Contudo, a sua taxa de utilização relativa diminuiu com o aumento da utilização de combustíveis fósseis. Atualmente, aproximadamente 13% do abastecimento mundial de energia primária é garantido pela biomassa, mas existem grandes diferenças regionais, sendo que em países desenvolvidos, apenas cerca de 3% das suas necessidades energéticas são garantidas pela biomassa. No Brasil, o total de biomassa usada alcança cerca de 31,5% e os resultados que envolvem a cana-de-açúcar envolvem tanto a produção de etanol como a geração de eletricidade (LEITE *et al.*, 2003; WBCSD, 2011)

4.2. A CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*) tem sua origem genética na Nova Guiné, pertence à família das gramináceas (pastos) e possui elevada eficiência fotossintética (a quantidade oscila entre 150% e 200% em relação às outras plantas). É um cultivo duradouro onde, de acordo com as condições locais, a cana pode ter entre 4 e 12 colmos, crescer entre 3 e 5 metros de altura e o conteúdo de açúcar (sacarose) oscilar entre 11 e 16% (AUGSTBURGER,

F. *et al.*; 2000). A cana-de-açúcar é constituída por folhas secas, colmo, folhas verdes e ponteiro (MUSEO MTC, 2011), como mostram a Figura 4.1.

A cana-de-açúcar constitui o cultivo sacarífero mais importante do mundo, responsável por 70% da produção total de açúcar. Este cultivo se estende ao longo dos trópicos e subtropicais entre 36,5° de latitude Norte (Espanha) até 31° de latitude Sul (Uruguai e Austrália), sendo que sua capacidade produtiva é diferente entre as zonas canavieiras tropicais e subtropicais, variando de 40 a 150 toneladas por hectare e de 3,5 a 15 toneladas por hectare de açúcar (ROMERO, 2008).

Considerando 100 toneladas de cana-de-açúcar no campo, cerca de 20 toneladas são formadas por folhas e ponteiros e 80 toneladas por colmos industrializáveis. Essa relação é bastante variável no decorrer da safra em função da variedade, estágio de desenvolvimento vegetativo e clima. Os colmos e as folhas verdes da cana-de-açúcar apresentam, na época de colheita, umidade de aproximadamente 70% e 60 – 80%, respectivamente. A umidade das folhas secas pode variar entre menos de 10% até 30%, dependendo das condições climáticas na ocasião da amostragem (CTC, 2011).

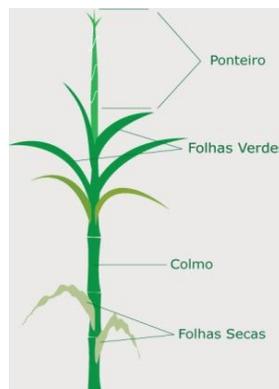


Figura 4. 1: Partes principais da cana-de-açúcar (CTC, 2011).

4.2.1. A PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A palha de cana-de-açúcar, representada basicamente por folhas verdes, folhas secas e ponteiros, é um resíduo fibroso encontrado nos canaviais em quantidade regular, gerada a partir do desfolhamento da cana durante o processo de colheita mecanizada. Em uma prática comum

no Brasil, a palha é destruída durante a queima dos canaviais, onde, além de perder este subproduto que pode ter uma utilização econômica, provoca-se elevação dos níveis de poluição atmosférica (AZZINI *et al.*, 1996). Segundo FERREIRA (2004), além dos problemas ambientais, a sustentabilidade da agricultura também fica comprometida, visto que o fogo altera as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, prejudica a obtenção dos nutrientes e diminui a quantidade de açúcares redutores totais (ART) contidos na cana (OLIVEIRA, 2010).

Em 2002, foi regulamentada a Lei 11.241-02, que dispõe da eliminação gradativa da queima da palha de cana no Estado de São Paulo. Como resultado desta lei, se difundida aos demais estados produtores, uma grande quantidade de palha estará disponível nos campos, deixando o solo coberto com uma espessa camada, que pode superar 20 ton/ha, considerando uma produção de cana-de-açúcar de 81 ton/ha (CONAB, 2010; OLIVEIRA, 2010). Por isso, é de grande importância aproveitar este resíduo na produção de novos produtos com maior valor agregado, como é o caso de obtenção de etanol de segunda geração.

A germinação é um processo chave para as espécies vegetais, sendo muito sensível à cobertura do solo. Resíduos de palha na superfície do solo alteram a umidade, luminosidade e temperatura, podendo prejudicar as plantas novas, devido à barreira física e ausência de luz, tornando-as suscetíveis aos danos mecânicos (CORREIA e DURIGAN, 2004). No entanto, a retirada completa da palha de cana pode ser prejudicial, visto que a fertilidade do solo ficaria comprometida, alteraria a retenção de água no solo e causaria processos erosivos. Por isto, pesquisas sobre o aproveitamento da palha (ponteiras, folhas verdes e secas da cana) para obtenção de energia estão sendo desenvolvidas considerando a retirada de apenas cerca de 50% da camada disposta no campo, sem comprometer as características do solo (PROTEC, 2010; OLIVEIRA, 2010).

4.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A Figura 4.2 apresenta um modelo estrutural dos principais componentes dos materiais lignocelulósicos (ARAÚJO, 2008; MOHAN, 2006). A composição destes materiais depende da fonte, mas de maneira geral, pode-se dizer que a maior parte corresponde à celulose (40 – 50%), seguida pelas hemiceluloses (20 – 30%) e lignina (10 – 30%). O conteúdo de cinzas se altera de maneira significativa, entre 1 a 13%, de acordo com a espécie (HON, 2001). Além da

celulose, hemiceluloses e lignina, as fibras lignocelulósicas têm alguns produtos minoritários como os extraíveis pelos solventes orgânicos e aquosos, proteínas e outros produtos inorgânicos.

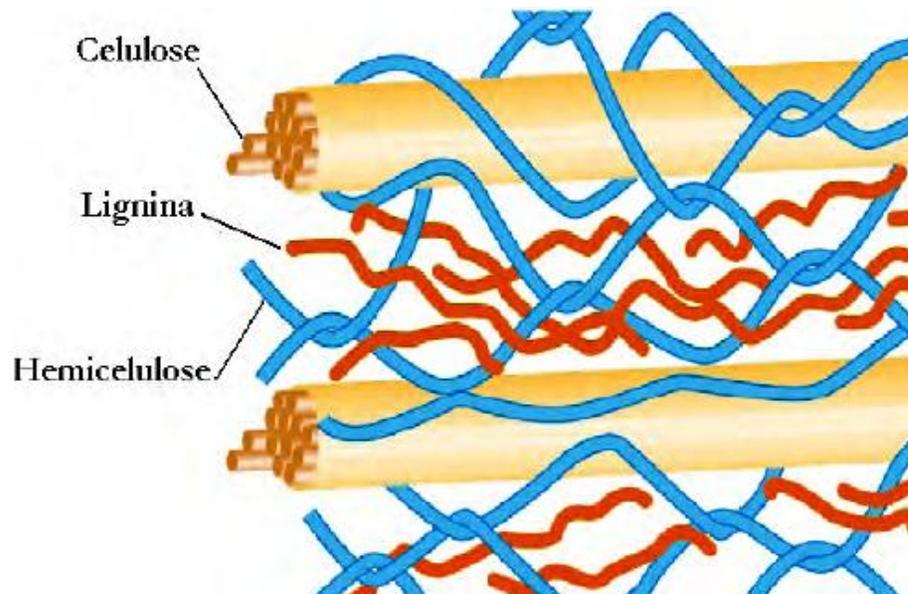


Figura 4. 2: Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (PEREIRA Jr, 2010).

4.3.1. CELULOSE

A celulose está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos, variando o conteúdo de 20 a 99% (RABELO, 2007). A Figura 4.3 apresenta a estrutura da celulose na parede vegetal.

A celulose é um polímero constituído por unidades de anidroglicopirranose, organizadas em dímeros de celobiose, dispostas linearmente. Duas moléculas adjacentes de glicose são unidas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxilas dos carbonos 1 e 4, formando o tipo de ligação β (1→4) glicosídica (Figura 4.4).

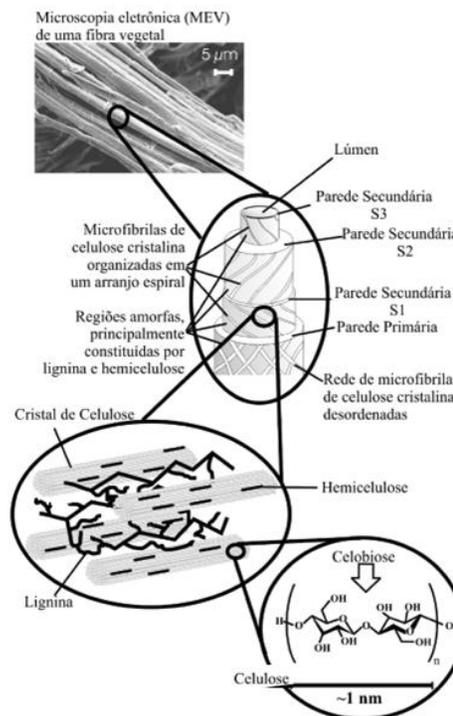


Figura 4. 3: Estrutura da celulose na parede vegetal. (RUBIRA *et al.*, 2009)

A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto que a glicose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (ZHANG, 2008; PITARELO, 2007).

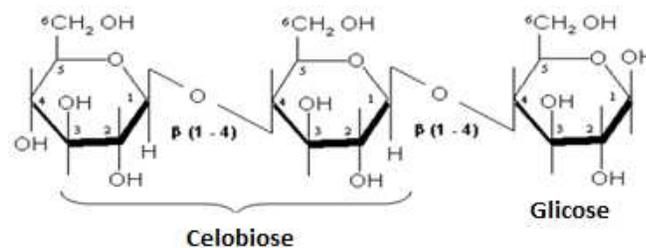


Figura 4. 4: Representação da cadeia linear de celulose (Adaptado de Fuentes, 2009).

A celulose é encontrada em plantas sob a forma de microfibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40.000 nm de comprimento, tendo entre 2.000 – 25.000 unidades de glicose (OLIVEIRA, 2010). Estas fibrilas elementares são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL e WEGENER, 1989).

As ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) presentes na molécula de celulose são de difícil hidrólise, sendo que apenas alguns fungos e bactérias são capazes de tal função. Além destas ligações, são encontradas forças de Van der Waal's (ZHANG & LYND, 2004) e ligações de hidrogênio intra e inter cadeias, as quais permitem a combinação de cadeias de celulose para formar os cristalitos (SHULER, 1992). A Figura 4.5 representa as cadeias de celulose e suas ligações intra e intercadeia.

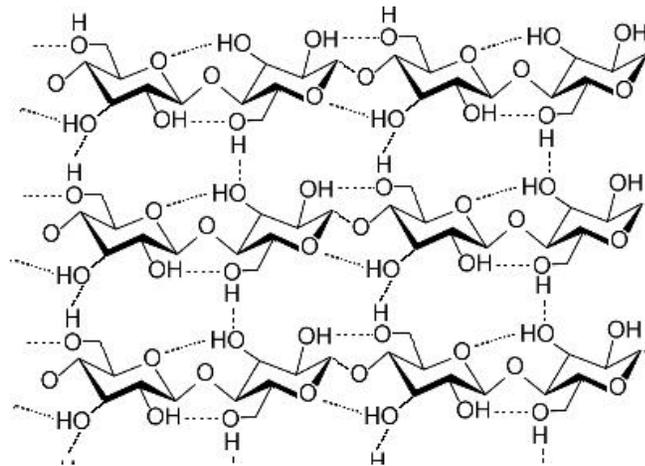


Figura 4. 5: Ligações de hidrogênio entre cadeias contínuas de celulose (NUNEZ, 2011).

4.3.2. HEMICELULOSES OU POLIOSES

As hemiceluloses são uma classe heterogênea de polímeros que representam, em geral, 15 – 35% da biomassa vegetal, como apresentado na Figura 4.6. As hemiceluloses são compostas de diferentes açúcares, formando cadeias mais curtas e com ramificações. Os açúcares que formam as polioSES podem se dividir em diferentes grupos como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glucoses, manoses e galactoses) e ácidos urônicos (4-O-metil-Dglucoronico, ácido D-galacturônico, e ácido D-glucurônico (Figura 4.7). A cadeia principal de uma polioSE pode ser constituída de apenas um tipo de polímero (homopolímero), como os xilanos, ou de dois ou mais tipos de polímeros (heteropolímero), como os glucomananos. O conteúdo de hemicelulose, tanto por quantidade como por variedade, difere consideravelmente dependendo da espécie (FENGEL e WEGENER, 1989; VERDECIA, 2008; GÍRIO, 2008).

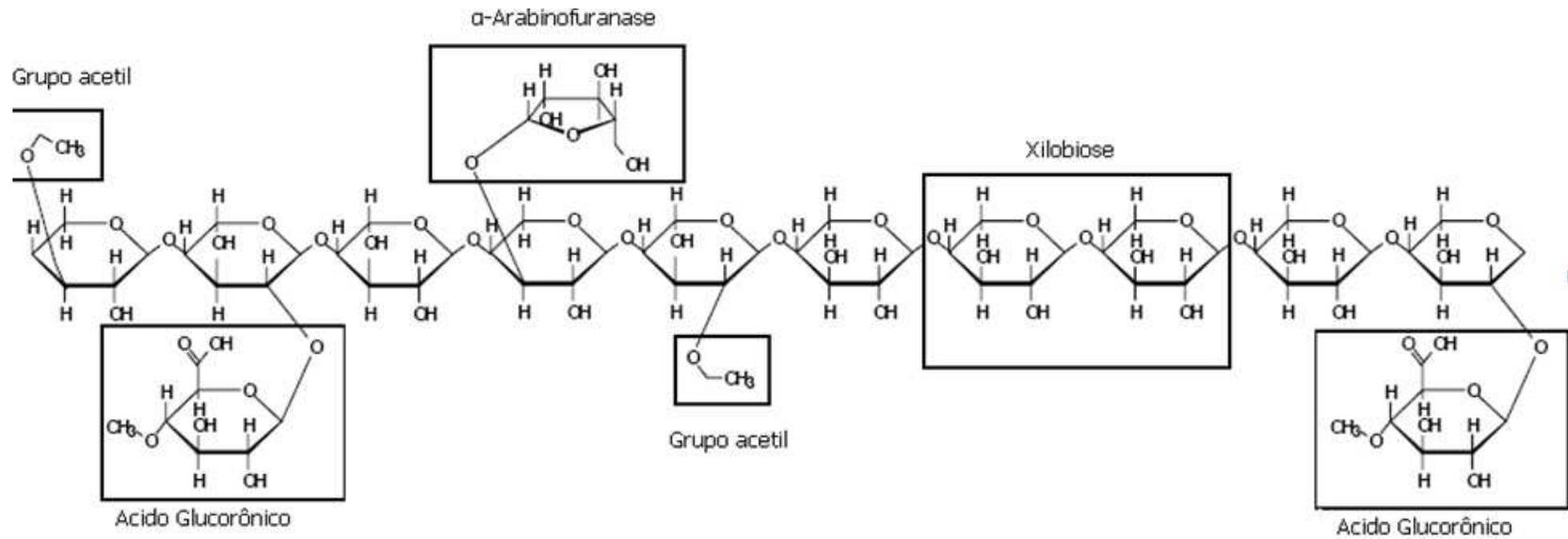


Figura 4. 6: estrutura da hemicelulose (MUSSATO, 2002)

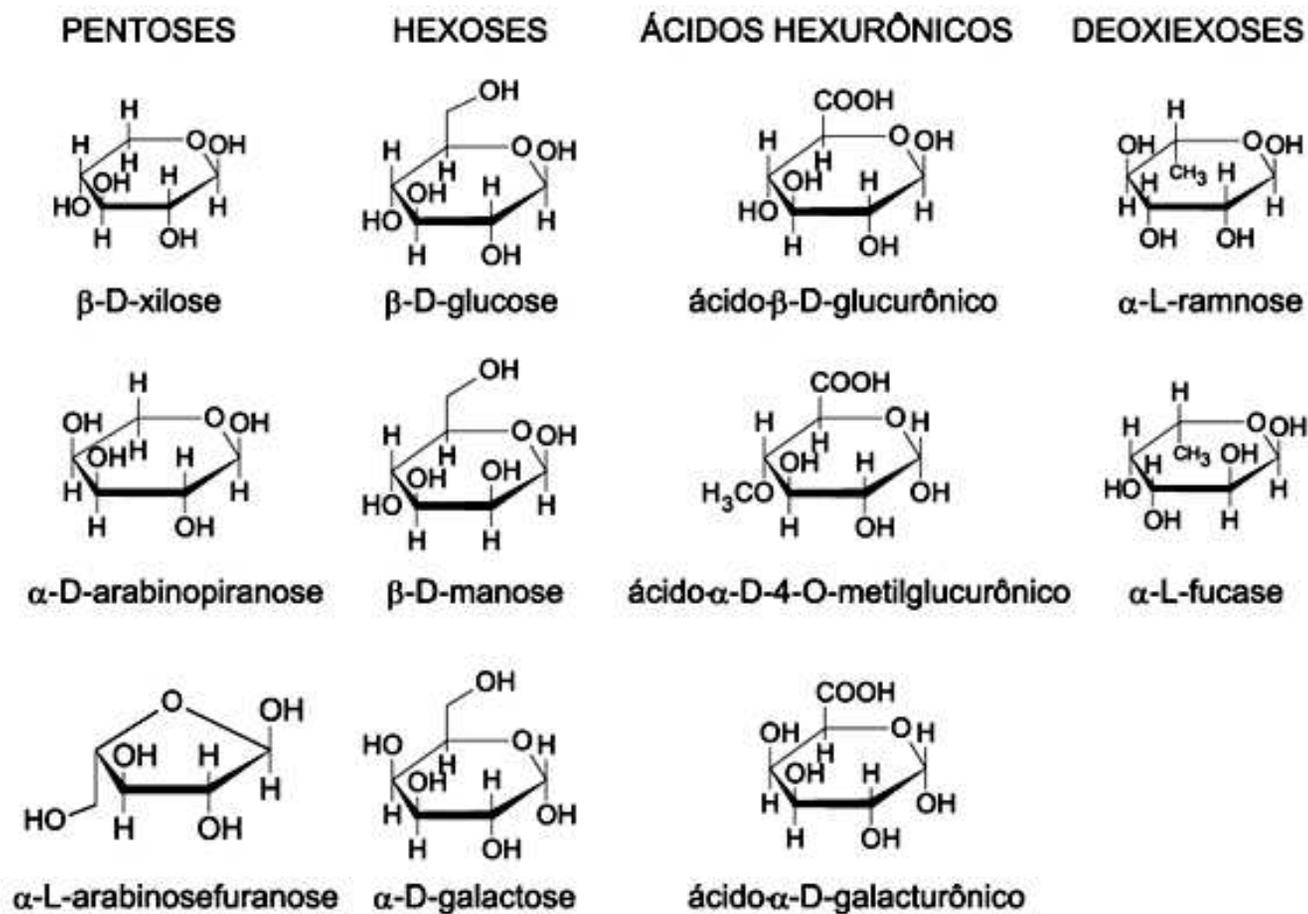


Figura 4. 7: Monômeros precursores das hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

As xilanas são a família de hemiceluloses mais importantes. São polissacarídeos formados por unidades de xilose, que frequentemente carrega substituintes como acetil, arabinosil e glucoranosil (SINGH, 1993), e são constituídas por uma cadeia principal de unidades de β -D-xilopirranose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), com ramificações de ácido 4-O-metilglucurônico unidos à cadeia principal por ligações α -(1 \rightarrow 2). Alguns grupos OH dos carbonos C₂ e C₃ são substituídos por grupos O-acetil (Figura 4.8). Além destes açúcares, estas hemiceluloses apresentam pequenas quantidades de ramnose e ácido galacturônico (MOUTTA, 2009).

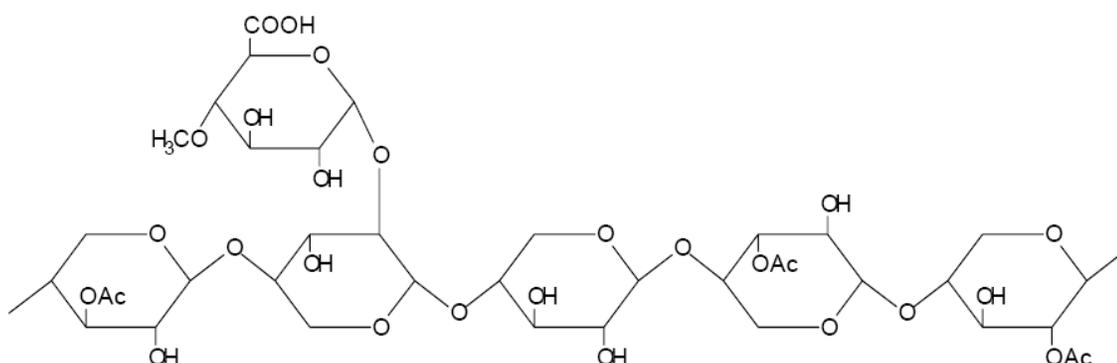


Figura 4. 8: Estrutura da *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana (MOUTTA, 2009).

As hemiceluloses não são cristalinas, de forma que as ligações químicas e os grupos funcionais estão mais acessíveis ao ataque químico. Os grupos hidroxila são os mais abundantes, seguidos das ligações acetil nos anéis dos açúcares e das ligações éster aos grupos acetil. Os principais processos degradativos são a hidrólise em meio ácido e a oxidação. A hidrólise ataca principalmente as ligações acetil e éster, o que em meio ácido leva à formação de ácido acético, aumentando a acidez do meio e conduzindo ao ataque de novos grupos.

Outros reagentes oxidantes como cloro, bromo ou iodo convertem os grupos aldeído em ácidos aldônicos. As hemiceluloses são solúveis em bases e algumas, tais como as glucomananas com alto teor em galactose, são solúveis em água. As hemiceluloses são mais susceptíveis à biodegradação que a celulose, pois são mais facilmente atacadas pelas enzimas.

4.3.3. LIGNINA

A palavra lignina vem do latim "lignum" que significa madeira. Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, presentes em vegetais e tecidos vasculares. Sabe-se que a lignina está presente na parede celular primária e tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos (FENGEL e WEGENER, 1989; PEREZ, 2002; HARMSSEN, 2010).

A lignina é um componente da parede celular dos vegetais, normalmente considerada indigestível e também inibidora da digestibilidade da parede celular das plantas forrageiras, acentuando a sua ação à medida que o vegetal amadurece (FUKUSHIMA, 2000).

Peter Klason, em 1917, propôs que a lignina poderia ser classificada como uma substância macromolecular constituída de unidades do álcool coniferílico, mantidas juntas através de ligações do tipo éter. Em 1954, Lange propõe que as principais unidades aromáticas presentes na estrutura da lignina eram a *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila apresentados na Figura 4.9. Em palhas e gramíneas, além de unidades guaiacílicas e siringílicas, encontram-se subestruturas do tipo *p*-hidroxifenilpropano proveniente da polimerização do álcool *p*-cumarílico, em quantidades relevantes. A proporção molar dessas subestruturas na planta depende principalmente da espécie (CHEN, 1991; MORAIS, 1992). Na figura 4.10 é apresentada a estrutura da lignina.

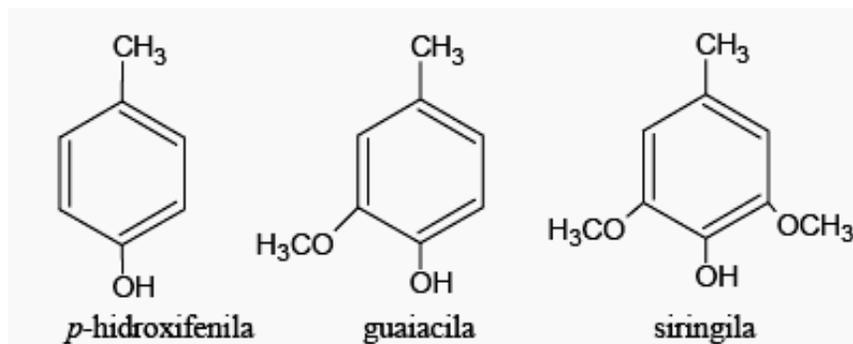


Figura 4. 9: os três monômeros principais da molécula da lignina (CAMARGO, 2003).

Os solventes mais empregados para dissolver significativamente a lignina incluem álcoois de baixo peso molecular, dioxano, acetona, piridina, dimetilsulfóxido. Além disso, em temperaturas elevadas, ocorre o abrandamento térmico da lignina, permitindo acelerar as reações de polimerização em meios ácidos ou alcalinos (O'CONNOR *et al.*, 2007).

O principal tipo de ligação existente na lignina é do aril-aril do tipo éter. Contudo, existem outros diferentes tipos de ligação presentes na estrutura da lignina. A lignina parece ser particularmente associada com polissacarídeos e hemicelulose; sendo esta, um amplo grupo de polissacarídeos estabelecidos na parede celular das plantas (SUN, 2001).

4.3.4. EXTRATIVOS

Além dos compostos estruturais formados pela lignina, celulose e hemiceluloses, na matéria vegetal são encontradas outras substâncias em quantidades reduzidas, variando de 2 a 8%. Estas substâncias estão constituídas principalmente por compostos lipofílicos (ácidos graxos, glicerídeos, ceras, terpenos e esteróides) e fenólicos de baixo peso molecular (Figura 4.12), sendo geralmente extraídos por solventes específicos (FENGEL e WEGENER, 1989).

Uma das principais funções dos compostos extraíveis é a proteção da planta contra agentes patógenos. A baixa degradabilidade de muitos destes compostos dificulta o aproveitamento industrial da biomassa vegetal (HILLIS e SUMIMOTO, 1989; BACK e ALLEN, 2000). Os conteúdos de substâncias extraíveis apresentam variações de acordo com a idade da planta, altura, espécie, condições climáticas, entre outros fatores.

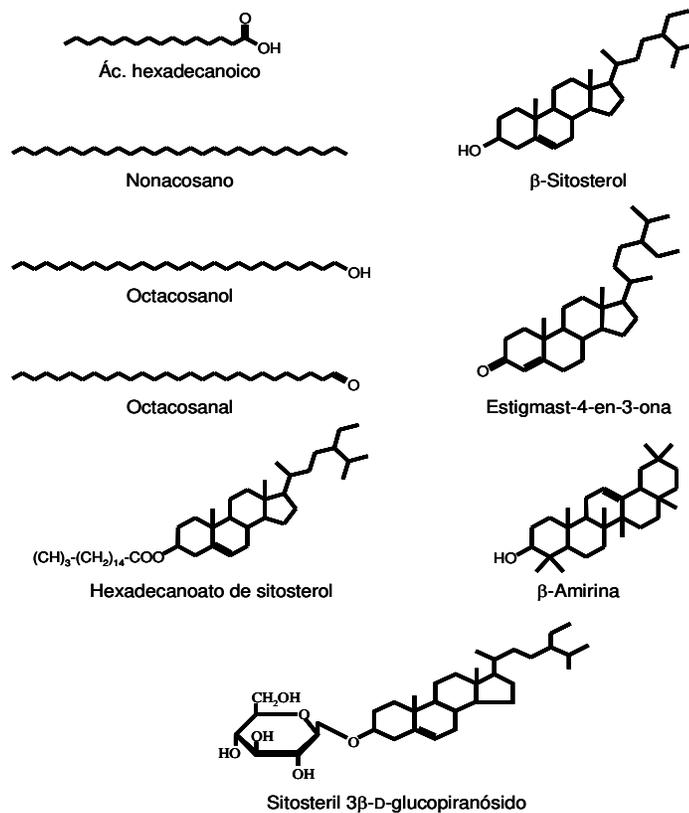


Figura 4. 12: Principais grupos de compostos lipídicos presentes no material lignocelulósico. (Adaptado de DEL RIO, 2011).

4.4. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

O crescimento da indústria canieira, principalmente na produção de etanol combustível, é um grande incentivo ao aproveitamento da palha de cana de açúcar, que atualmente começa a fazer parte do processo de colheita. Dentro dos próximos anos haverá um aumento na disponibilidade de palha de cana para ser utilizada como nova fonte de biomassa para a produção de etanol celulósico. A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare, sendo que para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca. Na figura 4.13 é apresentando um esquema ideal do aproveitamento integral da cana de açúcar para obtenção de etanol, embora saiba-se que com a tecnologia atual este valor máximo não é atingido.

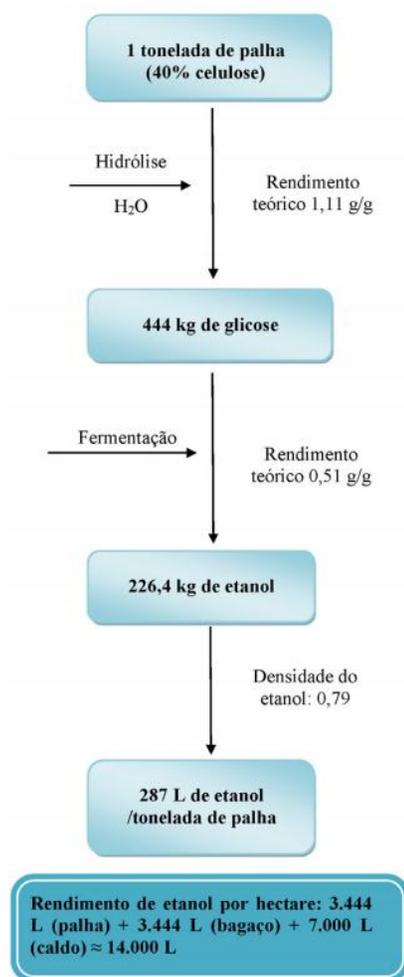


Figura 4. 13: Rendimento teórico (ideal) da produção de etanol por hectare. (SANTOS, 2012)

Considerando que toda glicose vai ser convertida em etanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (colmo, palha e bagaço) poderá aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, passando dos atuais 7.000 L para aproximadamente 14.000 L, sem necessidade de expansão da área cultivada. Em termos energéticos a palha representa 1/3 da energia potencial da cana-de-açúcar que, atualmente, é subaproveitada (SANTOS, 2012).

4.5. PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode ser considerado a etapa crucial na produção de bioetanol, por promover grande impacto sobre todas as outras etapas do processo,

tendo influência sobre a fermentação, recuperação de produto, tratamento do efluente e demanda energética ao longo da linha de processamento (MOUTTA, 2009). De acordo com GALBE e ZACCHI (2007), para que um pré-tratamento seja considerado efetivo, deve apresentar algumas características, como:

- Permitir alta digestibilidade da celulose;
- Produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou lignina;
- Ter baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário;
- Ter baixos custos.

Os açúcares contidos na fração celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) representam os precursores que podem ser utilizados para a obtenção de etanol de segunda geração usando a via fermentativa. Entretanto, conforme ilustrado na Figura 4.14, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemiceluloses e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma monomérica com elevado grau de pureza (CARVALHO, 2009). Por conseguinte, têm sido testadas diversas estratégias para a conversão de materiais celulósicos em açúcares fermentescíveis, demonstradas em escala laboratorial e piloto.

Para que a sacarificação enzimática da celulose seja eficiente, é necessário que as enzimas celulolíticas tenham acesso às fibras. Por outro lado, a parede da célula vegetal é impermeável a grandes moléculas, incluindo proteínas como as celulasas (GOULD, 1984; SCHELL, 1991). O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, em seguida, submetê-la à hidrólise enzimática (JORGENSEN, 2007). Embora o pré-tratamento possa ser conduzido por princípios bastante variados, tem por finalidade alterar ou remover as hemiceluloses e/ou lignina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, promovendo um aumento na digestibilidade enzimática e, conseqüentemente, influenciando na conversão de celulose em açúcares fermentescíveis (ZHANG, 2004; MOSIER, 2005).

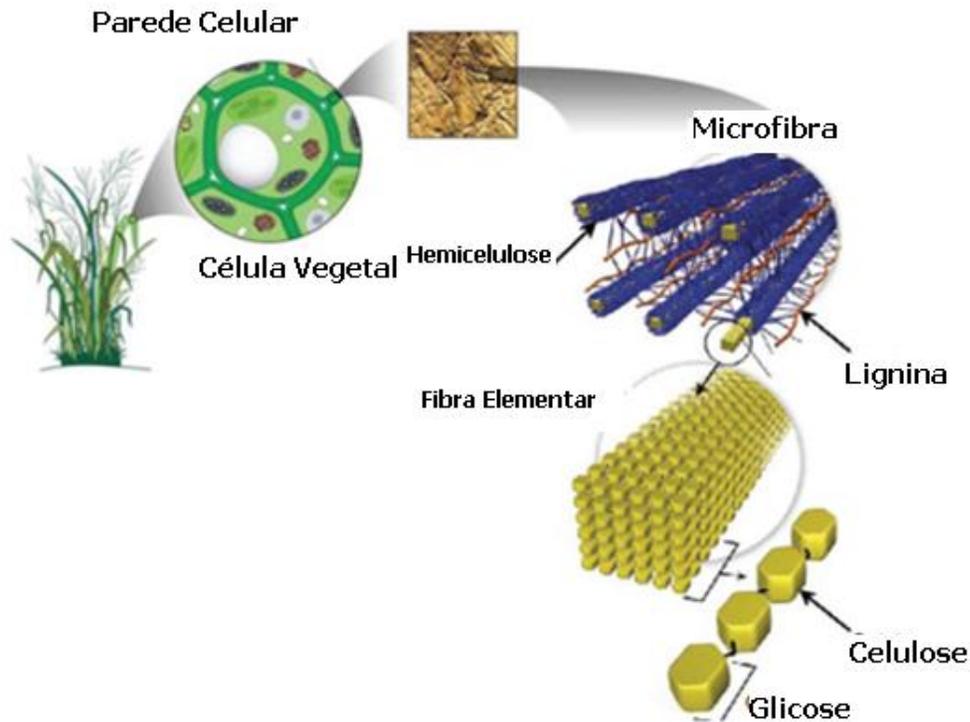


Figura 4. 14: Arquitetura da parede celular vegetal (JORGENSEN, 2007).

Normalmente, a hidrólise enzimática de um material lignocelulósico bruto leva a rendimento em açúcar menor que 20%. Por outro lado, se for utilizada uma etapa de pré-tratamento, o rendimento pode ficar acima de 90%. Atualmente existe uma grande quantidade de processos de pré-tratamento disponíveis, podendo ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação entre eles (PETRI, 2010)

Para a remoção das hemiceluloses podem ser usadas soluções ácidas que solubilizam as hemiceluloses, ou mesmo a água em temperaturas acima de 180°C, auto catalisado pelos ácidos orgânicos contidos nas hemiceluloses, em especial o ácido acético (FONTECHA, 2011).

Durante o pré-tratamento tem que se avaliar suas vantagens junto com os custos da aplicação e suas consequências em etapas posteriores do processo levando em consideração o tipo de biomassa que é utilizada (MOSIER, 2005).

É difícil uma comparação direta dos diferentes tipos de pré-tratamentos visando conhecer os rendimentos resultantes de açúcar convertido após hidrólise, devido às variações de como os rendimentos são relatados e quais açúcares estão incluídos.

4.5.1. PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO

Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, sendo que essa fragmentação não altera sua composição química (SZCZODRAK e FIEUDUREC, 1996).

SILVA *et al.* (2010) comparou a eficácia de dois diferentes tipos de moagem, moinho de faca e moinho criogênico, na eficiência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e da palha. Os materiais pré-tratados foram caracterizados por difração de raios X, granulometria e microscopia eletrônica de varredura, além da avaliação através da hidrólise enzimática e fermentação. Os rendimentos de glicose e xilose do bagaço pré-tratado pela moagem convencional foi 78,7% e 72,1%, respectivamente, e para palha os rendimentos foram de 77,6% e 56,8%, respectivamente. Usando a moagem úmida (moinho criogênico), o rendimento de glicose e xilose foram de 49,3% e 36,7% para bagaço e 68,0% e 44,9% para palha. Foi verificado que a moagem melhorou a hidrólise enzimática através da diminuição da cristalinidade da celulose.

4.5.2. PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

Neste tipo de pré-tratamento, o material lignocelulósico é submetido à ação de determinadas enzimas ou microrganismos. O objetivo é degradar a lignina e hemicelulose, eliminando as barreiras que protegem a celulose, tornando-a mais acessível para posterior ataque enzimático (FAN *et al.*, 1987).

4.5.3. PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICOS

Nesta categoria incluem-se misturas de pré-tratamentos tais como a explosão a vapor com reagentes químicos. Um tipo de pré-tratamento físico-químico é o processo de explosão de fibra com amônia (*AFEX–Ammonia fiber expansion*), o qual normalmente se realiza com concentrações de amônia na proporção 1:1(g amônia/g de biomassa seca) em temperaturas que podem ser desde ambiente com tempos de pré-tratamentos de 10 a 60 dias, a temperaturas de até 120°C, com uma duração de alguns minutos (ALIZADEH *et al.*, 2005).

Segundo ALIZADEH *et al.* (2005), é possível observar um aumento de até seis vezes na conversão da hidrólise enzimática.

Outro pré-tratamento físico-químico é a explosão a vapor com CO₂, o qual é feito em altas pressões e temperaturas (até 200°C), durante alguns minutos. Este tipo de pré-tratamento produz líquidos que podem ser ácidos, os quais hidrolisam facilmente a hemicelulose. O CO₂ também pode ser aplicado como CO₂ supercrítico (35°C, 73 bars), podendo incrementar o rendimento de glicose em 50 – 70%, quando se trabalha com o bagaço (ZHENG *et al.*, 1998), fato este causado provavelmente pelo aumento do tamanho dos poros.

Entre as vantagens do pré-tratamento com explosão a vapor estão o tamanho de partícula do material requerido (15 – 30 mm), que é consideravelmente superior a os utilizados em outros tipos de pré-tratamentos, reduzindo assim os custos de moagem do material (BALLESTEROS, 2002). Além de não empregar catalisadores ácidos, o que reduz os efeitos ambientais.

Entre suas limitações se encontram a destruição de uma parte das xilanas da hemicelulose, a incompleta ruptura da matriz lignina-carboidratos e a geração de compostos que podem ser tóxicos para os microrganismos empregados no processo de fermentação após a hidrólise enzimática. Quando os compostos tóxicos são formados, o material pré-tratado deve ser lavado com água para eliminação os produtos inibidores (McMILLAN, 1994).

4.5.4. PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO

Os pré-tratamentos químicos podem ser definidos como técnicas que envolvem agentes químicos tais como ácidos, bases e solventes orgânicos. Estes pré-tratamentos têm como objetivo aumentar a superfície do substrato por inchamento das fibras e a remoção da hemicelulose e lignina, tornando a celulose mais acessível para a hidrólise enzimática (MOISER *et al.*, 2005).

Um pré-tratamento químico bastante utilizado é o com ácido diluído (GALBE e ZACCHI, 2002). Este tipo de pré-tratamento utiliza diferentes classes de ácidos: sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e fórmico (GALBE e ZACCHI, 2002), sendo os mais utilizados industrialmente o

ácido clorídrico e o sulfúrico. A principal reação que ocorre no pré-tratamento ácido é a hidrólise das hemiceluloses. As hemiceluloses podem ser submetidas a reações hidrolíticas, produzindo inibidores como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), além de outros produtos (FENGEL e WEGENER, 1989). Durante o pré-tratamento ácido, a lignina pode ser rapidamente precipitada (LIU e WYMAN, 2003).

Outro pré-tratamento químico que vem sendo bastante explorado é a oxidação úmida. Um pré-tratamento oxidativo consiste na adição de compostos oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sobre a biomassa, que está submergida em água. Durante o pré-tratamento oxidativo podem ocorrer reações como rompimentos de ligações alquil e aril-éteres ou de núcleos aromáticos (HON e SHIRAISHI, 2001). O emprego de álcalis diluído, como o hidróxido de sódio (NaOH), também é bastante estudado. Normalmente são empregadas soluções de soda diluída, onde o material lignocelulósico é submergido a $60^\circ C$, por 24 horas, produzindo um inchamento da biomassa e ocasionando reações como solvatação e saponificação. Este pré-tratamento promove a remoção das hemiceluloses e lignina, tornando o material mais acessível para as enzimas. Neste pré-tratamento, a perda de polissacarídeos é causada principalmente pelo rompimento dos radicais finais e pelas reações hidrolíticas (FENGEL e WEGENER, 1989).

4.5.4.1. PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

São pré-tratamentos que melhoram a digestibilidade da celulose. Dependendo do tipo de catalisador utilizado, os pré-tratamentos alcalinos podem ser divididos em dois grupos: os que utilizam soluções alcalinas como hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) e aqueles que usam amônia (NH_3) para fazer a remoção da lignina e parte das hemiceluloses (WYMAN, 2005; HAMELINCK, 2005; SUN, 2002). Este tipo de pré-tratamento aumenta a acessibilidade das enzimas celulasas no momento da hidrólise enzimática, promovendo menor degradação dos açúcares, podendo ser feito a baixas temperaturas, tempos relativamente longos e elevada concentração de base (SILVA *et al.*, 2010). Segundo KUMAR *et al.* (2009), pré-tratamentos com solução diluída de NaOH promoveram efeitos sobre o material lignocelulósico, como por exemplo, aumento na superfície interna, diminuição no grau de cristalinidade e polimerização, além de uma separação estrutural das ligações entre a lignina e celulose.

ZHAO *et al.* (2007) observaram que os pré-tratamentos alcalinos foram o método mais eficaz para romper as ligações entre a lignina, hemiceluloses e celulose, evitando a fragmentação dos polímeros de hemicelulose. Encontraram que o pré-tratamento com NaOH obteve uma proporção mais elevada na conversão enzimática da celulose em comparação com os pré-tratamentos ácidos.

Segundo TAHERZADEH e KARIMI (2008), quando a palha de soja foi pré-tratada com solução amoniacal de 10% durante 24 horas à temperatura ambiente, as hemiceluloses e a lignina diminuíram de 45% para 41% e de 30% para 16%, respectivamente. Os autores ainda afirmaram que os pré-tratamentos alcalinos demonstram ser mais eficientes quando empregados em resíduos agrícolas ao invés de resíduos da madeira.

4.5.4.1.1. PRÉ – TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO (CA(OH)₂) OU CAL

O hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) ou cal é usado como reagente no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos como a palha e o bagaço de cana-de-açúcar, entre outros, tornando mais eficiente a conversão enzimática (CHANG *et al.*, 1997 e 1998; KAAR *et al.*, 2000). Trata-se de um reagente de baixo custo que pode ser recuperado no sistema de reação mediante a formação de carbonato de cálcio por precipitação no meio reacional (KUMAR, 2009).

4.5.4.1.1.1. MODO DE AÇÃO DA CAL

A estrutura da lignina é modificada pela presença de um álcali. A modificação se dá, em um primeiro momento, pela degradação da lignina em unidades menores e logo os grupos hidrofílicos (OH-) são introduzidos na macromolécula. A deslignificação alcalina é acompanhada da degradação de diversos carboidratos (celulose e hemiceluloses).

A função do oxigênio nas reações de deslignificação está dirigida à degradação da lignina. A Figura 4.15 mostra que, as reações de deslignificação com a presença de oxigênio não são suficientemente seletivas para preservar os carboidratos da biomassa (RAMIREZ, 2005).

Segundo LÓPEZ (2000), no pré-tratamento com hidróxido de cálcio o cátion Ca^+ se deposita na matriz da celulose na forma de carbonato de cálcio, podendo ser observado através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) e análises termogravimétricas.

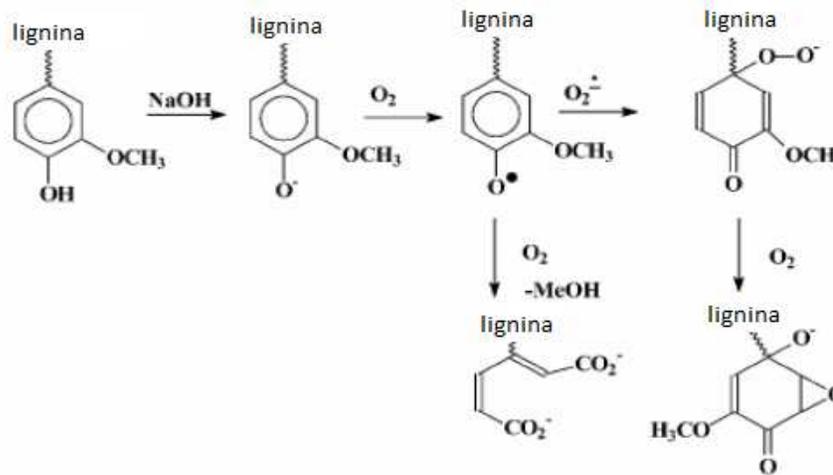


Figura 4. 15: As unidades químicas estruturais associadas com a lignina no tecido lenhoso (LOPEZ, 200).

PLAYNE (1984) realizou um pré-tratamento de bagaço de cana com cal a temperatura ambiente e com tempos de até 192 h para melhorar a digestibilidade enzimática da celulose, obtendo um aumento no rendimento de hidrólise de 20 para 72% após o pré-tratamento. Também foi demonstrado que em temperaturas mais elevadas e menores tempo de reação, houve maior eficiência no pré-tratamento com cal.

CHANG *et al.*, (1997) utilizaram cal no pré-tratamento da *switchgrass* onde as melhores condições foram: 2h de pré-tratamento, a 100-120°C, com uma carga de cal de 0,1 g $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{g}$ de biomassa seca, e uma proporção de água de 9 mL/g de biomassa seca. Em outros estudos desenvolvidos pelos mesmos autores, foi identificado que os tamanhos das partículas influenciaram no pré-tratamento. O rendimento de açúcares redutores foi cinco vezes maior do que da biomassa *switchgrass* não pré-tratada, enquanto que para a xilose e glicose os rendimentos foram sete vezes maiores. O balanço de massa demonstrou que cerca de 10% de

glucana foi solubilizada quando realizado o pré-tratamento com cal, enquanto que 26% e 29% de xilana e lignina, respectivamente, foram solubilizadas.

Em trabalhos realizados por CHANG *et al.* (1998), a cal foi usada como reagente no pré-tratamento para melhorar a digestibilidade na hidrólise enzimática de dois resíduos: bagaço de cana-de-açúcar e palha de trigo. Os estudos sugeriram que para os tempos de pré-tratamento curtos (1-3 horas), altas temperaturas (85-135°C) foram necessárias para obter elevados rendimentos de açúcar. Para tempos de pré-tratamento de 24 horas, baixas temperaturas (50-65°C) foram eficazes. A carga de cal recomendada foi de 0,1g Ca(OH)₂/g de biomassa seca, sendo que a quantidade de água não influenciou significativamente a digestibilidade. O rendimento em glicose aumentou de 153 para 659 mg glicose/g biomassa seca e para o pré-tratamento da palha de trigo aumentou de 65 para 650 mg glicose/g biomassa. Os autores conseguiram remover 86% da cal presente no bagaço pré-tratado através de lavagens.

KIM e HOLTZAPPLE (2005) pré-trataram palha de milho com hidróxido de cálcio na condição de 0,5 g Ca(OH)₂/g de biomassa bruta, mantendo-se em 55°C, durante quatro semanas, com aeração do material pré-tratado. Foram observadas conversões de glucana e xilana em glicose e xilose de 91,3% e 51,8%, respectivamente, quando a hidrólise enzimática foi realizada com 15FPU/g de material seco pré-tratado. Durante a etapa de pré-tratamento, somente 0,073g Ca(OH)₂/g de palha de milho bruta foram consumidas. Quase todos os grupos acetil da biomassa foram retirados, com uma solubilização de aproximadamente 87,5% da lignina. O rendimento global de glicose e xilose foram de 93,2% e 79,5%, respectivamente, na hidrólise com 15FPU/g de biomassa seca pré-tratada. A fração líquida do pré-tratamento com hidróxido de cálcio não teve efeito inibidor no etanol durante a etapa de fermentação.

Segundo SAHA e COTTA (2007), a concentração obtida de glicose para a palha de trigo pré-tratada com cal (100 mg de cal/g palha, 121°C, 1h) foi de 8,6% (m/v), quando submetida às condições de hidrólise de 45°C, pH 5,0, durante 120 h, com uma mistura enzimática de celulase, β-glicosidase e xilanase. A concentração de etanol obtida do material pré-tratado com cal foi 20,6 ± 0.4 g/L com um rendimento de 0,26 g/g palha de trigo, empregando sacarificação e fermentação simultâneas, a partir da utilização de *E. Coli* nas condições de pH 6,0 e 35°C durante 72 horas.

RABELO *et al.* (2009) estudaram o pré-tratamento de bagaço de cana com hidróxido de cálcio utilizando um planejamento composto central, considerando o tempo de pré-tratamento, temperatura e quantidade de cal como variáveis. A resposta avaliada foi o rendimento de glicose a partir do bagaço pré-tratado após a hidrólise enzimática. Experimentos foram realizados utilizando bagaço integral e com uma granulometria de 0,248-1,397 mm (12-60 mesh). Foi observado que o tamanho das partículas apresentou influência na liberação de açúcares fermentáveis após hidrólise enzimática utilizando baixa carga de celulase e β -glicosidase, 3,5 FPU/g de biomassa seca pré-tratada e 1,0 UI/g de seca biomassa pré-tratados, respectivamente.

No trabalho de FUENTES (2009), o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio foi realizado de acordo com um planejamento composto central 2^3 , com o objetivo de avaliar a influência do tempo de pré-tratamento (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de hidróxido de cálcio (m/m) na liberação de açúcares após a hidrólise. A máxima produção de glicose com o pré-tratamento realizado a 90°C , durante 90 h e com uma carga de cal de 0,4 g/g biomassa seca foi de 228,45 mg/g biomassa seca, correspondente a 409,9 mg/g de biomassa seca de açúcares redutores totais (ART). O rendimento de glicose nas condições ótimas de pré-tratamento e hidrolisadas com 5 FPU de celulase/g biomassa bruta e 1 CBU de β -glicosidase/g biomassa bruta, foi de 59,64%.

RABELO (2010), ao comparar dois pré-tratamentos (hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino), avaliando variáveis como tempo, temperatura e concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, verificou que todas as variáveis foram significativas com 90% de confiança, quando o pré-tratamento foi feito com $\text{Ca}(\text{OH})_2$. As condições ótimas operacionais de pré-tratamento foram de 90 h, 90°C e 0,47 g/g de cal, obtendo-se rendimento global de 51,78%. Em relação à etapa de otimização enzimática, foi possível converter 90,8% da celulose presente no material pré-tratado com carga enzimática de 50,0 FPU/g de biomassa seca pré-tratada de celulase, e 25,0 CBU/g biomassa seca pré-tratada de β -glicosidase. Os hidrolisados obtidos para cada pré-tratamento não apresentaram qualquer problema em relação à fermentabilidade, obtendo-se rendimentos em etanol próximos ao estequiométrico.

Segundo XU *et al.*, (2010), a cal foi usada no pré-tratamento da *switchgrass* para melhorar a digestibilidade enzimática a baixas temperaturas (21 e 50°C) e comparada com o pré-tratamento com a de 121°C . Os efeitos do tempo de pré-tratamento, carga de cal,

concentração da biomassa e lavagem do material pré-tratado em relação à eficiência da liberação dos açúcares fermentescíveis após hidrólise enzimática foram investigados. Nas melhores condições de pré-tratamento (50°C, 24 h, 0,10 g cal/g biomassa bruta e 100 mL de água/g de biomassa bruta), os rendimentos de glicose, xilose e açúcares redutores totais atingiram 239,6; 127,2 e 433,4 mg/g de biomassa, que foram, respectivamente, de 3,15; 5,78 e 3,61 vezes maiores que os valores observados para a biomassa não tratada.

4.5.1.2. PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

O peróxido de hidrogênio alcalino pode ser usado no pré-tratamento da biomassa. Neste tipo de pré-tratamento, a biomassa é submergida em uma solução de peróxido de hidrogênio com pH ajustado (11-12, utilizando NaOH) à temperatura ambiente por um determinado período de tempo (6 – 24h) (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Segundo CARDOSO *et al.* (2011), o mecanismo de reação é semelhante ao da hidrólise alcalina, mas é complementado com efeito oxidante direto sobre a lignina. A adição da base hidróxido de sódio ao peróxido de hidrogênio faz com que a solução se torne um agente efetivo na deslignificação e solubilização das hemiceluloses. Isto é devido à formação do ânion hidroperóxido (HOO^-), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe em radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e superóxido (O_2^-). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos, quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina e das hemiceluloses (SUN, 2002; TAHERZADEH M, 2008)

Segundo AZZAM (1989), as condições mais importantes de estudo para o pré-tratamento com H_2O_2 incluem o tempo de reação, a concentração do peróxido de hidrogênio e a temperatura do pré-tratamento. O peróxido de hidrogênio reage com a lignina sob certas condições, e tem sido largamente usado por vários anos como branqueador em polpas de madeira altamente lignificadas para a produção de papel (BAILEY, 1975).

O pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio em resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, aumenta significativamente a susceptibilidade à hidrólise

enzimática e, conseqüentemente, a produção de etanol (TAHERZADEH, 2008). Segundo KUMAR (2009), os inibidores furfural e hidroximetilfurfural (HMF) não foram detectados no processo, o que favoreceu a fermentação. Não há emprego de altas temperatura e pressão neste processo. O H_2O_2 em relação ao ar/oxigênio não requer equipamentos caros de alta pressão com exceção de algumas questões de segurança (TAHERZADEH, 2008).

CURRELI *et al.* (1997) sugeriram duas etapas para o pré-tratamento alcalino/oxidativo brando, baixas temperaturas (25-40°C) e concentração de produtos químicos. Na primeira etapa, o pré-tratamento alcalino foi realizado com uma concentração de NaOH de 1% por 24 h. Nessa etapa, foi observada uma grande solubilização das hemiceluloses. Na segunda etapa foi realizada a etapa de oxidação alcalina com 1% de NaOH e 0,3% H_2O_2 por 24 h, afim de solubilizar e oxidar a lignina.

SUN *et al.* (2005) estudaram a palha de trigo usando pré-tratamentos com base na explosão a vapor seguido de um ataque com peróxido de hidrogênio alcalino. O rendimento de celulose obtido foi de 40% nas condições ótimas de pré-tratamento de explosão a vapor à 220°C, 22 bar e 3 min. O pré-tratamento provocou uma solubilização significativa de hemiceluloses. Após a utilização do peróxido alcalino (2% de H_2O_2 a 50°C durante 5 horas e pH 11,5) houve uma dissolução substancial de lignina e aumento da cristalinidade da celulose.

SAHA e COTTA (2006) avaliaram o pré-tratamento com H_2O_2 e sua posterior hidrólise enzimática, empregando a palha de trigo. A melhor condição de pré-tratamento foi obtida quando se empregou uma solução de 2,15% de H_2O_2 a pH=11,5, temperatura de 35°C e tempo de 24 horas, com condições na hidrólise enzimática de 45°C, pH 5 e tempo de 120 horas. O rendimento de açúcares foi de 672 mg/g de biomassa, dando um rendimento de 96,7%. Em outro estudo SAHA e COTTA (2007) demonstraram que o pré-tratamento com peróxido alcalino foi um método eficiente para a casca de arroz, resultando em uma conversão da celulose de 96%, após a hidrólise enzimática. As condições ótimas de pré-tratamento foram obtidas empregando 7,5% de H_2O_2 (v/v) a pH 11,5, com uma temperatura de 35°C e tempo de 24 horas,

MISHIMA *et al.* (2006) estudaram a hidrólise enzimática de duas plantas aquáticas: alface d'água e aguapé. Foram realizados 20 tipos de pré-tratamentos químicos para a obtenção de açúcares e estes foram comparados a fim de melhorar a eficiência da hidrólise enzimática.

Os resultados mostraram que os pré-tratamentos alcalino/oxidativo em que o NaOH e H₂O₂ foram utilizados, tornaram-se os mais eficazes em termos de rendimentos de açúcares fermentescíveis após a etapa de hidrólise enzimática.

RABELO *et al.* (2008) avaliaram as interações das variáveis que influenciam os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar realizados com peróxido de hidrogênio alcalino e com hidróxido de cálcio. Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, o melhor resultado foi com obtido empregando 7,36% de peróxido, a 25°C durante 1 h. Os autores concluíram que os dois processos promoveram elevados rendimentos de glicose e açúcares redutores totais (ART).

GARCIA (2009) obteve dados experimentais da cinética de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e cinética de hidrólise enzimática posterior do bagaço de cana-de-açúcar. O pré-tratamento foi realizado nas condições determinadas como ótimas para este processo com concentrações de 8% (m/m) de bagaço, 11% (v/v) de peróxido de hidrogênio a pH 11,5. Os dados experimentais para o pré-tratamento foram obtidos nas temperaturas de 25, 45 e 65°C, analisando-se os teores de lignina, celulose e hemiceluloses em função do tempo de pré-tratamento. A 25°C houve menor deslignificação em relação a 65°C, mas não houve degradação da celulose. Foram realizadas hidrólises enzimáticas fixando-se a massa de bagaço em 3% (m/m) e variando-se as concentrações de celulase e β-glicosidase de acordo com um planejamento fatorial completo 2². Os melhores resultados foram obtidos com cargas enzimáticas de celulase 500 FPU/L e β-glicosidase 500 CBU/L.

BANERJEE *et al.*, (2011) estudaram os efeitos de concentração de biomassa (palha de milho), concentração de peróxido de hidrogênio, tempo de residência e controle de pH com mistura enzimática otimizadas de quatro enzimas comerciais. O pré-tratamento foi realizado à temperatura de 23°C a pressão atmosférica. Após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a biomassa foi neutralizada com HCl mas sem efetuar a lavagem do material. Após hidrólise enzimática, rendimentos de 77% em glicose foram obtidos utilizando quando o material foi pré-tratado com uma concentração de sólidos de 15%, empregando 0,125 g H₂O₂/g biomassa com ajuste de pH, com 48 horas de hidrólise enzimática, utilizando uma mistura de enzimas comerciais.

4.6. FORMAÇÃO DE INIBIDORES NA ETAPA DE PRÉ-TRATAMENTO

Os produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação, são agrupados em três categorias (DOMÍNGUEZ, 2003): Derivados de furano; Ácidos alifáticos de baixa massa molecular; Derivados fenólicos.

Em consequência das altas temperaturas empregadas nos pré-tratamentos, os açúcares originados desta hidrólise, principalmente das hemiceluloses, se degradam originando os compostos derivados do furano: o furfural formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) formado como consequência da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose). Dentro dos compostos alifáticos podem ser encontrados o ácido fórmico, resultante da degradação do furfural, e o ácido levulínico, resultante da degradação do HMF. Adicionalmente pode se encontrar ácido acético procedente da hidrólise dos grupos acetil presentes nas hemiceluloses, como pode ser observar na Figura 4.16 (PALMQVIST, 2000).

A lignina também sofre degradação durante o pré-tratamento, originando uma grande variedade de compostos fenólicos. MUSSATTO (2004) relacionou a presença de aldeídos provenientes da degradação da lignina como principal fator de inibição da fermentação. Além da produção de compostos tóxicos, é preciso que o pH do hidrolisado seja neutralizado para que o meio seja propício para a fermentação (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Dentre os compostos inibidores, o ácido acético formado a partir da degradação das hemiceluloses tem sido apontado como um dos principais inibidores do metabolismo microbiano. O efeito inibidor do ácido acético está diretamente relacionado à acidez do meio e, principalmente, à concentração deste no meio de fermentação (FERRARI *et al.*, 1992).

Os extrativos, que são diferentes tipos de resinas (ácidos graxos, terpenóides, e ceras) e compostos fenólicos (flavonóides, taninos, etc.), mesmo em baixa concentração na biomassa *in natura*, também podem agir como inibidores dos microrganismos empregados na fermentação dos hidrolisados (ROSSELL, 2006).

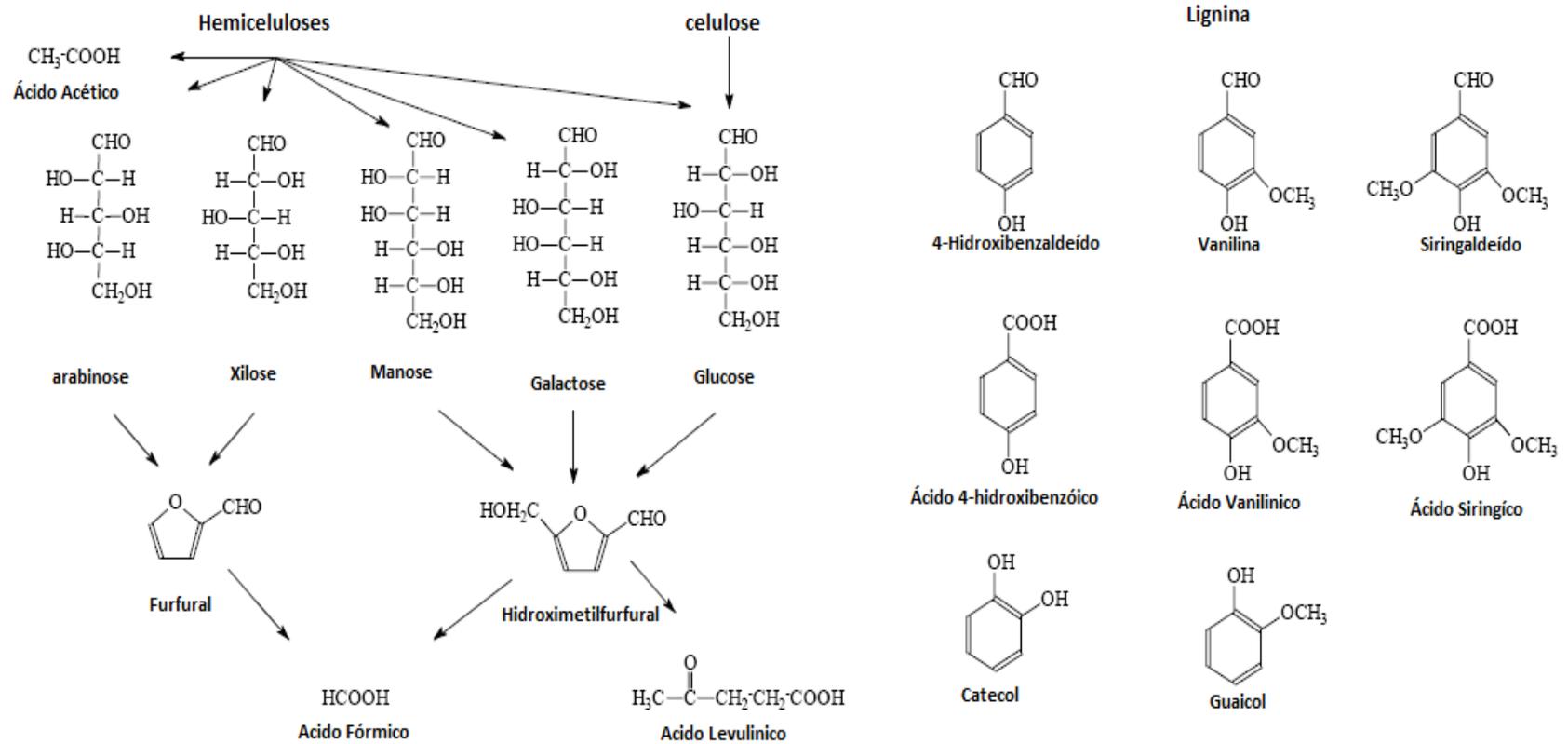


Figura 4. 16: Modelo de formação de compostos inibidores da fermentação, adaptado (DOMÍNGUEZ, 2003; PALMQVIST, 2000).

4.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Devido à proteção da celulose pelos outros componentes da biomassa, a quebra deste polímero se torna bastante difícil (ROSA, 2009; GARCIA, 2009).

O processo enzimático é conduzido em condições brandas de temperatura e pH (temperatura entre 45°C e 50°C e pH entre 4,8-5,0), sendo que a hidrólise completa da celulose requer a ação combinada de múltiplas enzimas (celulases) com especificidades diferentes sobre o substrato (KOVÁCS *et al.*, 2009). As enzimas celulases são produzidas por vários microrganismos, geralmente por bactérias e fungos, os quais podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termofílicos (BALAT, 2011).

As enzimas celulolíticas são caracterizadas por realizar a hidrólise das ligações O-glicosídicas da celulose, estão divididas em três grandes grupos, com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose:

Endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais;

Exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nas cadeias terminais levando à formação de celobiose;

1,4- β -D-glicosidases, que hidrolisam a celobiose à glicose (PETRI, 2010).

A Figura 4.17 é uma representação simplificada da ação enzimática de cada uma das classes de enzimas. As endoglucanases iniciam a hidrólise da celulose através da clivagem randomicamente das ligações internas nas microfibrilas que se encontram nas regiões amorfas, hidrolisando ligações β -(1,4) glicosídicas, diminuindo o comprimento gerando novas extremidades livres. Estas enzimas são responsáveis pela redução do grau de polimerização que ocorre através solubilização do polímero celulósico, devido à sua hidrólise em oligossacarídeos (CASTRO, 2006).

As exoglucanases (exo-1,4- β -D-glucanases) As glucano hidrolases, são capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulósica, atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose, que pode ser detectada pelas técnicas de cromatografia (LIU, 2003).

Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (celobiose), (FERREIRA, 2010)

As enzimas β -D-glicosidases ou β -D-glucosideglucohidrolases catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-glicose a partir da celobiose. A ação das β -glucosidases é caracterizada pela quebra na ligação β -1,4 quando o grupo carboxil do resíduo conservado de ácido glutâmico do sítio ativo doa um próton para a ligação e o íon carbônio formado é estabilizado pelo resíduo de ácido aspártico. A atividade catalítica pode ser medida através da análise dos produtos por cromatografia ou mesmo por espectrofotometria (WYMAN, 2005; FERREIRA, 2010).

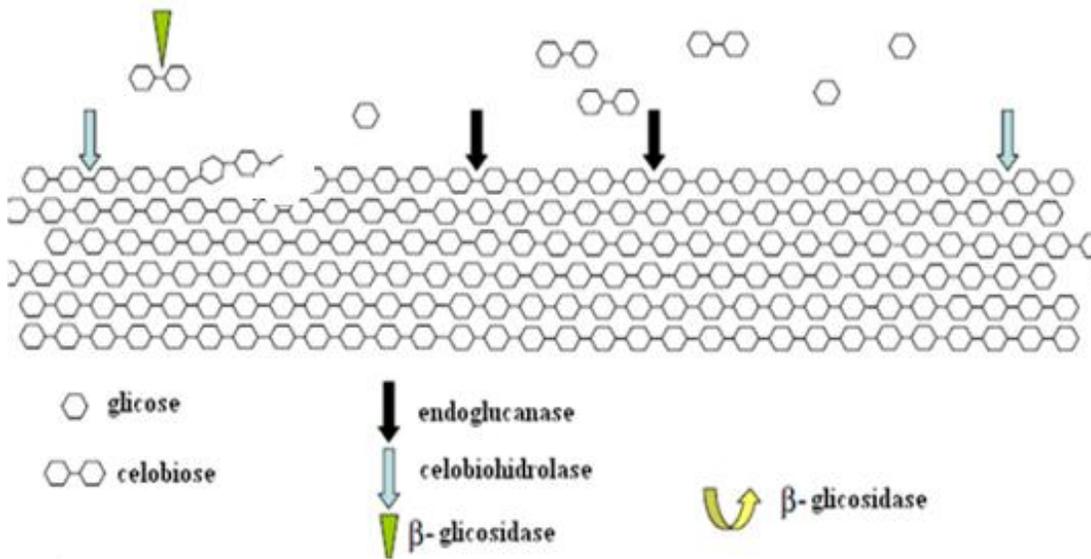


Figura 4. 17: Representação esquemática de um sistema celulósico, observando os sítios de maiores atividades das enzimas celulósicas (adaptado de ARO *et al.*, 2005).

4.7.1. MELHORIA NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A cristalinidade da celulose, área superficial, presença da lignina e das hemiceluloses, assim como o grau de polimerização da celulose são os principais fatores que afetam a degradação dos materiais lignocelulósicos pelas enzimas (WYMAN, 1996).

4.7.1.1. CRISTALINIDADE DA CELULOSE

As microfibras da celulose têm duas regiões, sendo uma cristalina e outra amorfa. A cristalinidade delas é dada pelas quantidades relativas destas duas regiões. A maior parte da celulose (cerca de 2/3 do total) encontra-se na forma cristalina (CHUM *et al.*, 1985). Assim, materiais com alta cristalinidade são mais resistentes ao ataque enzimático e a diminuição da cristalinidade aumenta a digestibilidade do material lignocelulósico (FAN e BEARDMORE, 1980).

4.7.1.2. EFEITO DA LIGNINA

A celulose e as hemiceluloses estão conectadas entre si pela lignina, que é o composto responsável pela rigidez estrutural e inchamento do material lignocelulósico. Sendo assim, o conteúdo da lignina e sua distribuição, constituem o fator mais importante do impedimento dos materiais lignocelulósicos ao ataque enzimático, sendo de extrema importância os processos de deslignificação para melhorar, especialmente, a taxa da hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

4.7.1.3 EFEITO DAS HEMICELULOSES

As hemiceluloses são uma barreira física que envolve as fibras de celulose, protegendo-as no momento do ataque enzimático. Muitos métodos de pré-tratamento têm demonstrado que as hemiceluloses podem ser solubilizadas, tendo como consequência uma melhora no rendimento da hidrólise enzimática. A maioria destes pré-tratamentos também solubiliza parte da lignina, aumentando consideravelmente a eficiência da hidrólise (WYMAN, 1996).

As hemiceluloses podem ser hidrolisadas facilmente pelas enzimas hemicelulolíticas. Além disso, um pré-tratamento adequado com ácido diluído pode solubilizar as hemiceluloses, reduzindo a necessidade de usar misturas de enzimas no momento da hidrólise para a degradação de biomassa (SAHA *et al.*, 2005).

Outros fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose são a atividade da celulase e as condições reacionais, especialmente a temperatura e o pH. Para melhorar o rendimento e a

taxa da hidrólise enzimática, as pesquisas se concentram na otimização do processo de hidrólise e no aumento da atividade enzimática (CANTWELL *et al.*, 1988; DURAND *et al.*, 1988).

4.7.1.4. SUBSTRATOS

A concentração de substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento na etapa inicial da hidrólise enzimática de celulose. Em níveis baixos de substrato, um aumento de sua concentração normalmente resulta em um aumento do rendimento e taxa de reação da hidrólise (CHEUNG e ANDERSON, 1997). Entretanto, alta concentração de substrato pode causar inibição, reduzindo substancialmente a eficiência na hidrólise (HUANG, 1991; PENNER e LIAW, 1994).

4.7.1.5. ATIVIDADE DA CELULASE

Aumentando a carga de celulase no processo, é possível melhorar o rendimento da etapa de hidrólise, mas também aumenta-se significativamente o custo do processo. Cargas de celulase em torno de 10FPU/g celulose são normalmente utilizadas em estudos de laboratório, já que fornecem um perfil de hidrólise com altos níveis de rendimento de glicose em um tempo de 48-72h (GREGG e SADDLER, 1996).

4.7.1.6. INIBIÇÃO PELO PRODUTO FINAL

A atividade enzimática da celulase é inibida pela presença da celobiose e em menor grau pela glicose. Vários métodos têm sido usados para reduzir a taxa de inibição, como por exemplo, o uso de altas concentrações de β -glicosidase durante a hidrólise, a remoção de açúcar durante a hidrólise por ultra filtração ou o uso simultâneo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (SUN e CHENG, 2002).

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1. MATERIAIS

5.1.1. REAGENTES E OUTROS MATERIAIS DE CONSUMO

Para o desenvolvimento desta pesquisa e dos experimentos de cada uma das etapas do trabalho foram utilizados diferentes reagentes, enzimas e alguns equipamentos para alcançar os objetivos propostos. Os reagentes estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5. 1: Reagentes utilizados no desenvolvimento da pesquisa.

Reagente, (Pureza)	Marca
Ácido Sulfúrico, (95–98%)	Synth
Ácido clorídrico, (37%)	Synth
Ácido cítrico mono hidratado, (99,5%)	Synth
Álcool Etílico,(99,5%)	Synth
Fenol, (99%)	Nuclear
Hidróxido de sódio, (95-100%)	Synth
Hidróxido de cálcio, (96%)	Ecibra
Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado, (99%)	Vitec
D-(+)-glicose, ($\geq 99\%$)	Synth
D-(+)-celobiose, ($\geq 99\%$)	Fluka
DL-xilose Fluka, ($\geq 99\%$)	Fluka
D-manose, ($\geq 99\%$)	ChemService
DL-arabinose, ($\geq 99\%$)	Fluka
HMF (hidroximetilfurfural)	ChemService
Peróxido de hidrogênio alcalino	Chemco

Além dos reagentes, outros materiais de consumo foram necessários para a realização dos experimentos:

a. Membrana GS em éster de celulose com poro de $0,22 \mu\text{m}$ e 13 mm de diâmetro da marca Millipore;

b. Membrana HA em ésteres de celulose com $0,45 \mu\text{m}$ e 47 mm de diâmetro da marca Millipore;

c. Seringa descartável Injex 10 mL;

- d. Seringa Hamilton 25 μ L;
- e. Suporte para filtração swinnex em polipropileno com 13 mm de diâmetro, autoclavável, da marca Millipore.

5.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para a execução dos experimentos foram:

- * Analisador de umidade por infravermelho IV 2000 da marca Gehaka
- * 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 termostaticado modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$;
- * Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (HPLC - *High Performance Liquid Chromatographic*) da Waters, com injetor manual, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e UV/Visível modelo 2489, com software de integração Em power 2;
- * Destilador de água da marca Quimis;
- * Espectrofotômetro UV Mini-1240 da marca Shimadzu;
- * Estufa com circulação e renovação de ar modelo MA-035 da marca Marconi;
- * Medidor de pH modelo D 22 da marca Digimed, com precisão de 0,01;
- * Mufla da marca Quimis;
- * Espectrofotômetro visível marca FEMTO modelo 600S;

- * Incubadora refrigerada modelo MA 836 marca Marconi;
 - * Agitador mecânico modelo MA 259 marca Marconi;
 - * Reator de 1L de capacidade;
 - * Evaporador rotativo modelo MA 120 marca Marconi;
 - * Bomba de vácuo modelo MA 057/3 marca Marconi;
 - * Moinho de bancada modelo MA 630 marca Marconi;
 - * Centrifuga modelo NT 810 marca Novatécnica;
 - * Peneira para análise e controle granulométrico malha 150TY marca Abronzincox;
 - * Peneira para análise e controle granulométrico malha 80TY marca Abronzincox.
- *Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X.
Modelo MEV: Leo 440i
- *Espectrofotômetro NICOLET IR 100 FT-IR da marca THERMO
- *Um difratômetro de raios X, com um tubo de cobre gerador de raios X com filamento de tungstênio ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg - 2θ),

5.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Foi utilizada como substrato palha de cana-de-açúcar proveniente da usina Cerradinho Açúcar, Etanol e Energia S/A (Região de Catanduva-SP), coletada em março de 2009.

5.4. ENZIMAS

Foram utilizadas as enzimas celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma-Aldrich) e β - glicosidase de *Aspergillus niger* C6105 (Sigma-Aldrich). O pH e temperatura ótimas foram determinados experimentalmente por RABELO (2010).

5.5. PREPARAÇÃO E ANÁLISE DA BIOMASSA

5.5.1. SECAGEM DA BIOMASSA

A palha de cana-de-açúcar foi seca ao sol por 2 dias, sendo posteriormente moída em moinho de martelete simplesmente para diminuição do tamanho e armazenada em sacolas plásticas hermeticamente fechadas.

5.5.2. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA NA BIOMASSA

Foi utilizada como referência para determinação da distribuição do tamanho de partícula na biomassa a metodologia descrita em RABELO (2010). O objetivo foi determinar a granulométrica da palha de cana-de-açúcar após moagem.

Para tanto, foram utilizadas séries de Taylor de 12,16,20,24,28,35,48 e 60 mesh para a separação do material. Inicialmente, as peneiras foram pesadas e empilhadas em ordem crescente (de cima para baixo). Cerca de 60 gramas da palha de cana-de-açúcar foram colocados na parte superior da série, sendo peneirados durante 15 minutos. Após este período, cada uma das peneiras foi novamente pesada para determinar a quantidade de material retido em cada uma delas. O procedimento foi feito em triplicata. O cálculo foi determinado segundo a Equação 5.1 descrita por RABELO (2010).

$$Fração_{+i} \% = \left(\frac{M_{+i}}{\left(\sum_i^n M_i \right) + M_{-n}} \right) \times 100$$

Equação 5. 1

Onde:

M_{+i} : massa das partículas retidas na peneira de i mesh, em g;

M_{-n} : massa das partículas que não foram retidas na peneira de n Mesh, em g.

n corresponde às peneiras de 16, 20, 24, 28, 35, 48 e 60 mesh

5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Foram realizadas análises da composição química para a palha da cana antes e após cada etapa de pré-tratamento. Foram analisados o teor de umidade, cinzas, extrativos, carboidratos, lignina solúvel e insolúvel.

5.6.1. TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade foi calculado utilizando o analisador de umidade por infravermelho IV 2000 da marca Gehaka. Foram colocadas 5,0 g do material úmido no prato de alumínio e determinada a porcentagem de umidade no final do tempo, com uma precisão de 0,05g. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O cálculo da quantidade de material úmido a ser usado nos ensaios experimentais foi determinado pela seguinte Equação 5.2:

$$g. MU = \frac{g. MS * 100}{100 - umidade}$$

Equação 5. 2

Onde:

g MU = grama do material úmido.

g MS= grama do material seco.

5.6.2. DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Para determinação do teor de cinzas na biomassa, o estudo foi baseado no procedimento descrito por SILVA (2009).

Inicialmente, foi determinado o teor de umidade das amostras usando o procedimento descrito no item anterior. Esta umidade foi descontada da massa da amostra pesada para realização do experimento.

Cadinhos de porcelana de 50,0 mL foram calcinados e tarados, numerados e pesados em uma balança analítica com precisão de 0,01g, tendo suas massas anotadas (M_a). Foram pesados aproximadamente 2 g de material lignocelulósico (base seca) em cada cadinho (M_b), tendo sido estes cadinhos pré-calcinados à temperatura de 400°C, por aproximadamente 1 h. O material foi, então, calcinado por 2h à 800°C.

Após este período, a mufla foi desligada e esperou-se até que o material resfriasse. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e efetuados a pesagem do material. A calcinação foi repetida por mais 15 min para verificar a constância do peso (M_c). As análises foram realizadas em triplicata.

O teor de cinzas foi calculado a partir da Equação 5.3:

$$\% \text{ cinza} = \frac{M_c - M_a}{M_b - M_a} \times 100$$

Equação 5. 3

Onde:

M_a : massa do cadinho calcinado vazio, em g.

M_b : massa do cadinho + massa da palha seca, em g.

M_c : massa do cadinho com cinzas, em g.

5.6.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE EXTRATIVOS

A determinação do teor de extrativos foi baseada na metodologia descrita por FUENTES (2009). Foram pesados em cartuchos de extração feitos de papel 4 g de palha, previamente moída (20 mesh) e seca, e colocados para serem extraídos em um aparelho soxhlet. A cada balão do extrator foram adicionados 190 mL de álcool etílico (99% de pureza) e uma quantidade de pérolas de vidro para controlar a ebulição. A extração foi considerada finalizada quando o solvente que se encontrava em volta do cartucho de extração tornava-se incolor, sendo o solvente trocado por solvente fresco após cada 12h de extração (até o final da extração

com álcool trocou-se o solvente 3 vezes). Em seguida, o solvente foi trocado por água quente para continuar a extração até retirar o restante de extrativos e o excesso de solvente da palha. A água foi trocada por água fresca a cada 8h (3 trocas até o final da extração). Após esta etapa, os cartuchos foram retirados e secos em estufa a 105°C até massa constante. As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo do teor de extrativos foi baseado em FUENTES (2009), pela Equação 5.4

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100$$

Equação 5.4

M_i = massa inicial de palha seca (g)

M_f = massa final da palha livre de extrativos (g)

5.7. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL, SOLÚVEL E AÇÚCARES.

A caracterização química das amostras de palha bruta e palha pré-tratada foi realizada empregando-se a metodologia analítica para biomassa de cana-de-açúcar descrita por SILVA (2009).

Amostras de 1 g (massa seca) de palha de cana-de-açúcar (moída a 20 mesh) foram pesadas com precisão de 0,01g e transferidas para um tubo de ensaio de 70mL para serem tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72%, mantendo-se sob vigorosa agitação contínua em um banho termostaticado a 45,0 ± 0,5°C por 7 min.

A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a amostra transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume de água a 275 mL. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a uma temperatura de 121 °C.

Após a descompressão da autoclave, o erlenmeyer foi retirado, e resfriado à temperatura ambiente e a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL, que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico que

contém o hidrolisado foi armazenado para posterior análise de carboidratos e lignina solúvel. A leitura da lignina solúvel tem que ser feita até 6 horas após coleta do hidrolisado.

5.7.1. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA KLASON (INSOLÚVEL)

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 4 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa à temperatura de 80°C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina, já que parte deste material é constituída pelas cinzas que são insolúveis em ácido.

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente, estes materiais foram pré-calcinados à temperatura de 400°C, por aproximadamente 1 h, e em seguida calcinou-se o material por 2 h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item 5.6.2 e então se obter a massa real de lignina insolúvel.

O teor de lignina Klason foi calculado segundo a Equação apresentada por FUENTES (2009) pela Equação 5.5.

$$\% \text{ Teor de Lignina Klason} = \frac{M_{Kla} - M_p}{M_b} \times 100 - \% \text{ cinzas} \quad \text{Equação 5. 5}$$

M_b = massa da palha absolutamente seco, (g).

M_p = massa do papel filtro tarado, (g).

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

5.7.2. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL

O teor de lignina solúvel foi determinado conforme o método Klason avaliado por GOUVEIA *et al.* (2009).

A parte líquida do hidrolisado foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, o qual logo após a transferência teve seu volume aferido com água destilada. A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível mini Shimadzu modelo 1240. Foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL uma alíquota de 5mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 mol/L (pH final próximo a 12) (SILVA, 2009).

Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. A Equação 5.6 corresponde à curva analítica da lignina proveniente da palha no comprimento de onda de 280 nm.

$$C_{lig} = \frac{(A_{280nm} - 3,2 * 10^{-2})}{19,6} \quad \text{Equação 5. 6}$$

Onde:

C_{lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L).

A_{280nm} : Absorvância do hidrolisado em 280 nm.

Em seguida, foi obtida a Equação 5.7 para determinação de lignina solúvel para a palha(SILVA, 2009). A equação considera a presença de HMF e furfural, pois assim como a ligni

na,

esse

$$C_{lig} = \frac{(A_{280nm} - (\epsilon_{HMF} * C_{HMF} + \epsilon_{Furf} * C_{Furf}) - 3,2 * 10^{-2})}{19,6}$$

s

dois compostos têm máxima absorvância em 280 nm (OLIVEIRA, 2010).

Equação 5. 7

C_{Lig} : concentração de lignina solúvel, em g/L.

A_{Hid} : absorvância da amostra de hidrolisado em 280 nm.

C_{HMF} : concentração de HMF determinada por HPLC, em (g/L).

$C_{furf.}$: concentração de furfural determinada por HPLC, em (g/L).

ϵ_{HMF} : absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g-1.cm-1).

$\epsilon_{furf.}$: absortividade do furfural (146,85 L.g-1.cm-1).

5.7.3. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR CROMATOGRAFIA

As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose presentes no filtrado da hidrólise com ácido sulfúrico 72% do material lignocelulósico foram analisados por HPLC. Foram injetadas no cromatógrafo líquido soluções contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose para a construção das curvas de calibração, necessárias para a quantificação dos carboidratos e produtos de decomposição. A curva foi realizada utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após injeção no cromatógrafo. Os resultados foram utilizados para calcular uma concentração desconhecida de açúcares em relação a uma área determinada e conhecida.

Alíquotas de aproximadamente 2mL de cada hidrolisado, obtido após a etapa de filtração da hidrólise ácida, foram neutralizadas com carbonato de cálcio a pH entre 5-6 (este procedimento não foi feito para as amostras provenientes da hidrolise enzimática). O carbonato deve ser adicionado lentamente para evitar a formação de espuma. Os hidrolisados neutralizados foram filtrados diretamente em vials utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 μ m (Milipore) e injetados com uma válvula Rheodyne (injeção manual) equipada com alça de injeção de 20 μ L em uma coluna Sugar Paks (Waters), utilizando como fase móvel água deionizada filtrada e desgaseificada com fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura do forno foi de 75 °C. A detecção de compostos separados foi feita com um detector de índice de refração (IR) modelo 410 da Waters com temperatura de detector de 40 °C. As concentrações de cada componente foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e as curvas de calibração.

As massas de celobiose e glicose foram convertidas em celulose, com os fatores de 0,95 e 0,90, respectivamente, como também as massas de xilose e arabinose foram convertidas para

hemiceluloses empregando-se o fator de correção de 0,88. O cálculo do teor de carboidratos foi realizado com a Equação 5.8 descrita por RABELO (2010).

$$\% \text{ açúcares} = \left(\frac{C_{HPLC} \times CA \times V_{filtrado}}{M_b} \right) \times 100$$

Equação 5. 8

C_{HPLC} = concentração do açúcar quantificado por HPLC, (g/L).

CA = Fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose= 0,95, glicose= 0,9, xilose= 0,88, arabinose = 0,88).

$V_{filtrado}$ = volume do hidrolisado filtrado, (0,285 L).

M_b = massa da palha seca, (g).

5.7.4. DETERMINAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

Furfural e hidroximetilfurfural foram quantificados por HPLC conforme metodologia descrita por ZAUTSEN (2008). Foram utilizadas uma coluna delta pak C18 (15cm X 3,9mm)*5µm 300Å Waters, com pré-coluna, temperatura do forno de 25°C, fluxo de 0,5ml/min, volume de injeção de 10µL. A detecção foi feita com detector de UV-VIS no comprimento de onda de 280nm, com fase móvel de acetonitrila 2,5% em ácido fosfórico 2mM.

O hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi previamente diluído com água na razão de 1:5, sendo posteriormente filtrado em membrana GS de celulose de diâmetro de poro de 0,22 µm (Milipore) para remoção de partículas sólidas das amostras, e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 µL. Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Waters. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

5.7.5. TEOR DE ÁCIDO ACÉTICO

O ácido acético foi determinado por HPLC, em uma coluna sugar AS 101 (18,0mm ID x300mm) (Shodex) e pré-coluna sugar SH-G (Shodex), utilizando-se como fase móvel uma solução de 0,01 mol/L de H₂SO₄ com fluxo de 1mL/min, à temperatura de 30°C do detector IR e 50°C no forno.

O hidrolisado foi previamente filtrado em membrana GS de celulose de diâmetro de poro 0,22 µm (Milipore) injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 µL. Os compostos foram detectados por índice de refração IR Waters. As concentrações de ácido acético foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com o composto puro.

5.8. ANÁLISE DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de palha de cana-de-açúcar foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (stubs) e submetidas ao recobrimento metálico de 10 nm de ouro em um metalizador Sputter Coater POLARON Modelo SC7620 da Marca VG Microtech (Uckfield, Inglaterra). O equipamento se encontra no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) pertence à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

As micrografias e/ou microanálises elementares de MEV foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X. Modelo MEV: Leo 440i; Modelo EDS: 6070; Marca MEV/EDS: LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra), utilizando-se tensão de aceleração igual a 15 kV. As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras da palha após a etapa de pré-tratamento.

5.9. ANÁLISE DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Esta análise foi feita com o propósito de se avaliar a mudança de cristalinidade da palha de cana-de-açúcar após a etapa de pré-tratamento. Amostras moídas e devidamente secas do

material foram preparadas para a análise de difratometria de raios X, utilizando um difratômetro de raios X, com um tubo de cobre gerador de raios X com filamento de tungstênio ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg - 2θ), passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1s. O equipamento se encontra no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) pertence à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado conforme Equação 5.9 descrita por SILVA (2009).

$$I_c = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) * 100$$

Equação 5. 9

Onde

I_c = índice de cristalinidade (%).

I_{002} = intensidade do pico no plano cristalino 002 ($2\theta = 22,6^\circ$).

I_{am} = intensidade do pico na fase amorfa ($2\theta = 19,0^\circ$).

5.10. ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Esta análise foi realizada com o objetivo de avaliar mudanças na estrutura química da palha de cana provocadas pelas etapas de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino ou hidróxido de cálcio. As análises de FTIR foram baseadas na metodologia descrita por SILVA (2009).

Amostras de palha de cana-de-açúcar foram previamente secas em estufa à 60°C juntamente com KBr, sendo posteriormente resfriadas por 30 min em dessecador. Pastilhas de KBr foram preparadas contendo 250 mg de KBr e 1,5 mg de amostra e compactadas manualmente para formação da pastilha. O mesmo foi feito para a referência, contendo apenas KBr. Em seguida, foram medidos os espectros na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro NICOLET IR 100 FT-IR da marca THERMO. Foi feita uma comparação dos espectros obtidos entre as amostras pré-tratadas com peróxido de hidrogênio alcalino ou com

hidróxido de cálcio e a amostra de palha bruta. O equipamento pertence à Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

5.11. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para determinação da atividade das enzimas foram preparadas soluções com várias concentrações de enzimas em tampão citrato 0,05 mol/L e pH 4,8.

5.12. PREPARAÇÃO DO TAMPÃO CITRATO

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

Foram dissolvidas 10,5 g de ácido cítrico monohidratado em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,3, para depois ser completado o volume de 50mL. Para que o pH atingisse o valor de 4,5, a solução de 50 mL foi transferida para um balão volumétrico de 1 L que foi completado com água destilada e assim, obter uma solução tampão de citrato pH 4,8 a 1 mol/L.

5.12.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CELULASE

A determinação da atividade enzimática foi realizada partindo de uma solução de celulase de diluição 1:20. A partir dessa solução, foram preparadas 5 novas diluição em tampão citrato.

O preparo do reagente DNS foi realizado segundo BAZÁN (1993) e descrito por Rabelo (2010). Para isto foram dissolvidos 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1000 mL de água. A esta mistura adicionou-se 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.

Em cada tubo foi adicionado 1,00 mL de tampão citrato 0,05 mol/mL pH 4,8, e posteriormente adicionado 50 mg de papel de filtro cortado em pequenas tiras (2mm*2mm aproximadamente) tomando o cuidado que o papel ficasse no fundo do tubo imerso de tampão.

Os tubos foram incubados em um banho termostatizado a 50°C por 10 minutos. Depois deste período, foi adicionado 0,5mL de cada uma das enzimas previamente diluídas em tampão citrato, e os tubos foram deixados no banho por mais 60 minutos. Ao final deste período, a reação foi parada pela adição de 1,5 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e logo em seguida colocados em um banho de gelo fundente. Para leitura da absorbância foi deixado precipitar o papel e logo foi feita a leitura no espectrofotômetro a 540nm

De acordo com GHOSE (1987), uma unidade da atividade enzimática (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente em moles (2,0/0,18016 μmol) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5 mL), e no tempo de incubação requerido (1 hora) para a geração dos equivalentes (enzima diluída). Este conceito é mostrado na Equação 5.10 descrita por FUENTES (2009) e RABELO (2010).

$$\frac{FPU}{mL} = \left(\frac{2.0}{0,1816 \times 0,5 \times 60 \text{ (enzima diluída)}} \right) \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$$

$$\frac{FPU}{mL} = \left(\frac{0,37}{\text{enzima diluída}} \right)$$

Equação 5. 10

5.12.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA β -GLICOSIDASE

A atividade da β -glicosidase foi determinada através de uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU). A metodologia foi baseada em trabalhos de WOOD e BHAT (1988) e descrita por FUENTES (2009).

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução de celulase de diluição 1:1000, sendo feita 5 novas diluições a partir desta em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8.

Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e estes foram incubados em um banho termostático a 50°C durante 10 minutos. Após este período, sem retirar os tubos do banho, foi adicionado 0,5 mL da enzima diluída a cada tubo e deixados reagir durante 30 min. Ao término da reação, os tubos foram imersos em um banho de água fervente por 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo.

Para a determinação da concentração de glicose liberada, 20 µL de solução final foi adicionada a 2mL do mono-reagente glicose GOD PAP. Os tubos foram incubados em um banho a 37°C durante 10 minutos. Ao final deste período, efetuou-se a leitura a 540 nm em um espectrofotômetro.

O cálculo da atividade enzimática da β-glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 µmol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. Na Equação 5.11 é apresentada a fórmula utilizada para o cálculo da atividade segundo FUENTES (2009).

$$\frac{CBU}{mL} = \left(\frac{2,0}{0,1816 \times 10 \times 30(\text{enzima diluída})} \right) \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$$

$$\frac{CBU}{mL} = \left(\frac{0,0926}{\text{enzima diluída}} \right)$$

Equação 5. 11

5.13. REAÇÕES DO PRÉ-TRATAMENTO

5.13.1. PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

Amostras de aproximadamente 15,0 ± 0,01g de palha seca foram tratadas com 100 mL da solução contendo H₂O₂ alcalino a uma concentração pré-determinada pelo planejamento experimental. e imediatamente levadas para um reator de um litro de capacidade, com agitação

de 150 rpm através de um agitador tipo hélice conforme Figura 5.1.. A temperatura foi controlada por um banho termostático circulando água pela camisa do reator e as demais condições operacionais como temperatura e o tempo reacional foram pré-determinados pelo planejamento experimental.



Figura 5. 1: Reator utilizado no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ao término de cada uma das reações, o líquido reacional foi descartado e os resíduos restantes lavados com água até que toda a coloração desaparecesse e o pH ficasse neutro. As amostras foram espremidas manualmente para retirar o excesso de água, pesadas em uma balança analítica e armazenadas sob refrigeração em sacolas plásticas identificadas, estando assim próprias para utilização na etapa de hidrólise enzimática.

Os valores decodificados dos níveis de cada uma das variáveis nos experimentos estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5. 2: Faixa de valores estudados no planejamento fatorial completo do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (min)	26,40	40	60	80	93,60
Temperatura (°C)	11,40	25	45	65	78,60
Concentração de H₂O₂(%)	1,64	3	5	7	8,63

A Tabela 5.3 apresenta as combinações dos níveis de cada um dos ensaios realizados para as amostras de palha, sendo os ensaios 2, 5 e 11 as repetições do ponto central.

Tabela 5. 3: Valores decodificados das variáveis tempo, temperatura e concentração de H₂O₂.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração de H ₂ O ₂ (%)
1	80,00	65,00	3,00
2*	60,00	45,00	5,00
3	40,00	65,00	7,00
4	80,00	25,00	7,00
5*	60,00	45,00	5,00
6	40,00	25,00	7,00
7	40,00	65,00	3,00
8	80,00	25,00	3,00
9	80,00	65,00	7,00
10*	40,00	25,00	3,00
11	60,00	45,00	5,00
12	26,40	45,00	5,00
13	93,60	45,00	5,00
14	60,00	11,40	5,00
15	60,00	78,60	5,00
16	60,00	45,00	1,64
17	60,00	45,00	8,63

* Pontos centrais.

5.13.2. PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO (CAL)

O planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência de três variáveis independentes no pré-tratamento com hidróxido de cálcio sobre a palha de cana-de-açúcar: tempo de reação (h), temperatura (°C) e concentração do reagente (g/g). Amostras de 12,0 g de palha de cana seca foram pesadas em erlenmeyers de 500 mL, sendo adicionados 300 mL de água destilada a cada amostra juntamente com quantidades de cal pré-determinadas pelo planejamento experimental. Estas amostras foram colocadas em incubadora refrigerada a uma

temperatura e tempo previamente determinados pelo planejamento experimental. As amostras foram fechadas e mantidas sob rotação de 150 rpm. O pré-tratamento foi realizado em shaker e apresentado na Figura 5.2



Figura 5. 2: Palha de cana pré-tratada com hidróxido de cálcio.

Os valores decodificados dos níveis de cada uma das variáveis nos experimentos estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4: Faixa de valores estudados no planejamento fatorial completo do pré-tratamento com cal.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo de contato (h)	53,1	65	82,5	100	111,9
Temperatura (°C)	83,3	86	90	94	96,7
Concentração de Cal (g/g)	0,15	0,25	0,4	0,55	0,65

A Tabela 5.5 apresenta as combinações dos níveis de cada um dos ensaios realizados para as amostras de palha de cana-de-açúcar, sendo os ensaios 15.1, 15.2 e 15.3 as repetições no ponto central.

Tabela 5. 5: Valores decodificados das variáveis tempo, temperatura e concentração do hidróxido de cálcio.

Ensaio	Concentração de cal (g/g)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	0,25	65,00	86,00
2	0,55	65,00	86,00
3	0,25	65,00	94,00
4	0,55	65,00	94,00
5	0,25	100,00	86,00
6	0,55	100,00	86,00
7	0,25	100,00	94,00
8	0,55	100,00	94,00
9	0,40	53,07	90,00
10	0,40	111,93	90,00
11	0,40	82,50	83,27
12	0,40	82,50	96,73
13	0,15	82,50	90,00
14	0,65	82,50	90,00
15.1*	0,40	82,50	90,00
15.2*	0,40	82,50	90,00
15.3*	0,40	82,50	90,00

* Pontos centrais.

Ao final de cada reação, os erlenmeyers foram submergidos em um banho de gelo fundente para interromper a reação. Após este processo, o pH foi ajustado a 7.0 para calcular o excesso de cal remanescente no pré-tratamento. Posteriormente, a palha foi lavada, espremida manualmente para retirar o excesso de água, pesada em uma balança analítica e armazenada sob refrigeração em sacolas plásticas identificadas, estando assim próprias para utilização da etapa de hidrólise enzimática.

5.13.2.1. QUANTIFICAÇÃO DO EXCEDENTE DE CAL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO

Excesso de cal foi usado para manter um pH alcalino (≥ 12.0), requerido para o pré-tratamento. Para a quantificação do excedente de cal após o pré-tratamento foi seguida a metodologia descrita por RABELO (2010).

As amostras foram transferidas para um erlenmeyer de 1L, sendo o volume final ajustado para cerca de 750mL. O erlenmeyer contendo a palha foi colocado sobre um agitador magnético. Um sistema de titulação foi montado e a bureta preenchida com uma solução de 5 mol/L de ácido clorídrico para neutralizar o excesso de cal. À medida em que o ácido era adicionado, a suspensão permanecia por um período de descanso por aproximadamente uma hora para que toda a cal pudesse se desprender da biomassa e para assegurar que o pH estivesse estabilizado. Caso houvesse alteração no pH, uma nova quantidade de ácido era adicionado, e novamente deixado em descanso por mais uma hora até que o pH se tornasse estável. O excedente de cal foi calculado com a Equação 5.12 (RABELO, 2010):

$$m_{Ca(OH)_2NR} = \frac{1mol - Ca(OH)_2}{2molHCl} * \frac{C_{HCl} * V_{HCl}}{1000} * MM_{Ca(OH)_2}$$

$$m_{Ca(OH)_2R} = m_{Ca(OH)_2i} - m_{Ca(OH)_2NR}$$

Equação 5. 12

Onde:

$m_{Ca(OH)_2NR}$ = Quantidade de cal não reagida, g.

$m_{Ca(OH)_2R}$ = Quantidade de cal que reagiu, g.

$m_{Ca(OH)_2i}$ = Quantidade de cal inicial definida pelo planejamento, g.

$MM_{Ca(OH)_2}$ = massa molar de hidróxido de cálcio, 74,092 g/mol.

C_{HCl} = concentração da solução de HCl padronizada, mol/L.

V_{HCl} = volume de HCl utilizado na titulação, mL.

5.8. HIDRÓLISE DA PALHA PRÉ-TRATADA

Para verificar a influência de cada um dos parâmetros estudados na etapa do pré-tratamento, hidrólises foram realizadas para cada uma das amostras nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima e realizada a quantificação da glicose por HPLC.

Após a determinação da umidade de cada um dos ensaios, aproximadamente 3,0 g (massa seca) do material pré-tratado foi pesado em erlenmeyers e aproximadamente 100 mL de tampão citrato foram adicionados (descontando do tampão a água contida na palha pré-tratada calculada). O pH das amostras foi ajustado para 4,8 caso houvesse alguma alteração no valor. Os erlenmeyers foram fechados para que não houvesse uma alteração considerável dos volumes reacionais e encubados em 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, 2010).

Para investigar as condições de pré-tratamento e verificar quais variáveis do processo influenciavam esta etapa, amostras do líquido reacional da hidrólise enzimática (aproximadamente 1mL) foram coletas em períodos de tempo pré-determinados, isto é, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h, e, então, fervidas por 15 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas.

Para a avaliação de cada pré-tratamento, utilizaram-se concentrações de celulase e β -glicosidase de 15 FPU/g de biomassa seca e 25 CBU/g de biomassa seca, respectivamente.

Ao final das 72 h de hidrólise e após a coleta do líquido reacional nos diferentes tempos, os resíduos restantes foram lavados com água destilada até que todo o açúcar fosse retirado do resíduo (aproximadamente 6 litros). As amostras foram colocadas em estufa, secas a uma temperatura de 100°C, pesadas em uma balança analítica e armazenadas na geladeira em sacolas plásticas previamente identificadas.



CAPÍTULO VI

RESULTADOS E DISCUSSÕES DO PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HÍDROGÊNIO ALCALINO

6.1. ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A análise granulométrica foi utilizada como referência para determinação da distribuição do tamanho de partícula da palha de cana-de-açúcar utilizada nos experimentos de pré-tratamento e hidrólise. Na Figura 6.1 é apresentada uma amostra da palha “bruta” utilizada nos dos experimentos.



Figura 6. 1: Palha de cana-de-açúcar.

Após a separação e análise granulométrica da palha, a fração mássica retida foi calculada e os valores médios destes resultados foram dispostos na Tabela 6.1.

Tabela 6. 1: Fração mássica da palha de cana-de-açúcar bruta.

Peneiras	Abertura (mm)	Diâmetro médio da partícula (mm)	Medida da massa de palha retida (g)	Fração em massa retida (%)
+16	>1,00	1,090	4,45 ± 0,21	7,68 ± 2,54E-03
-16 +20	0,850	0,925	3,80 ± 0,28	6,56 ± 3,92E-03
-20 +24	0,710	0,780	3,65 ± 0,07	6,30 ± 2,97E-04
-24 +28	0,600	0,655	7,75 ± 0,07	13,39 ± 7,40E-04
-28 +35	0,425	0,513	7,45 ± 0,21	12,87 ± 1,78E-03
-35 +48	0,300	0,363	5,65 ± 0,49	9,75 ± 7,12E-03
-48 +60	0,250	0,275	5,85 ± 0,49	10,11 ± 1,00E-02
-60	< 0,250	0,250	19,30 ± 0,00	33,34 ± 4,89E-03

Pode-se observar, analisando a Tabela 6.1, que a maior parte da palha de cana utilizada nos experimentos, cerca de 33,34%, apresenta um diâmetro médio inferior a 0,25 mm. A palha

neste trabalho não foi separada granulometricamente, simplesmente foi feita uma moenda prévia para diminuição do tamanho.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A palha bruta foi inicialmente caracterizada com a finalidade de conhecer a sua composição química.

Para a caracterização da palha, determinou-se o conteúdo de umidade e cinzas, os quais foram de 7,87% e 9,61%, respectivamente. Após esta determinação, a palha foi submetida à hidrólise ácida, com o objetivo de obter o teor de seus constituintes: celulose, hemicelulose e lignina e também foi feita a determinação dos extrativos. Os resultados da composição são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6. 2: Composição química da palha de cana-de-açúcar em base seca.

Componentes	Porcentagem (%)
Celulose	34,43± 0,44
Hemiceluloses	23,61± 0,18
Lignina	24,09± 0,08
Extrativos	7,67± 0,04
Cinzas	9,61± 0,50
Outros	0,60

Em relação à quantidade de cinzas, é preciso considerar que há diferentes concentrações de cinzas dependendo da forma de colheita da palha, ou seja, a que está localizada próxima ao solo apresenta concentração de cinzas em torno de 7 a 10%. No entanto, a palha proveniente da região central e folhas verdes da cana apresenta quantidade de cinzas consideravelmente menor, em torno de 2 a 3%, ICIDCA (1999)

6.3. PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO: PLANEJAMENTO FATORIAL 2³+ CONFIGURAÇÃO ESTRELA COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL

O planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência de três variáveis independentes no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio da palha: tempo de reação (min), temperatura (°C) e concentração de H₂O₂ (%). A matriz de planejamento é mostrada na Tabela 6.3, são apresentadas as condições experimentais em cada um dos ensaios onde os ensaios 2, 5 e 11 são triplicatas no ponto central. Os testes foram realizados com alta concentração de sólidos foi trabalhado com 15% de palha de cana "bruta".

Tabela 6. 3: Condições de cada um dos ensaios no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ensaio	t (min)	T (°C)	C (v/v)
1	80,00	65,00	3,00
2*	60,00	45,00	5,00
3	40,00	65,00	7,00
4	80,00	25,00	7,00
5*	60,00	45,00	5,00
6	40,00	25,00	7,00
7	40,00	65,00	3,00
8	80,00	25,00	3,00
9	80,00	65,00	7,00
10	40,00	25,00	3,00
11*	60,00	45,00	5,00
12	26,36	45,00	5,00
13	93,64	45,00	5,00
14	60,00	11,36	5,00
15	60,00	78,64	5,00
16	60,00	45,00	1,64
17	60,00	45,00	8,36

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

* Pontos centrais.

Na Figura 6.2 é apresentada a porcentagem de palha solubilizada após cada ensaio do pré-tratamento, partindo-se de 15 g de palha bruta, e também a porcentagem de palha hidrolisada após a hidrólise enzimática, partindo-se de 3g de palha pré-tratada, onde os ensaio 2, 5 e 11 são triplicata no ponto central.

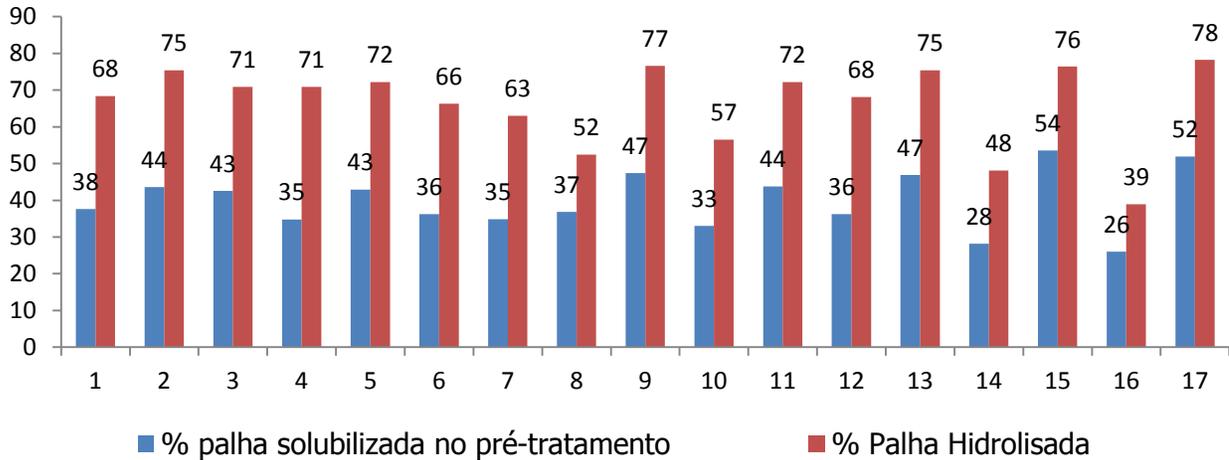


Figura 6. 2: Porcentagem de palha solubilizada no pré-tratamento partindo de 15 g de palha bruta e a porcentagem de palha hidrolisada partindo de 3 g de palha pré-tratada.

Pode se observar na Figura 6.2 que aproximadamente 50% de biomassa foi solubilizada durante a etapa do pré-tratamento e que mais de 60% foi hidrolisada. Além disso, observa-se que a maior quantidade de material solubilizado ocorreu nos ensaios 9, 15 e 17. O ensaio 15 foi o de maior temperatura, o ensaio 17 foi o de maior concentração e o ensaio 9 teve concentração e temperatura no nível +1, ou seja, tem condições de temperatura e concentração relativamente altas.

Segundo GOULD (1984), em trabalhos desenvolvidos com resíduos agroindustriais como palha de milho e trigo, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino solubilizou aproximadamente a metade da lignina e hemicelulose. Os autores encontraram que a hemicelulose e a lignina foram solubilizadas quando os resíduos foram pré-tratados nas condições de 25 °C, e com uma solução de peróxido de hidrogênio alcalino de pelo menos uma proporção 0,25 (m/m) e pH de 11,5.

6.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA PALHA PRÉ-TRATADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

Após a etapa de pré-tratamento, o material foi caracterizado, para determinar a quantidade de celulose, hemicelulose e lignina e determinar como o pré-tratamento modifica a estrutura química da palha de cana durante esta etapa. Os resultados da caracterização após a etapa do pré-tratamento são apresentados na Tabela 6.4 e na Tabela 6.5 é apresentada a caracterização química do material pré-tratado corrigido pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.

Tabela 6. 4: Caracterização química do material pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ensaio	t (min)	T (°C)	C (v/v)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	80,00	65,00	3,00	52,78	16,78	17,68
2*	60,00	45,00	5,00	57,88	19,68	15,37
3	40,00	65,00	7,00	54,74	15,83	21,12
4	80,00	25,00	7,00	51,11	20,97	17,60
5*	60,00	45,00	5,00	56,76	19,19	15,90
6	40,00	25,00	7,00	50,30	19,90	19,74
7	40,00	65,00	3,00	50,52	21,37	18,50
8	80,00	25,00	3,00	52,62	19,95	22,35
9	80,00	65,00	7,00	61,51	12,32	17,48
10	40,00	25,00	3,00	49,20	21,11	22,41
11*	60,00	45,00	5,00	57,93	18,45	14,76
12	26,36	45,00	5,00	51,91	18,91	19,18
13	93,64	45,00	5,00	60,56	22,34	9,95
14	60,00	11,36	5,00	45,25	20,82	23,48
15	60,00	78,64	5,00	67,82	16,83	11,52
16	60,00	45,00	1,64	45,07	20,33	25,78
17	60,00	45,00	8,36	66,87	14,63	7,51

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

* Pontos centrais.

Tabela 6. 5: Valores de caracterização química da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino corrigidos pelos respectivos rendimentos.

Ensaio	t (min)	T (°C)	C (v/v)	Rendimento no	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
				pré-tratamento (%)			
1	80,00	65,00	3,00	62%	33,09	10,90	11,03
2*	60,00	45,00	5,00	56%	32,79	11,44	8,67
3	40,00	65,00	7,00	57%	32,74	9,40	12,13
4	80,00	25,00	7,00	65%	33,52	14,20	11,47
5*	60,00	45,00	5,00	57%	32,51	11,31	9,08
6	40,00	25,00	7,00	64%	32,21	13,16	12,58
7	40,00	65,00	3,00	65%	33,08	14,47	12,05
8	80,00	25,00	3,00	63%	33,38	13,26	14,11
9	80,00	65,00	7,00	53%	32,51	6,81	9,20
10	40,00	25,00	3,00	67%	33,10	14,89	15,01
11*	60,00	45,00	5,00	56%	32,70	10,85	8,30
12	26,36	45,00	5,00	64%	33,27	12,75	12,24
13	93,64	45,00	5,00	53%	32,23	12,19	5,28
14	60,00	11,36	5,00	72%	32,54	15,58	16,86
15	60,00	78,64	5,00	46%	31,50	8,10	5,30
16	60,00	45,00	1,64	74%	33,42	15,51	19,08
17	60,00	45,00	8,36	48%	32,19	7,31	3,61

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

* Pontos centrais.

Analisando a Tabela 6.5 pode-se observar uma alta remoção de hemiceluloses e lignina. Na Tabela 6.6, são apresentadas a porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina durante o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 6. 6: Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina do material pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Ensaio	t (min)	T (°C)	C (v/v)	Solubilização de	Solubilização de	Solubilização de
				celulose no pré-tratamento (%)	hemicelulose no pré-tratamento (%)	lignina no pré-tratamento (%)
1	80,00	65,00	3,00	3,90	53,83	54,20
2*	60,00	45,00	5,00	4,75	51,54	64,00
3	40,00	65,00	7,00	4,90	60,17	49,66
4	80,00	25,00	7,00	2,63	39,88	52,37

5*	60,00	45,00	5,00	5,57	52,11	62,32
6	40,00	25,00	7,00	6,45	44,27	47,76
7	40,00	65,00	3,00	3,92	38,71	49,97
8	80,00	25,00	3,00	3,06	43,84	41,41
9	80,00	65,00	7,00	5,58	71,18	61,82
10	40,00	25,00	3,00	3,87	36,92	37,67
11*	60,00	45,00	5,00	5,02	54,02	65,55
12	26,36	45,00	5,00	3,37	46,00	49,20
13	93,64	45,00	5,00	6,38	48,36	78,09
14	60,00	11,36	5,00	5,49	33,99	29,99
15	60,00	78,64	5,00	8,50	65,71	78,01
16	60,00	45,00	1,64	2,94	34,30	20,78
17	60,00	45,00	8,36	6,51	69,04	85,02

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

* Pontos centrais.

Pode-se observar na Tabela 6.6 que no ensaio 17 (60 min, 45°C e 8,36 (v/v)), onde a concentração de peróxido foi a maior estudada no planejamento, houve uma maior solubilização de lignina (85,02%) com uma remoção de hemiceluloses de 69,04% e com uma solubilização de celulose de 6,51. No ensaio 16 (60min, 45°C, 1,64(v/v)), onde a concentração de peróxido foi a menor estudada no planejamento, foram observadas as menores solubilizações de celulose, hemicelulose e lignina (2,94%, 34,33% e 20,78%), respectivamente. Portanto, podemos esperar que a concentração de peróxido de hidrogênio seja uma variável significativa para aumentar a solubilização dos constituintes da biomassa.

Também pode se observar que no ensaio 15 (60min, 78,64°C, 5 (v/v)) onde a temperatura foi a maior do planejamento houve a maior solubilização de celulose (8,50%) com solubilização de hemiceluloses e lignina de 65,71% e 78,01%, respectivamente. No entanto no ensaio 14 (60min, 11,36°C, 5 (v/v)), onde a temperatura foi a menor estudada em nosso planejamento, observou-se uma solubilização de 5,49% de celulose, 33,99% de hemiceluloses e 29,99% de lignina, podendo-se observar que um aumento na temperatura vai promover grande aumento na solubilização das hemiceluloses e da lignina com aumento na solubilização de celulose. Por isso podemos esperar que a temperatura também seja uma variável significativa em nosso estudo.

No ensaio 13 (93,64 min, 45°C, 5 (v/v)), onde o tempo do pré-tratamento foi o maior estudado no planejamento, foi observada uma solubilização de 6,38% de celulose, 48,36% de

hemiceluloses e 78,09% de lignina. No ensaio 12 (26,63 min, 45°C, 5 (v/v)), onde o tempo do pré-tratamento foi o menor estudado em nosso planejamento, foram solubilizadas 3,37% de celulose, 46% de hemiceluloses e 49,20% de lignina, podendo-se notar que maiores tempos de reação promovem maior solubilização de lignina e celulose, mas não promove muito alta solubilização de hemiceluloses.

Os ensaios 2, 5, e 11, realizados no ponto central (60 min, 45°C, 5 (v/v)), tiveram solubilizações de aproximadamente 5,4% de celulose, 54% de hemiceluloses e aproximadamente 64% de lignina.

6.3.2. HIDROLISE ENZIMÁTICA DA PALHA PRÉ-TRATADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO.

Para a liberação de glicose e demais açúcares redutores efetuaram-se as hidrólises com as seguintes condições reacionais fixas: 3 g de palha seca pré-tratada e volume reacional de 100 mL de tampão citrato. Como nesta etapa o importante era a obtenção de glicose, as atividades enzimáticas foram mantidas fixas em 15 FPU/g de biomassa seca pré-tratada, para a celulase, e 25 CBU/g de biomassa seca pré-tratada, para a β -glicosidase. O pH da hidrólise foi 4,8, a temperatura de 50°C e agitação de 100 rpm.

Na Tabela 6.7 é apresentada a matriz de planejamento experimental com triplicata no ponto central, contendo as combinações dos níveis para cada um dos ensaios e sua respectiva resposta de glicose (g/g de palha bruta) e rendimento global (%) calculado pela Equação 6.1, e rendimento na conversão (%) na etapa da hidrólise enzimática.

$$\text{Rendimento Global} = \left(\frac{\text{g de glicose hidrolisada} * \text{fator}}{\text{g de glucana na palha bruta}} \right) * 100$$

$$\text{Rendimento Global} = \left(\frac{\text{g glicose}}{\text{g glucana}} * 0,90 \right) * 100$$

$$\text{glucana} = \text{glicose} * \frac{162,2}{180,2}$$

Equação 6.1

Tabela 6. 7: Rendimento de glicose, rendimento global e conversão na hidrólise enzimática.

Ensaio	t (min)	T (°C)	C (v/v)	Glicose (g/g) Palha bruta	Rendimento Global (%)	Conversão na hidrólise enzimática (%)
1	80,00	65,00	3,00	0,293	76,83	80,32
2*	60,00	45,00	5,00	0,273	71,53	75,44
3	40,00	65,00	7,00	0,335	87,79	92,80
4	80,00	25,00	7,00	0,308	80,65	83,32
5*	60,00	45,00	5,00	0,28	73,54	78,16
6	40,00	25,00	7,00	0,249	65,17	69,99
7	40,00	65,00	3,00	0,254	66,69	69,77
8	80,00	25,00	3,00	0,166	43,45	45,03
9	80,00	65,00	7,00	0,288	75,54	80,38
10	40,00	25,00	3,00	0,236	61,90	64,65
11*	60,00	45,00	5,00	0,294	77,12	81,55
12	26,36	45,00	5,00	0,246	64,62	67,17
13	93,64	45,00	5,00	0,28	73,39	78,52
14	60,00	11,36	5,00	0,203	53,28	56,47
15	60,00	78,64	5,00	0,239	62,55	68,44
16	60,00	45,00	1,64	0,138	36,29	37,46
17	60,00	45,00	8,36	0,263	68,99	73,90

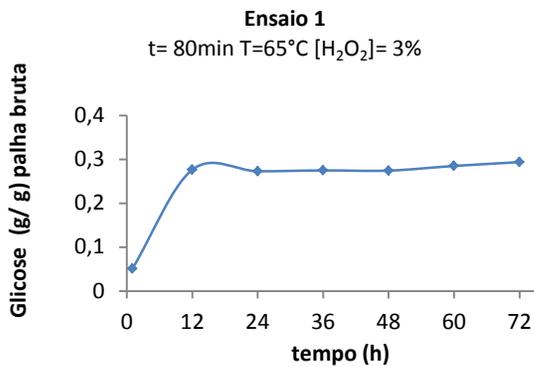
Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

* Pontos centrais.

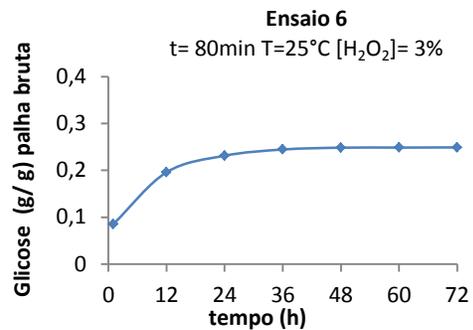
Na Tabela 6.7, observa-se que a maior liberação de glicose ocorreu no ensaio 3 (40min, 60°C, e 7 (v/v)), onde os fatores estudados estão no nível +1 para a temperatura e concentração de peróxido, e no nível -1 para o tempo, com um teor de glicose de 0,335 (g/g palha bruta). O rendimento total foi de 87,79% e a conversão da hidrólise foi de 92,80%.

O menor rendimento de glicose foi observado no ensaio 16 (60min, 45°C, 1,64 (v/v)) onde os fatores estudados estão no nível -1,68, para a concentração de peróxido, e no ponto central para tempo e temperatura, sendo obtido um teor de glicose de 0,138 (g/g palha bruta). O rendimento global foi de 36,29% e a conversão de hidrólise foi de 37,46%.

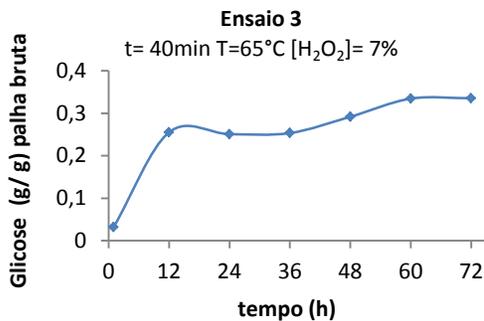
Os gráficos apresentados na Figura 6.3 (a – o) representam os perfis da conversão de glicose na hidrólise da palha de cana-de-açúcar pré-tratada ao longo das 72 horas de hidrólise enzimática.



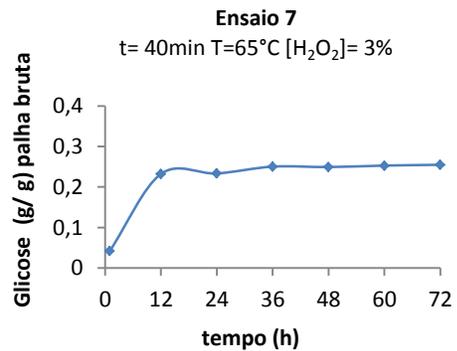
(a)



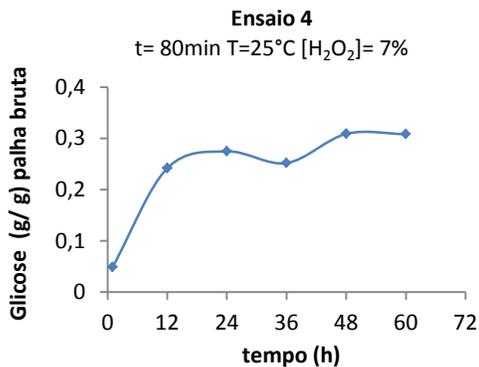
(d)



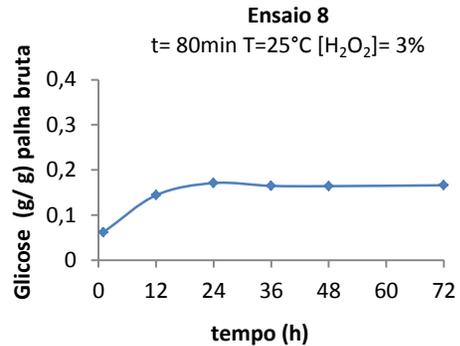
(b)



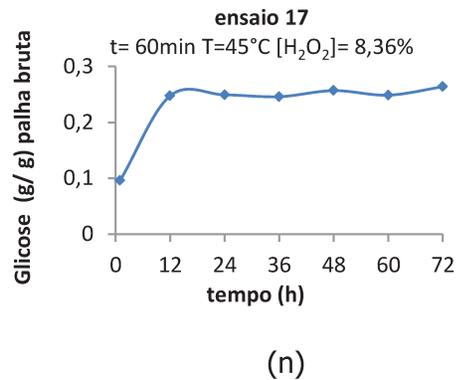
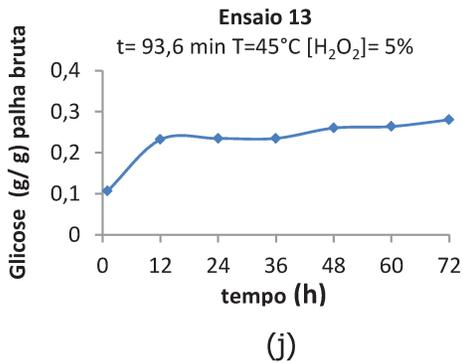
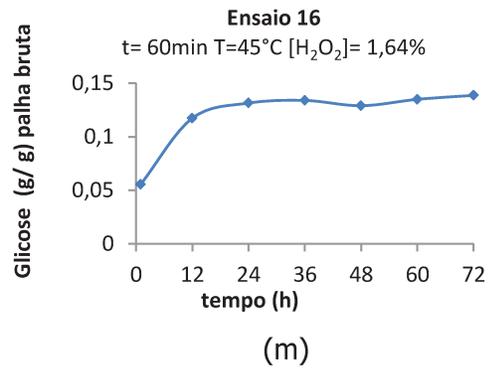
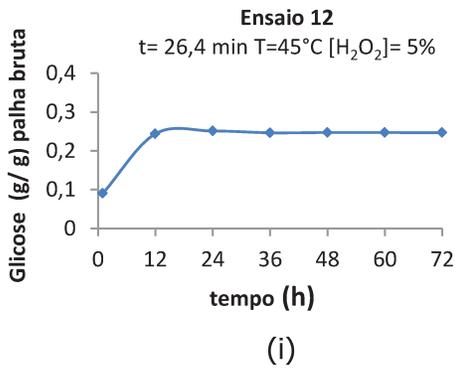
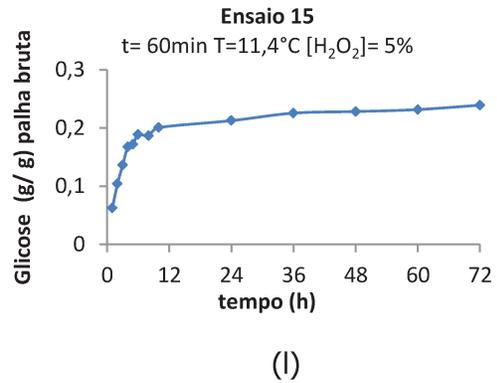
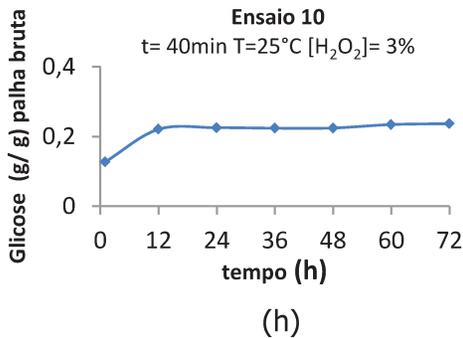
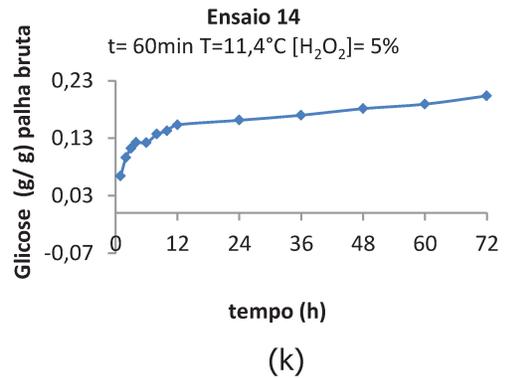
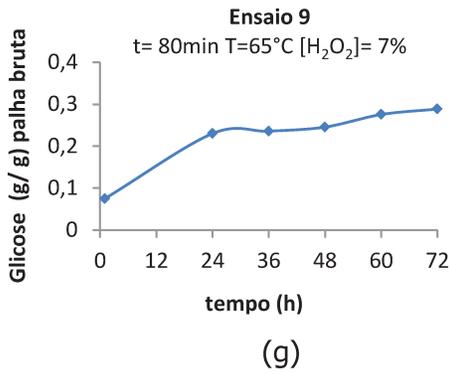
(e)

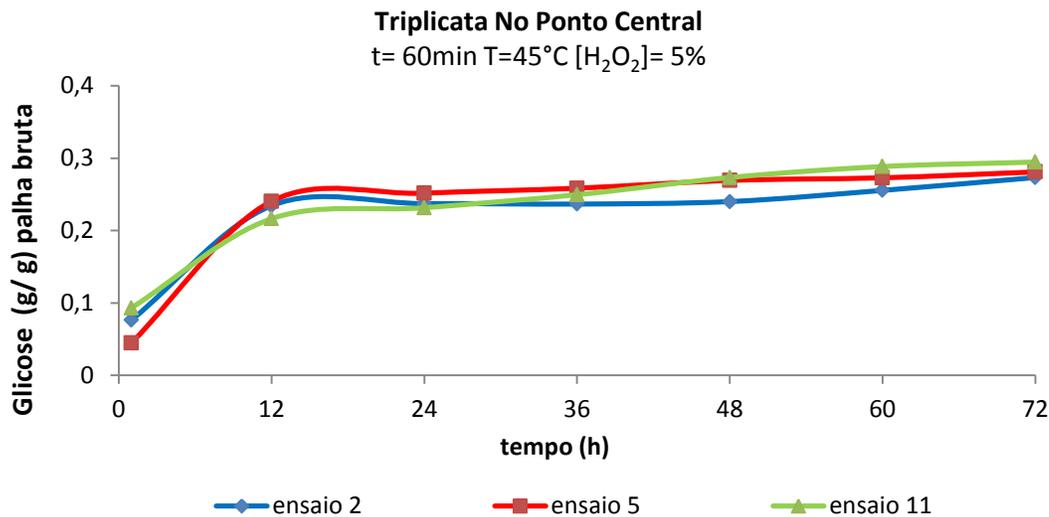


(c)



(f)





(o)

Figura 6. 3: (a – o). Perfis de hidrólise do planejamento estatístico para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Pode ser observada na Figura 6.3 (a – o), que a conversão de glicose em cada um dos testes realizados que após 48 horas de hidrólise, a liberação de glicose tornou-se praticamente constante.

6.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE PRODUÇÃO DE GLICOSE (g/g) DE PALHA BRUTA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

A Tabela 6.8 apresenta a análise estatística, mostrando os efeitos principais e de interação das variáveis considerando o erro puro através do software STATISTICA 7.0. O nível de confiança para essas análises foi de 95,0%.

Observa-se analisando a Tabela 6.8 que o efeito linear e quadrático do tempo e os efeitos das interações não apresentaram influência estatisticamente significativa a 95% de confiança, dentro da faixa estudada. Os efeitos lineares e quadráticos da concentração de peróxido e o efeito linear da temperatura apresentaram efeito significativo na concentração de glicose a 95% de confiança, visto que apresentaram valores de $p < 0,05$ na faixa estudada. Na

Figura 6.4 é apresentado o gráfico de Pareto, onde pode-se observar que o maior efeito é o linear da concentração de peróxido, seguido do linear de temperatura e quadrático da concentração de peróxido.

Tabela 6. 8: Coeficientes de regressão para a concentração de glicose liberada após hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coeficiente
Media.	2,79E-01	6,16E-03	4,53E+01	4,85E-04	2,79E-01
Tempo (L)	5,59E-03	5,78E-03	9,66E-01	4,35E-01	2,79E-03
Tempo (Q)	4,64E-03	6,36E-03	7,28E-01	5,41E-01	2,32E-03
Temperatura (L)	3,97E-02	5,78E-03	6,87E+00	2,05E-02	1,98E-02
Temperatura (Q)	-2,50E-02	6,36E-03	-3,93E+00	5,89E-02	-1,25E-02
[H₂O₂](L)	6,46E-02	5,78E-03	1,11E+01	7,92E-03	3,23E-02
[H₂O₂](Q)	-3,95E-02	6,36E-03	-6,21E+00	2,49E-02	-1,97E-02
1L * 2L	7,50E-04	7,56E-03	9,92E-02	9,30E-01	3,75E-04
1L * 3L	1,07E-02	7,56E-03	1,42E+00	2,91E-01	5,37E-03
2L * 3L	-1,97E-02	7,56E-03	-2,61E+00	1,20E-01	-9,87E-03

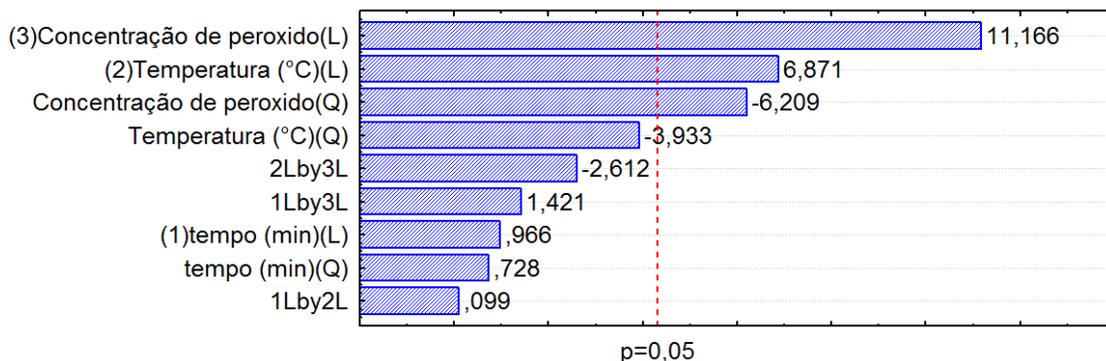


Figura 6. 4: Gráfico de Pareto.

Nota-se na Figura 6.4 que as variáveis com maior efeito foram a temperatura e a concentração de peróxido. Os testes realizados na temperatura no nível +1 (65°C) e com a concentração no nível +1 (7%) apresentaram as maiores solubilizações de hemiceluloses e lignina, pelo qual a hidrólise enzimática poderia ver-se favorecida para a conversão de glicose.

O efeito quadrático da temperatura, a princípio, não tem significância estatística na faixa estudada considerando 95% de confiança. No entanto, pode-se observar que o valor de $p =$

0,058 está próximo ao limite e ao se observar o gráfico normal de probabilidades (Figura 6.5), nota-se que ele não se encontra na reta que passa em torno da origem, o que indica que o efeito quadrático da temperatura pode ser significativo.

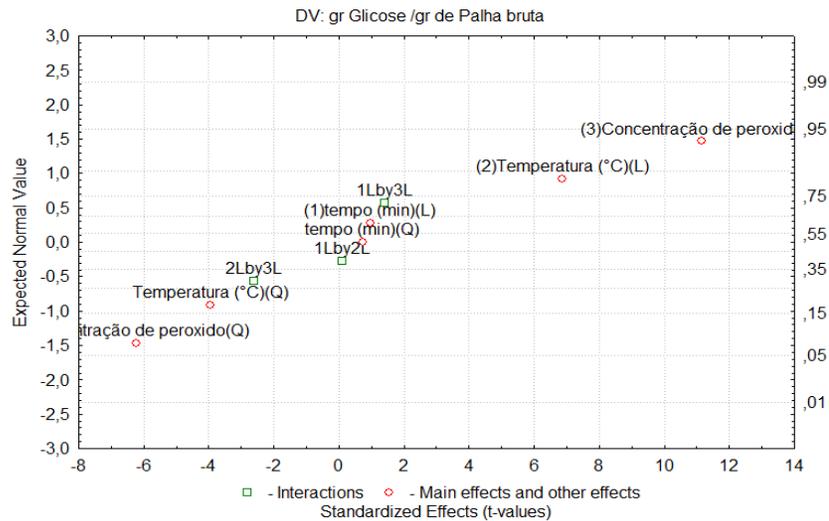


Figura 6. 5: Gráfico normal dos efeitos na produção de glicose.

Devido à dúvida quanto à significância ou não do efeito quadrático da temperatura, foram calculados os valores ótimos usando o modelo sem e com a temperatura quadrática, como mostrado nas equações 6.2 e 6.3, respectivamente.

$$\text{Glicose} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \text{ palha seca} \right) = 0.280 + 0.0199 X_2 + 0.032X_3 - 0.0198X_3^2$$

Equação 6. 1

$$\text{Glicose} (\text{g/g palha seca}) = 0.280 + 0.0199X_2 - 0.0125X_2^2 + 0.032X_3^3 - 0.0198X_3^2$$

Equação 6. 2

Onde x_2 e x_3 são os valores codificados da temperatura e concentração de peróxido, respectivamente.

As Tabelas 6.9 e 6.10 apresentam as Tabelas ANOVA para os modelos das equações 6.2 e 6.3, respectivamente. Pode-se notar que os dois modelos são estatisticamente significativos a 95% de confiança, já que o valor F da regressão é maior que o F Tabelado e que o valor F da falta de ajuste é menor que o Tabelado.

Tabela 6. 9: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com peróxido de hidrogênio. Onde a temperatura quadrática não foi considerada uma variável significativa.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão (R)	2,362E-02	3	7,87E-03	¹ 6,27
Resíduos (r)	1,632E-02	13	1,26E-03	
Falta de ajuste (faj)	1,61E-02	11	1,46E-03	² 12,80
Erro puro (ep)	2,29E-04	2	1,14E-04	
Total(T)	3,99E-02	16		
¹ F3,13	6.27	>	3.41 Tabelado	
² F11,2	12.80	<	19.40 Tabelado	

Tabela 6. 10: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 , para análise da concentração de glicose da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com peróxido de hidrogênio. Onde a temperatura quadrática foi considerada uma variável significativa.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Media quadrática	F calculado
Regressão (R)	2,578E-02	4	6,444E-03	¹ 5,46
Resíduos (r)	1,417E-02	12	1,181E-03	
Falta de ajuste (faj)	1,394E-02	10	1,394E-03	² 12,19
Erro puro (ep)	2,287E-04	2	1,143E-04	
Total(T)	3,994E-02	16		
¹ F 4,12	5,46	>>>>>	3,26 Tabelado	
² F 10,2	12,19	<<<<<<	19,40 Tabelado	

¹ F da regressão calculado

² F da falta de ajuste calculado

Os pontos ótimos calculados com os dois modelos podem ser observados na Tabela 6.11. Os testes foram realizados em triplicata para determinar se a temperatura quadrática é uma variável significativa no processo e determinar a concentração de glicose ótima experimental obtida para as duas condições. Nota-se que considerando a temperatura quadrática como não significativa, o pré-tratamento foi realizado em condições mais severas, com maior temperatura e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino ligeiramente maior, fatores que segundo a caracterização do pré-tratamento promovem a solubilização de hemiceluloses e lignina.

Tabela 6. 11: Condições ótimas dos testes considerando a temperatura quadrática como variável significativa e não significativa.

Ensaio	Temperatura °C	Tempo min	[H ₂ O ₂] (v/v)
1N	78,6	60	6,8
2S	60	60	6,6

1 N: Temperatura quadrática considerada não significativa.

2 S: Temperatura quadrática considerada significativa.

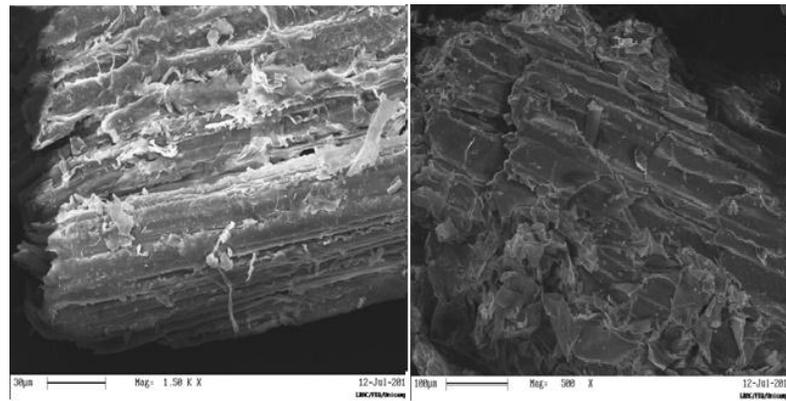
A palha bruta foi submetida a cada um dos pré-tratamentos nas condições da Tabela 6.11. Após o pré-tratamento, o material foi hidrolisado com uma carga enzimática previamente estabelecida. Além da hidrólise, o material pré-tratado foi submetido às análises de MEV, FTIR e difração de raios X. O material pré-tratado foi caracterizado para determinar a eficiência no pré-tratamento.

6.3.4. ANÁLISES MORFOLÓGICAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

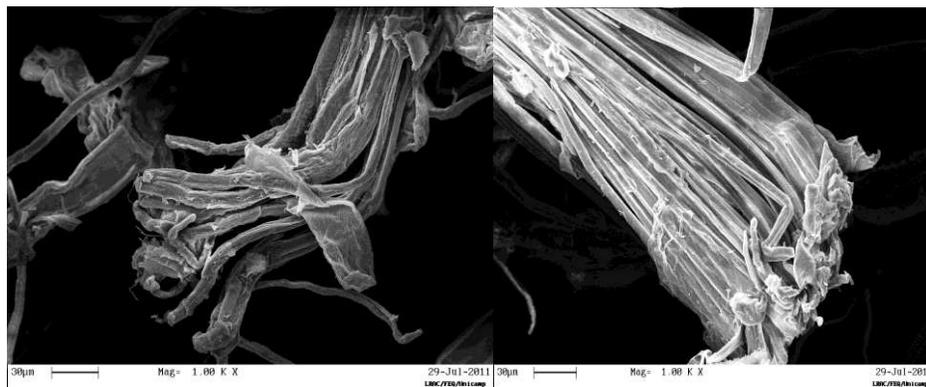
Os pré-tratamentos aplicados na palha bruta provocam a remoção de hemiceluloses e lignina, favorecendo o acesso à celulose, através do ataque das enzimas celulolíticas na etapa de hidrólise enzimática. As micrografias da palha bruta e pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino são apresentadas na Figura 6.6. A partir de uma análise comparativa das

imagens, observou-se uma mudança significativa da estrutura morfológica da palha de cana-de-açúcar quando submetida aos processos de pré-tratamento.

Quando a palha é submetida ao processo de pré-tratamento, grande parte das células vegetais, que corresponde às células de parênquima (células de formato achatado e floculoso formando uma camada sobre as fibras celulósicas), é removida, além de elementos de vasos (células alongadas com diversas perfurações) (RAVEN *et al.*, 2001). Estas modificações demonstram que a etapa de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio pode proporcionar melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subsequentes (conversão enzimática).



(a)



(b)

(c)

Figura 6. 6: Fotomicrofibrinas da palha de cana-de-açúcar bruta e pré-tratada com peróxido de hidrogênio: (a) Palha bruta; (b) Palha pré-tratada condições 1N; (c) Palha pré-tratada nas condições 2S.

6.3.5. ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Figura 6.7 apresenta os espectros da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e da palha bruta. Podem-se notar na Tabela 6.12 as principais bandas vibracionais típicas de compostos celulósicos.

Tabela 6. 12: Banda das vibrações dos compostos celulósicos (WANG, 2010).

cm^{-1}	Descrição
898	C–O–C vibrações das ligações β -glicosídicas em hemicelulose e celulose.
1094	C–O, C–C alongamento ou flexão C – OH em hemicelulose
1127	E celulose.
1172	C–O–C alongamento β - glicosídico em celulose
1200	hemicelulose
1253	Aromáticos C–O alongamento de lignina
1325	C–C e C–O vibrações
1374	C–H vibrações alifáticas
1429	C = C do anel aromático
1465	C–H vibrações aromáticas
1514	C= C vibração aromática do anel da lignina
1605	Vibrações aromáticas dentro do esqueleto
1630	Banda da água residual
1734	C= O alongamento da cetona do grupo carboxila.
2850	C–H alongamento de metileno, metilo ou metano.
3436	O–H Alongamento

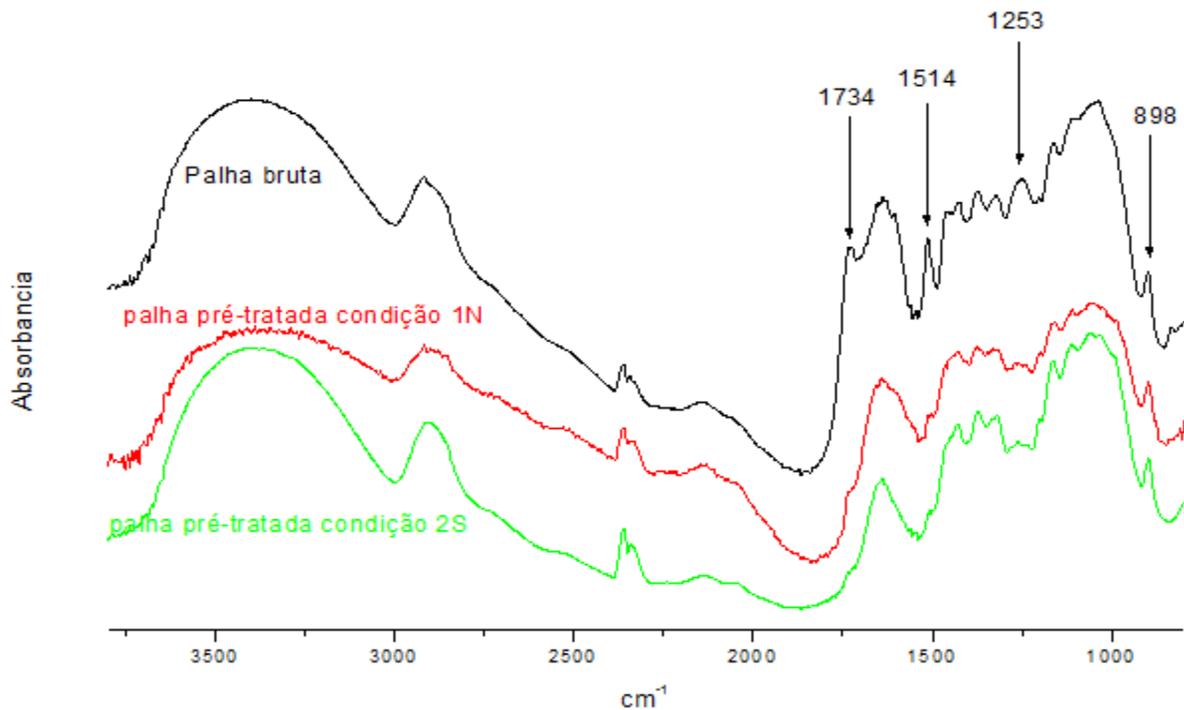


Figura 6. 7: Espectro de FTIR para a palha de cana bruta (-----), palha pré-tratada nas condições 1N (-----) palha pré-tratada nas condições 2S (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para ficarem mais visíveis, por isso o eixo de absorvâncias foi retirado.

Analisando a Figura 6.7 pode-se observar que, após o pré-tratamento, a intensidade dos picos da lignina (1253 e 1514 cm^{-1}) foram reduzidas, provavelmente devido a uma remoção parcial da lignina. Foi observado o desaparecimento do pico de 1734 cm^{-1} , que representa o fracionamento das ligações complexas entre a hemicelulose e a lignina. Após o pré-tratamento, os picos dos polissacarídeos (898, 1094, 1127, 1200, 1325 e 1374 cm^{-1}) tornaram-se mais nítidos devido à remoção da lignina no material (WANG, 2010), sendo notáveis essas mudanças nas duas condições ótimas do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

6.3.6. ANÁLISES DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE

Na figura 6.8 é apresentada a análise de índice de cristalinidade. As análises de difração de raios X foram feitas para determinar o índice de cristalinidade, já que propriedades físicas e a

microestrutura de celulose estão entre os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática.

O índice de cristalinidade mede a quantidade relativa da celulose cristalina no sólido total. À medida que a proporção da fração amorfa presente na biomassa é solubilizada, observa-se um aumento do índice de cristalinidade da biomassa. Assim, para efetuar uma correção destes índices calculados, foi levado em consideração o rendimento da etapa de pré-tratamento, obtendo assim o novo índice de cristalinidade corrigido.

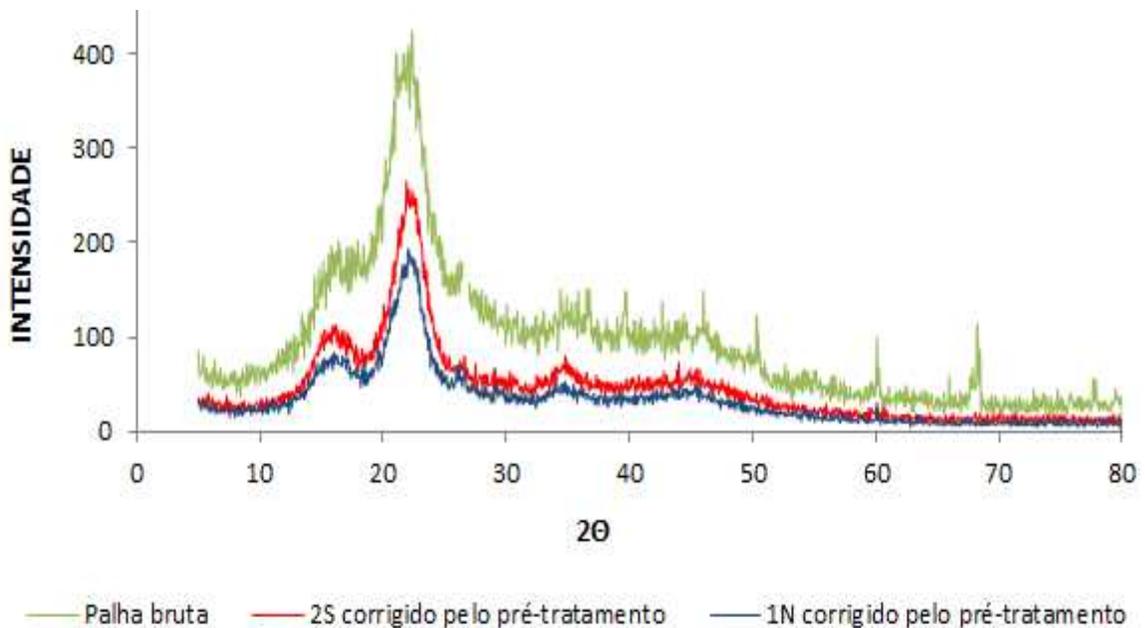


Figura 6. 8: Difratograma da palha de cana bruta e da palha de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio nas condições 1N e 2S.

A Tabela 6.13 apresenta os valores do índice de cristalinidade antes e após a correção pelo rendimento da etapa de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 6. 13: Índices de cristalinidade (CrI) para o a palha bruta e a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino nas condições 1N e 2S.

Palha de cana de açúcar	Índice de cristalinidade (%)	Rendimento no pré-tratamento (%)	Corrigido pelo pré-tratamento (%)
Bruta	49,01	-	-
Pré-tratada 1N	67,84	40	27,14
Pré-tratada 2S	69,14	46	31,80

A análise de DRX (Difração de raios X) (Figura 6.8) demonstra a redução do índice de cristalinidade no caso da palha pré-tratada nas duas condições estudadas passando de 49,01% da palha bruta para 27,14% da palha pré-tratada (corrigido pelo rendimento da etapa do pré-tratamento na condição 1N), e 31,80% para a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio (corrigido pelo rendimento da etapa do pré-tratamento na condição 2S).

6.3.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NAS CONDIÇÕES 1N E 2S

Na Tabela 6.14 pode-se observar o rendimento na etapa do pré-tratamento em cada uma das duas condições ótimas encontradas anteriormente. A Tabela 6.15 apresenta a composição química do material pré-tratado.

Tabela 6. 14: Rendimento no pré-tratamento nas duas condições ótimas encontradas.

Ensaio	Temperatura °C	tempo min	Concentração de peróxido de hidrogênio alcalino (v/v)	Rendimento no pré-tratamento
1N	78,6	60	6,8	40%
2S	60	60	6,6	46%

Tabela 6. 15: Composição química do material pré-tratado nas duas condições ótimas encontradas.

Composição da Biomassa	Palha de Cana "Bruta" (%)	Palha Pré-Tratada 1N (%)	Palha Pré-Tratada 2S (%)
Celulose	34,43± 0,44	80,95±0,35	72,35±0,34
Hemicelulose	23,61± 0,18	14,79 ±0,33	8,67±0,02
Lignina	24,09 ± 0,13	7,28 ± 0,12	16,95 ±0,41
Cinzas	9,61± 0,04	-----	-----
Extrativos	7,67± 0,50	-----	-----

A Tabela 6.16 apresenta os valores de solubilização da celulose, hemiceluloses e lignina após o pré-tratamento corrigida pelo rendimento da etapa do pré-tratamento. Na Tabela 6.17 são apresentadas a solubilização de celulose, hemicelulose e lignina ocasionadas pela etapa do pré-tratamento.

Tabela 6. 16: Caracterização do material pré-tratado corrigido pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.

Composição da Biomassa	Palha de Cana "Bruta" (100g)	1N Corrigida (40g)	2S Corrigida (46g)
Celulose	34,43	32,38±0,14	33,28±0,15
Hemicelulose	23,61	5,92±0,13	3,99±0,10
Lignina	24,09 ± 0,13	3,35± 0,05	6,78 ± 0,16
Cinzas	9,61	-----	-----
Extrativos	7,67	-----	-----

Tabela 6. 17: Solubilização dos componentes da palha de cana-de-açúcar após a etapa de pré-tratamento.

Componentes Da Biomassa	Solubilização no pré-tratamento (%) 1N	Solubilização no pré-tratamento (%) 2S
Celulose	5,95	3,33
Hemicelulose	74,94	83,11
Lignina	86,10	71,85

Pode-se observar na Tabela 6.17 que nas duas condições encontradas de pré-tratamento houve grande solubilização de hemiceluloses e lignina, e baixa solubilização de celulose, o que é uma característica desejável. Verificou-se que no pré-tratamento realizado em maior temperatura e concentração ligeiramente mais elevada de peróxido (condição 1N) houve maior solubilização de celulose e lignina, mas menor solubilização de hemiceluloses.

Na Tabela 6.18 são apresentadas as solubilizações de celulose, hemiceluloses e lignina da palha submetida a vários tipos de pré-tratamentos. Pode-se observar que as solubilizações de celulose estão na faixa de 20 a 37%, muito superiores às solubilizações causadas pelo pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 6. 18: Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina na palha de cana-de-açúcar submetida a diferentes pré-tratamentos.

Pesquisa	Condições	Solubilização de celulose %	Solubilização de hemiceluloses %	Solubilização de Lignina %
SILVA (2009)	H ₂ SO ₄ 1,0% (m/v), 120°C/10 min, Relação sólido: líquido 1:10 Deslignificação NaOH 1,0% (m/v), 100°C/1h	30,2	88,8	77,9
OLIVEIRA (2010)	Explosão a vapor 180 °C, 15 min, seguida de Deslignificação NaOH	37,4	88,6	86,6
OLIVEIRA (2010)	H ₂ SO ₄ 1,0% (m/v), 180°C/10 min, seguida de Deslignificação NaOH	32,0	89,6	55,3
MORIYA (2007)	Polpação acetosolv relação palha/solvente 1/20 (m/v), 0,4% de HCl como catalisador por 3 horas	20,17	77,09	69,91

Também pode se observar na Tabela 6.18 que a solubilização de hemicelulose e da lignina está em faixas não muito distantes das obtidas no presente trabalho, demonstrando o bom desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

A palha pré-tratada nas duas condições foi submetida à hidrólise com uma carga enzimática igual a do planejamento para obter a concentração de glicose e o rendimento global, também foi feito o cálculo da conversão na hidrólise. Nas figuras 6.9 e 6.10 podem ser observados os perfis nas hidrólises (feitas em triplicata).

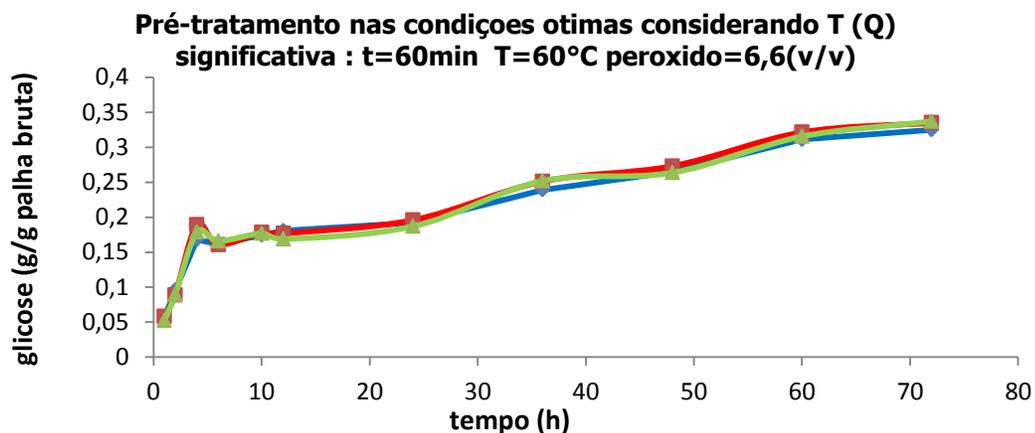


Figura 6. 9: Cinética da hidrólise enzimática considerando a T(Q) como uma variável significativa.

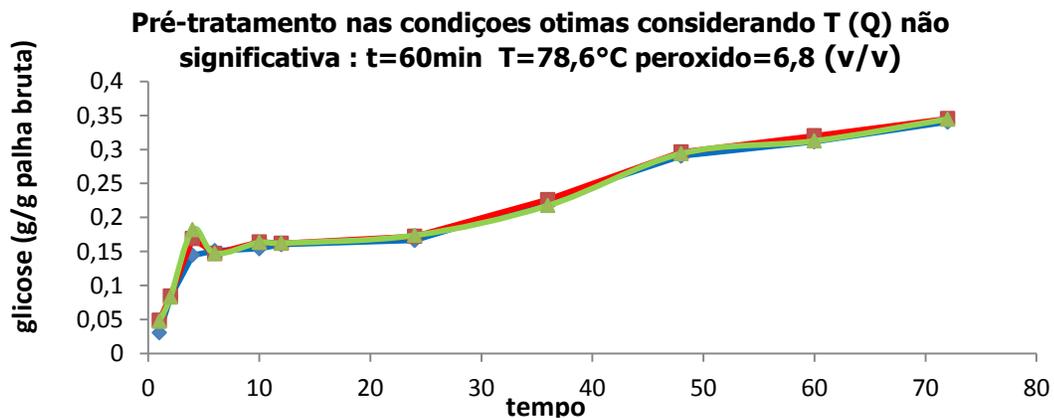


Figura 6. 10: Cinética da hidrólise enzimática considerando a T(Q) como uma variável não significativa.

Na Tabela 6.19 estão consolidados os resultados obtidos experimentalmente para rendimentos globais e o rendimento na conversão na etapa da hidrólise enzimática.

Tabela 6. 19: Conversão na hidrólise enzimática e rendimento global de glicose.

Ensaio	Temperatura °C	Tempo min	[H₂O₂] (v/v)	Glicose g/g palha bruta	Conversão (%)	Rendimento global (%)
1N	78,6	60	6,8	0,34	95,27	89,89
2S	60	60	6,6	0,33	90,35	86,97

As concentrações de glicose obtidas pelas equações 6.2 e 6.3 do modelo foram de 0.30 g/g de palha bruta quando a temperatura não foi considerada significativa (condição 1N) e de 0.32 g/g de palha quando a temperatura quadrática foi considerada significativa (condição 2S). Comparando estes valores com os obtidos experimentalmente, dados na Tabela 6.19, notam-se erros de 9,% para o teste 1N e 5,9% para o teste 2S para os dois modelos, mostrando que o segundo modelo, considerando a temperatura quadrática como significativa, apresenta mais precisão.

De acordo com os resultados obtidos, a temperatura quadrática foi mantida como variável significativa no planejamento, trabalhando assim com as condições 2S, visto que além de obterem bons rendimentos na produção de glicose também utilizaram condições operacionais mais brandas.

Neste trabalho foi considerada uma alta carga de sólidos (15%) fator importante para diminuir o gasto de reagente. Neste estudo foram usados 0,44 mL de peróxido/g palha ou 0.65 g peróxido/g palha, e foi possível otimizar o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino encontrando o ponto ótimo nas condições 60 (°C), 60 (min), 6,6 (v/v)

6.3.8. ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE GLICOSE DO PLANEJAMENTO 2³+ CONFIGURAÇÃO ESTRELA COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL

A Figura 6.11 (a-b) mostra a superfície de resposta e a curva de nível para concentração de glicose liberada após hidrólise da palha em função da concentração de peróxido de hidrogênio e da temperatura, mantendo o tempo do pré-tratamento em 60 minutos.

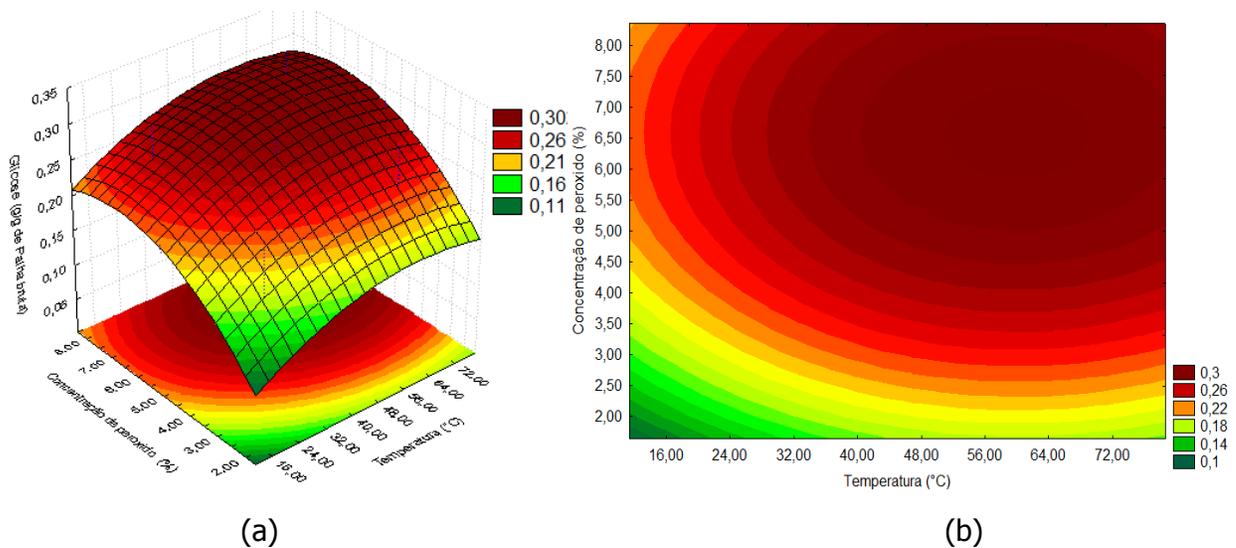


Figura 6. 11: Superfície de resposta para a produção de glicose em função da concentração de peróxido de hidrogênio e da temperatura mantendo o tempo em 60 min.

Pode se observar na Figura 6.11 (a – b), uma região em torno do ponto ótimo (60 min; 60°C; 6,6 (v/v)) onde as concentrações de glicose foram elevadas e também pode se observar que nessa região o sistema é mais sensível à concentração de peróxido de hidrogênio quando comparado com a temperatura.

No trabalho de Garcia (2009), utilizando o bagaço de colheita mecanizada sem queima, as condições de pré-tratamento usadas foram 60 minutos de reação, temperatura de 25°C e concentração de peróxido de hidrogênio de 11%, considerando 8% de sólidos no pré-tratamento. Esta concentração de peróxido corresponde a 1.375 mL de peróxido/g bagaço ou 2.03 g peróxido/g bagaço. Foram necessários 15 FPU/g bagaço de celulase e 25 CBU/g de β -glicosidase para obter uma conversão de 99% na hidrólise, realizada com 3% de sólidos.

6.3.9. ESTUDO DA CARGA ENZIMÁTICA NO PONTO ÓTIMO ENCONTRADO NO PLANEJAMENTO 2³+ CONFIGURAÇÃO ESTRELA.

A influência da carga enzimática foi avaliada nas condições ótimas encontradas no planejamento anterior (60min, 60°C e 6,6 (v/v)). Para isto, foram feitos testes na condição ótima alterando a carga enzimática de FPU na faixa de 5, 10 e 20 FPU/g de palha pré-tratada, mantendo fixa a carga de CBU em 25 CBU/g de palha pré-tratada. Os testes foram feitos em duplicata.

Na Tabela 6.20 são apresentadas as condições de cada um dos ensaios com suas respectivas respostas em glicose (g/g de palha bruta), conversão na etapa da hidrólise e rendimento global do processo.

Tabela 6. 20: Rendimentos de glicose, conversão e rendimento global.

Ensaio	T °C	t min	C (v/v)	FPU /g	Glicose (g/g) palha bruta	Conversão (%)	Rendimento Global (%)
1	60,00	60,00	6,60	5,00	0,30 ± 0,001 ^a	80,48 ± 0,31	78,15± 0,30
2	60,00	60,00	6,60	10,00	0,32 ± 0,01 ^b	86,02 ± 0,24	83,53± 0,23
3	60,00	60,00	6,60	15,00	0,33 ± 0,006 ^c	90,35 ± 1,67	86,97 ± 0,47
4	60,00	60,00	6,60	20,00	0,34± 0,002 ^d	91,32 ± 0,35	88,67± 0,34

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

a,b,c,d; são estatisticamente diferentes a 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Pode-se observar que o aumento da carga enzimática na hidrólise contribuiu para o rendimento e conversão de glicose. Entretanto, o aumento de 5FPU/g para 20 de FPU/g resultou em aumento de apenas 13% em rendimento e conversão. Quando se aumenta a carga enzimática tem-se um aumento nos custos do processo sendo importante avaliar a relação custo-benefício para futuros estudos, trabalhando com menores cargas enzimáticas.

Na Figura 6.12 são apresentados os perfis da hidrólise enzimática em cada um dos ensaios realizados no ponto ótimo (60°C, 60min, 6,6 (v/v)), aumentado a carga de celulase na etapa de hidrólise enzimática.

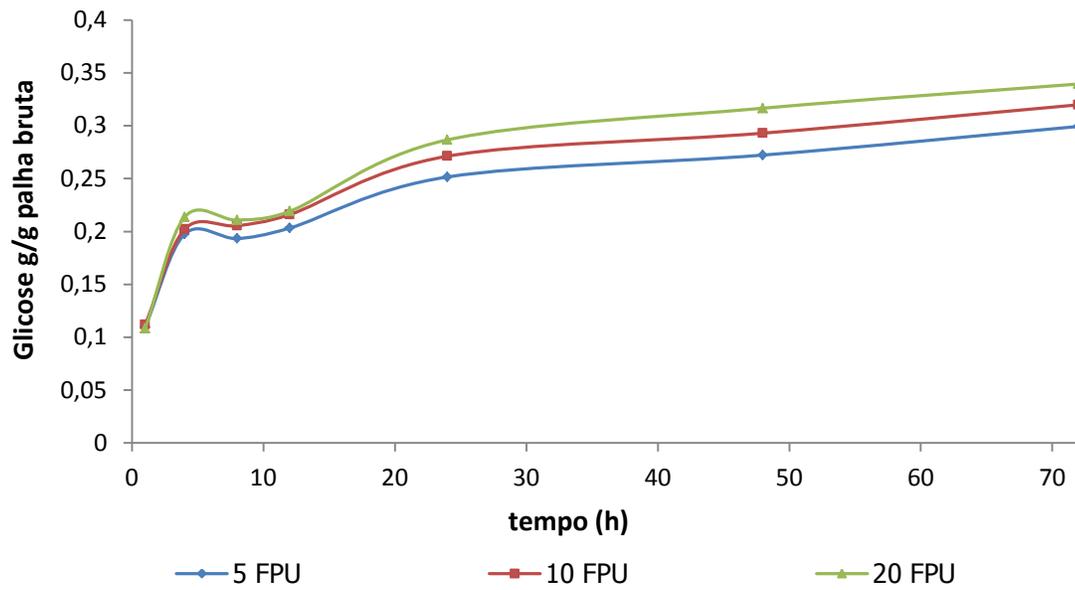


Figura 6. 12: Cinética da hidrólise enzimática variando a quantidade de enzima celulase.

*RESULTADOS E DISCUSSÕES
DO PRÉ-TRATAMENTO COM HÍDRÓXIDO DE CÁLCIO*

7.1. PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 + CONFIGURAÇÃO ESTRELA COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL

O planejamento experimental foi realizado para avaliar a influência de três variáveis independentes no pré-tratamento com hidróxido de cálcio da palha: tempo de reação (h), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de hidróxido de cálcio (g/g). A matriz de planejamento é mostrada na Tabela 7.1, são apresentadas as condições experimentais em cada um dos ensaios onde os ensaios 15.1, 15.2 e 15.3 são triplicatas no ponto central.

Tabela 7. 1: Matriz do planejamento.

Ensaio	C (g/g)	t (h)	T ($^{\circ}\text{C}$)
1	0,25	65,00	86,00
2	0,55	65,00	86,00
3	0,25	65,00	94,00
4	0,55	65,00	94,00
5	0,25	100,00	86,00
6	0,55	100,00	86,00
7	0,25	100,00	94,00
8	0,55	100,00	94,00
9	0,40	53,07	90,00
10	0,40	111,93	90,00
11	0,40	82,50	83,27
12	0,40	82,50	96,73
13	0,15	82,50	90,00
14	0,65	82,50	90,00
15.1*	0,40	82,50	90,00
15.2*	0,40	82,50	90,00
15.3*	0,40	82,50	90,00

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

*Ensaio no ponto central.

Na Figura 7.1 e apresentada a aparência do material pré-tratado com hidróxido de cálcio. Pode se observar que a palha apresenta um escurecimento em comparação com a palha bruta,

SANTOS no ano 2012 considero que este escurecimento pode estar associado à formação de produtos de degradação de carboidratos.



Figura 7. 1: Palha pré-tratada com hidróxido de cálcio

Na Figura 7.2 é apresentada a porcentagem de palha solubilizada após cada ensaio do pré-tratamento, partindo-se de 12 g de palha bruta, e a porcentagem de palha hidrolisada partindo de 3 g de palha pré-tratada.

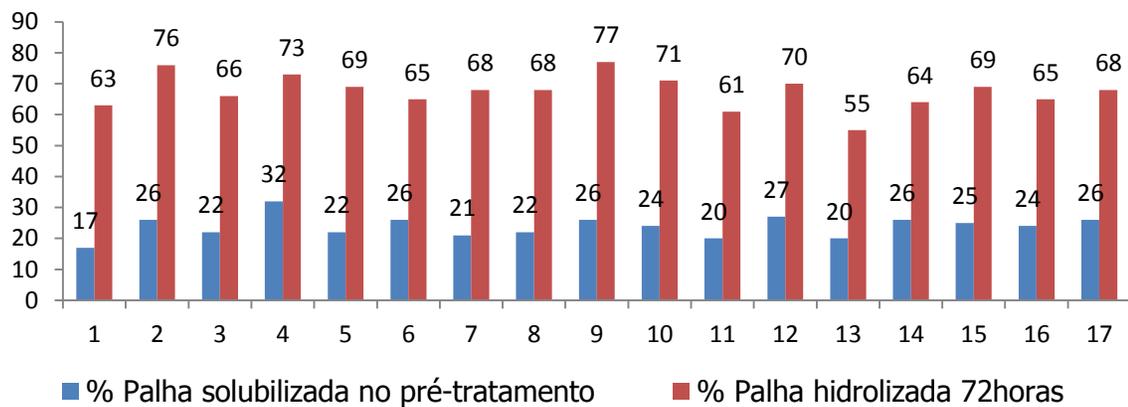


Figura 7. 2: Porcentagem de palha solubilizada e hidrolisada.

Pode-se observar na Figura 7.2 que a maior quantidade de palha solubilizada durante a etapa do pré-tratamento foi no ensaio 4, após 65 h de pré-tratamento, 94°C e empregando 0,55 g cal/g biomassa. A maior quantidade de palha hidrolisada foi observada no ensaio 9, após 53,07 h de pré-tratamento, 90°C e concentração de cal de 0,4 g/g biomassa bruta. Nota-se

também que não há muita variação na quantidade de palha solubilizada no pré-tratamento ou hidrolisada nas condições de planejamento.

7.1.1. QUANTIDADE DE CAL CONSUMIDA NO PRÉ-TRATAMENTO

A figura 7.3 apresenta o consumo de cal em cada um dos ensaios. O consumo de cal mostra uma forte dependência do tempo de pré-tratamento e temperatura. Em geral, maior quantidade de cal foi consumida em temperaturas mais elevadas e tempo de pré-tratamento mais longos. O consumo mais elevado de cal observado na Figura 7.3 foi de 36,46%, para o ensaio 7, onde as condições foram (100h, 94°C, 0,25g cal/g).

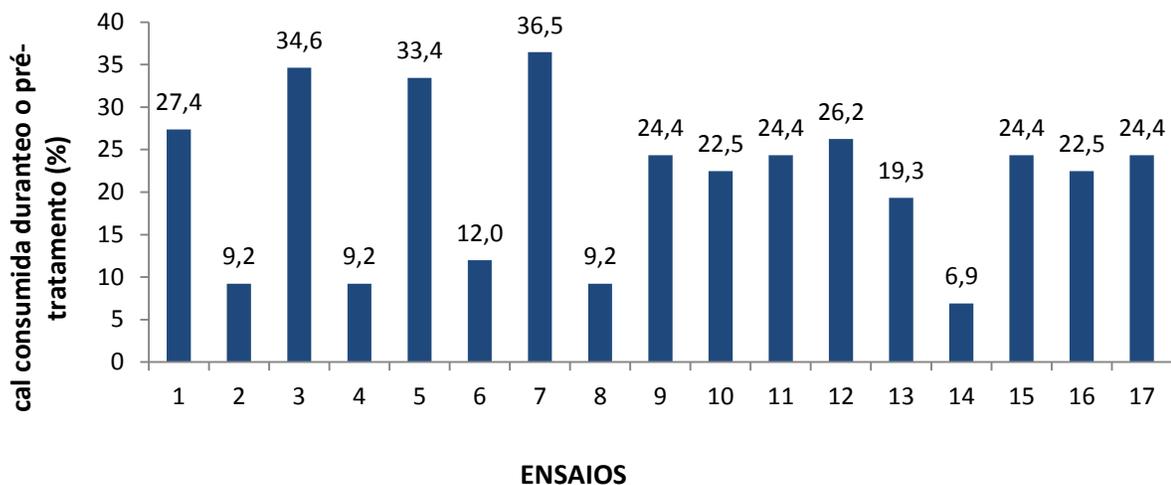


Figura 7. 3: Cal consumida no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

A estruturada lignina é modificada pela presença de um álcali, tornando-a mais solúvel. Esta modificação ocorre porque a lignina é degradada em unidades menores pela quebra das ligações das cadeias e, em seguida, os grupos hidrofílicos OH^- são introduzidos no polímero e fragmentos quebrados (LOPEZ, 2000).

RAMIREZ (2005) concluiu também que consumo de cal apresentou uma forte dependência, e diretamente proporcional ao tempo de pré-tratamento e à temperatura. A relação entre o consumo de cal e a deslignificação não foi claramente observada.

7.1.2. CARACTERIZAÇÃO DA PALHA PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Após o pré-tratamento com hidróxido de cálcio o material foi caracterizado, visando obter a quantidade de celulose, hemiceluloses e lignina e determinar a porcentagem de solubilização durante o pré-tratamento. A tabela 7.2 apresenta a caracterização química da palha de cana de açúcar pré-tratada com hidróxido de cálcio e a Tabela 7.3 apresenta a composição de celulose, hemicelulose e lignina corrigida pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.

Tabela 7. 2: Composição química da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com hidróxido de cálcio.

Ensaio	C (g/g)	t (h)	T (°C)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	0,25	65,00	86,00	41,11	28,03	15,33
2	0,55	65,00	86,00	45,50	29,28	14,54
3	0,25	65,00	94,00	43,17	28,86	16,15
4	0,55	65,00	94,00	49,10	27,42	16,45
5	0,25	100,00	86,00	43,84	28,40	16,30
6	0,55	100,00	86,00	44,08	29,79	15,44
7	0,25	100,00	94,00	41,26	28,72	17,23
8	0,55	100,00	94,00	41,97	29,43	17,48
9	0,40	53,07	90,00	45,43	29,41	19,77
10	0,40	111,93	90,00	44,17	30,26	17,13
11	0,40	82,50	83,27	42,84	26,87	21,70
12	0,40	82,50	96,73	46,61	26,49	19,43
13	0,15	82,50	90,00	42,16	28,62	19,89
14	0,65	82,50	90,00	43,27	29,94	15,77
15.1*	0,40	82,50	90,00	42,54	31,04	17,20
15.2*	0,40	82,50	90,00	42,28	30,74	18,91
15.3*	0,40	82,50	90,00	42,85	31,22	19,40

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

*Ensaio no ponto central

Os resultados da Tabela 7.2 mostram que não há muita variação na composição do material pré-tratado em cada um dos ensaios. A porcentagem de celulose fica em torno de 40%, sendo próxima a 50% apenas no ensaio 4, que tem concentração de cal, tempo e temperatura nos níveis +1. A porcentagem de hemiceluloses dos materiais pré-tratados fica entre 25% e 30% para todos os ensaios e a porcentagem de lignina é a que mais varia, embora a esta variação ainda seja pequena, entre 14% e 21%, quando comparada com a composição da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 7. 3: Caracterização química da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio corrigida pelos respectivos rendimentos.

Ensaio	C (g/g)	t (h)	T (°C)	Rendimento			
				no pré- tratamento (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	0,25	65,00	86,00	83%	34,26	23,36	12,73
2	0,55	65,00	86,00	74%	33,52	21,57	10,76
3	0,25	65,00	94,00	78%	33,67	22,51	12,60
4	0,55	65,00	94,00	68%	33,39	18,64	11,19
5	0,25	100,00	86,00	78%	34,31	22,22	12,71
6	0,55	100,00	86,00	74%	32,76	22,15	11,43
7	0,25	100,00	94,00	79%	32,77	22,81	13,61
8	0,55	100,00	94,00	78%	32,60	22,86	13,64
9	0,40	53,07	90,00	74%	33,43	21,64	14,63
10	0,40	111,93	90,00	76%	33,43	22,89	13,02
11	0,40	82,50	83,27	80%	34,24	21,47	17,36
12	0,40	82,50	96,73	73%	33,87	19,25	14,18
13	0,15	82,50	90,00	80%	33,69	22,88	15,91
14	0,65	82,50	90,00	74%	32,13	22,23	11,67
15.1*	0,40	82,50	90,00	75%	31,73	23,15	12,90
15.2*	0,40	82,50	90,00	76%	31,99	23,26	14,37
15.3*	0,40	82,50	90,00	74%	31,81	23,18	14,36

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

*Ensaio no ponto central.

Pode-se observar na tabela 7.3 que o pré-tratamento como hidróxido de cálcio não promove altas solubilizações de celulose e hemiceluloses, apresentando remoção de lignina considerável.

Segundo CHANG (1998), o pré-tratamento com hidróxido de cálcio é um pré-tratamento lento que requer tempos longos e temperaturas moderadas para obter uma maior liberação de açúcares.

A Tabela 7.4 apresenta as solubilizações de celulose, hemiceluloses e lignina promovidas pela etapa do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Tabela 7. 4: Solubilização de celulose hemicelulose e lignina após o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Ensaio	C (g/g)	t (h)	T (°C)	Solubilização de celulose no pré-tratamento (%)	Solubilização de hemicelulose no pré-tratamento (%)	Solubilização de lignina no pré-tratamento (%)
1	0,25	65,00	86,00	0,49	1,06	47,17
2	0,55	65,00	86,00	2,66	8,66	55,33
3	0,25	65,00	94,00	2,20	4,67	47,69
4	0,55	65,00	94,00	3,03	21,04	53,56
5	0,25	100,00	86,00	0,36	5,88	47,22
6	0,55	100,00	86,00	4,84	6,20	52,57
7	0,25	100,00	94,00	4,82	3,41	43,48
8	0,55	100,00	94,00	5,32	3,20	43,40
9	0,40	53,07	90,00	2,91	8,33	39,27
10	0,40	111,93	90,00	2,92	3,03	45,95
11	0,40	82,50	83,27	0,55	9,05	27,95
12	0,40	82,50	96,73	1,62	18,46	41,13
13	0,15	82,50	90,00	2,14	3,11	33,96
14	0,65	82,50	90,00	6,68	5,85	51,55
15.1*	0,40	82,50	90,00	7,84	1,96	46,45
15.2*	0,40	82,50	90,00	7,09	1,48	40,34
15.3*	0,40	82,50	90,00	7,60	1,80	40,40

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

*Ensaio no ponto central.

Na tabela 7.4, comparando-se os ensaios 1 com 2, 3 com 4, 5 com 6, 7 com 8, nota-se que aumentando a concentração de cal e mantendo os outros fatores fixos, a solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina aumenta.

A relação entre aumento de temperatura e a solubilização do material é mais complicada. Comparando-se os ensaios 1 com 3 e 2 com 4, nota-se que, nestas condições, aumentar a temperatura mantendo os outros fatores fixos aumentou a solubilização de celulose e hemiceluloses e praticamente não influencia a solubilização da lignina. Comparando os ensaios 5 e 7, nota-se que aumentando a temperatura, a solubilização da celulose aumenta e diminui a solubilização das hemiceluloses e lignina. Nas condições dos ensaios 6 e 8, observa-se que o aumento da temperatura influencia na solubilização da celulose e diminui a solubilização das hemiceluloses e lignina. Comparando-se os ensaios 11 e 12 nota-se que o aumento da temperatura influenciou pouco na solubilização da celulose, mas aumentou a solubilização de hemiceluloses e lignina. A maior solubilização de lignina foi no ensaio 2, realizado a 86°C, a segunda menor temperatura do planejamento, o que mostra que o aumento da temperatura não é importante para a deslignificação para este pré-tratamento

A relação do tempo de pré-tratamento com a solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina varia muito dependendo dos níveis da temperatura e concentração de cal. Comparando os ensaios 9 e 10, onde a temperatura e a concentração de cal estão no ponto central e o tempo de pré-tratamento é variado do menor valor para o maior valor, nota-se que a solubilização de todos os componentes aumentam. Quando os fatores estão em outros níveis, no entanto, respostas diferentes são obtidas (comparação dos ensaios 1 com 5; 2 com 6; 3 com 7 e 4 com 8).

KIM (2004) encontrou que para o pré-tratamento de palha de milho pré-tratada por 4 semanas em condições oxidativas com hidróxido de cálcio a 55°C obteve-se uma solubilização de lignina de 70%, com um tempo de pré-tratamento de 672 horas.

Pesquisadores como WALSETH (1952), SULLIVAN (1959), MANSFIELD *et al.* (1998), CHANG e HOLTZAPPLE (2000); KONG *et al.* (1992), LEE e FAN (1982), O'DWYER (2005) e ZHU (2005) encontraram resultados contraditórios sobre a relação entre a composição química da biomassa pré-tratada e o rendimento na hidrólise enzimática, razão pela qual a eficiência do

pré-tratamento é avaliada pela hidrólise enzimática em vez de em termos de composição química e características físicas da biomassa após o pré-tratamento (RAMIREZ, 2005)

7.1.3. HIDROLISE ENZIMÁTICA DA PALHA PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Para a liberação de glicose efetuou-se a hidrólise com as seguintes condições reacionais fixas: 3 g de biomassa seca pré-tratada e volume reacional de 100 mL de tampão citrato. Como nesta etapa o importante é a obtenção de glicose, as atividades foram mantidas fixas em 15 FPU de celulase/g de biomassa seca pré-tratada e 25 CBU de β -glicosidase/g de biomassa seca pré-tratada. O pH da hidrólise foi 4,8, a temperatura de 50°C e 100 rpm.

Na Tabela 7.5 é apresentada a matriz de planejamento experimental contendo as combinações dos níveis para cada um dos ensaios e suas respectivas respostas de concentração de glicose (g/g de palha bruta), e o rendimento global (%) calculado pela Equação 7.1. É apresentada também a porcentagem de conversão na hidrólise enzimática.

$$\text{Rendimento Global} = \left(\frac{\text{g de glicose hidrolisada} * \text{fator}}{\text{g de glucana na palha bruta}} \right) * 100$$

$$\text{Rendimento Global} = \left(\frac{\text{g glicose}}{\text{g glucana}} * 0,90 \right) * 100$$

$$\text{glucana} = \text{glicose} * \frac{162,2}{180,2}$$

Equação 7.1

Tabela 7. 5: Matriz de planejamento composto central para o pré-tratamento com cal com as respostas de produção de glicose e rendimento global.

Ensaio	C (g/g)	t (h)	T (°C)	Glicose (g/g palha bruta)	Rendimento Global (%)	Conversão na hidrólise enzimática (%)
1	0,25	65,00	86,00	0,199	52,10	53,44
2	0,55	65,00	86,00	0,200	52,30	54,93
3	0,25	65,00	94,00	0,191	50,00	52,37
4	0,55	65,00	94,00	0,199	52,10	54,64
5	0,25	100,00	86,00	0,217	56,80	58,04
6	0,55	100,00	86,00	0,108	28,30	30,31
7	0,25	100,00	94,00	0,219	57,30	60,67
8	0,55	100,00	94,00	0,170	44,50	48,33
9	0,40	53,07	90,00	0,206	53,90	56,58
10	0,40	111,93	90,00	0,171	44,80	47,17
11	0,40	82,50	83,27	0,121	31,70	38,36
12	0,40	82,50	96,73	0,194	50,80	52,73
13	0,15	82,50	90,00	0,179	46,80	49,25
14	0,65	82,50	90,00	0,141	36,90	40,03
15.1*	0,40	82,50	90,00	0,170	44,50	49,15
15.2*	0,40	82,50	90,00	0,162	42,40	46,72
15.3*	0,40	82,50	90,00	0,163	42,70	47,20

Onde t = tempo, T = temperatura, C = concentração.

*triplicata no ponto central.

Pode-se observar na Tabela 7.5 que a maior liberação de glicose foi a obtida no ensaio 7 (0,219 g/g palha bruta), onde as condições foram 0,25 g/g, 100 h, 94°C, para concentração de cal tempo e temperatura, respectivamente, com um rendimento global de 57,30% e uma conversão na etapa de hidrólise de 60,67%. Enquanto que a menor liberação ocorreu no ensaio 6 (0,108 g/g palha bruta), onde as condições foram (0,55 g/g, 100 h, 86°C) para concentração de cal tempo e temperatura, respectivamente, com um rendimento global de 28,30% e conversão na etapa de hidrólise de 31,31%.

CHANG *et al* (2001) mostraram que o pré-tratamento oxidativo utilizando hidróxido de cálcio na polpa de madeira a 150°C durante 6 h removeu 77,5% da lignina e aumentou o rendimento de glicose na hidrólise enzimática de 7% (não tratada) para 77% (tratada).

Na Tabela 7.6 são comparados os estudos feitos por KIM (2004), RAMIREZ (2005) e os resultados obtidos neste trabalho, quando diferentes fontes de biomassa foram pré-tratadas com hidróxido de cálcio.

Tabela 7. 6: Comparação do pré-tratamento com hidróxido de cálcio em diferentes fontes de biomassa.

	RAMIREZ, 2005 Madeira 672 horas 65 °C; 2 g/g de hidróxido de cálcio.	KIM, 2004 Palha de Milho, 672 horas, 2 g/g de hidróxido de cálcio. 55 °C	Presente trabalho Palha de cana 100 horas 94°C; 0,25 g/g de hidróxido de cálcio.
Rendimento no pré-tratamento (%)	71	70	79
% de lignina solubilizada no pré-tratamento	45	70	43
% de celulose solubilizada no pré-tratamento	14	7	5
% de hemiceluloses solubilizada no pré-tratamento	20	25	3
Conversão de glicose na hidrólise (%)	94	97	61
Rendimento global (%)	81	91	57

RAMIREZ (2005) usou 15 FPU/g e 60 CBU/g de biomassa pré-tratada.

KIM (2004) usou 15 FPU/g e 60 CBU/g de biomassa pré-tratada ,

Os autores não especificaram a concentração da biomassa inicial na hidrólise enzimática. Neste trabalho na hidrólise foi usada uma carga de 15 FPU/g e 25 CBU/g de biomassa pré-tratada com 3% de palha pré-tratada na hidrólise enzimática.

Pode-se observar na Tabela 7.6 quando comparados os pré-tratamentos com hidróxido de cálcio de RAMIREZ (2005) e KIM (2004), onde as condições de tempo foram as mesmas (672 horas), que para madeira a deslignificação foi mais difícil fazer deslignificação, razão pela qual

RAMIREZ (2005) aumentou a temperatura para 65°C. No presente trabalho usou-se temperatura mais alta (94°C), mas com um tempo muito mais curto (100 h) e não se obteve uma grande designificação da palha de cana-de-açúcar. Análise dos dados da Tabela 7.4, feita usando o software Statistica (Figura 7.4) mostrou que apenas a concentração de cal é significativa para o aumento da solubilização de lignina a 90% de confiança. No entanto, aumentar muito a concentração de cal também aumenta a solubilização de celulose, que não é desejável.

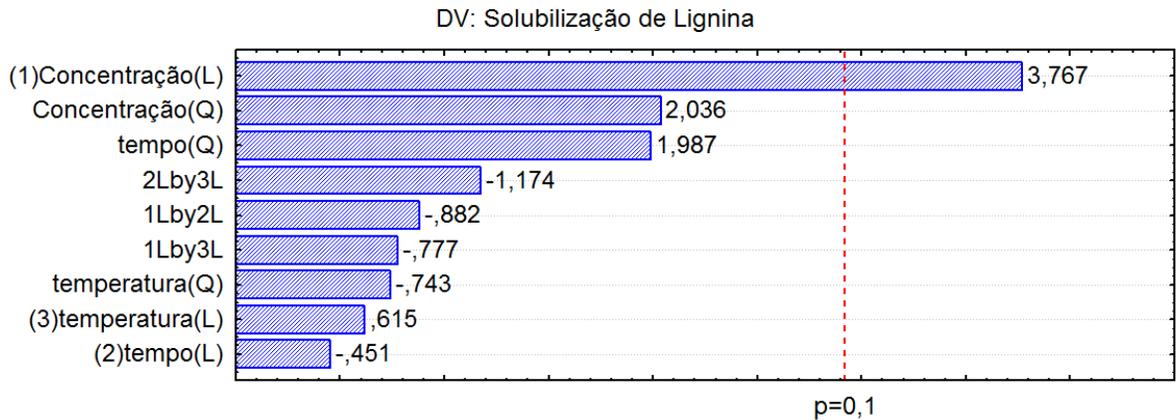
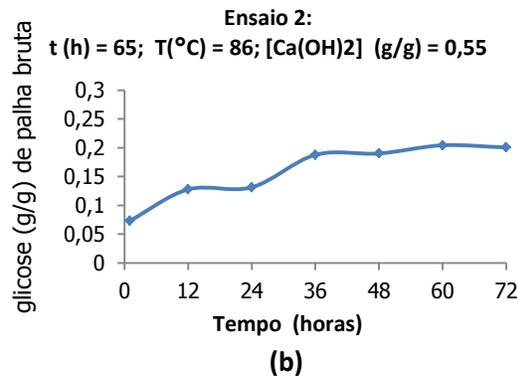
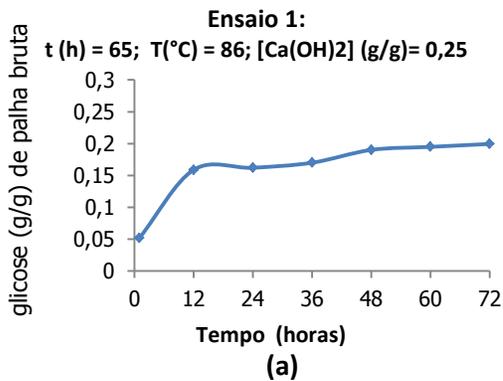
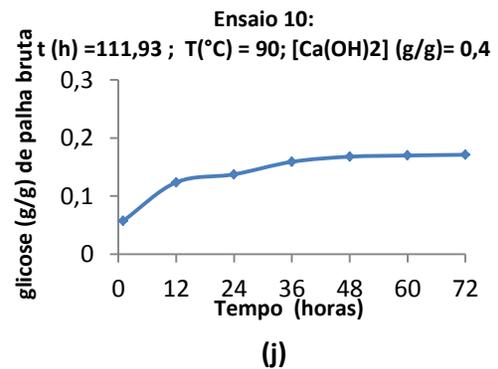
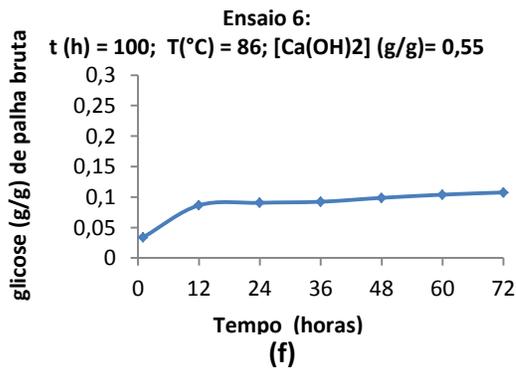
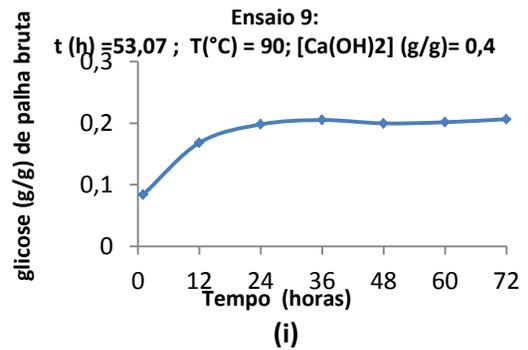
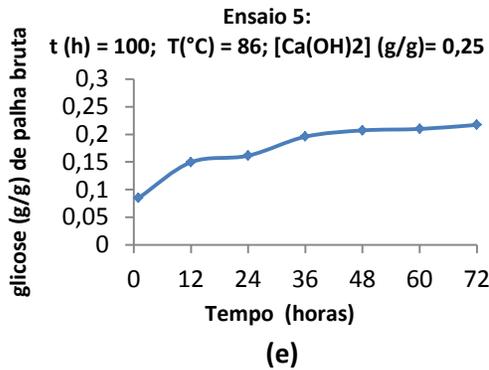
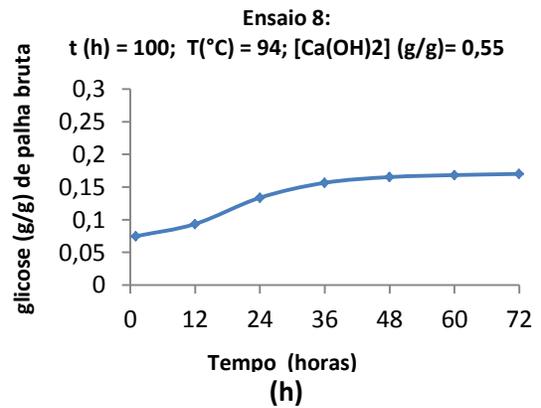
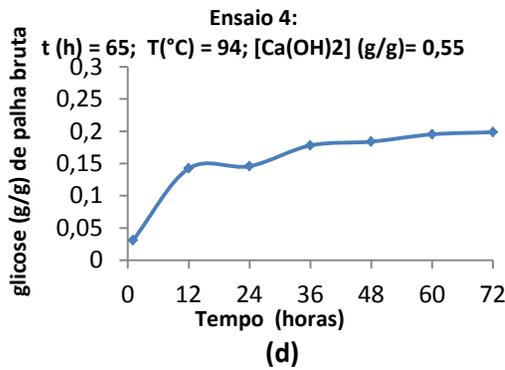
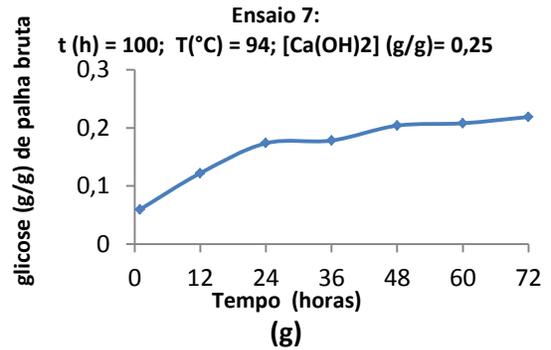
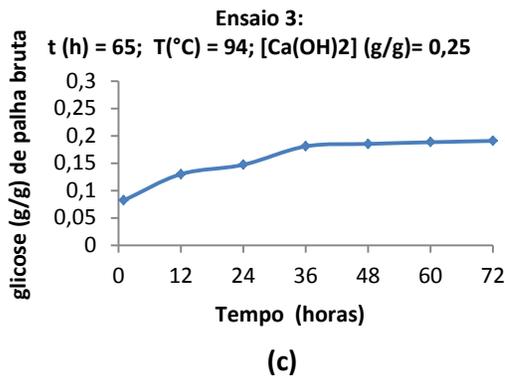


Figura 7. 4: Gráfico de Pareto para a solubilização de lignina

Os gráficos apresentados na Figura 7.5 (a – o) representam os perfis da conversão de glicose na hidrólise da palha pré-tratada em termos de concentração, com o objetivo de avaliar a etapa do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.





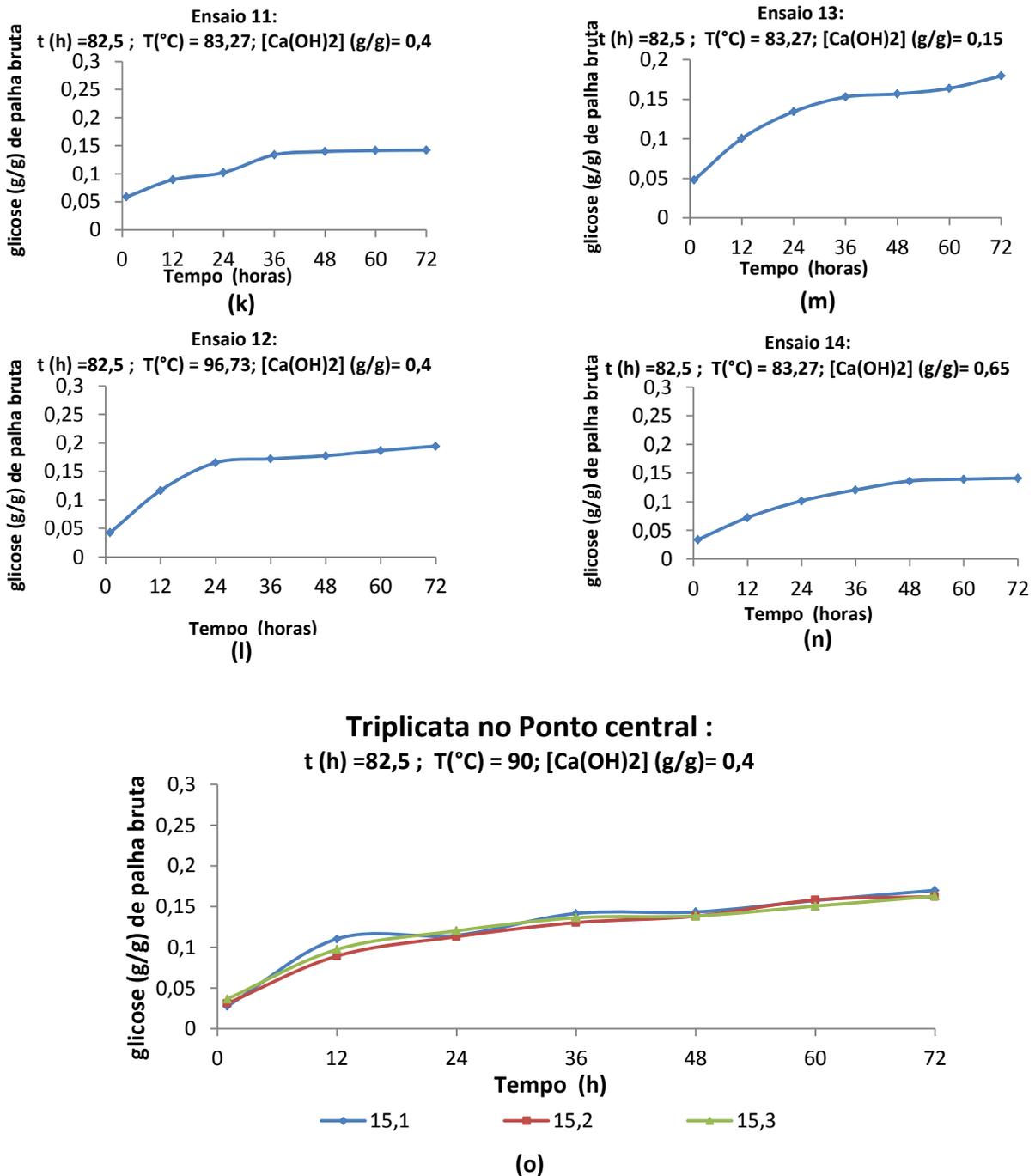


Figura 7. 5: Perfis de hidrólise para os ensaios do planejamento estatístico para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Nota-se na Figura 7.5 que após as 48 h o aumento na concentração de glicose foi quase constante. A presença de grandes quantidades de hemiceluloses e lignina interferiram na acessibilidade das enzimas celulases na etapa da hidrólise enzimática.

7.1.4. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE GLICOSE (g/g) DE PALHA BRUTA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Na tabela 7.7 são apresentadas as análises dos efeitos do planejamento experimental de palha pré-tratada com hidróxido de cálcio.

Tabela 7. 7: Análise dos efeitos e interações do planejamento experimental para o da massa de glicose (g de glicose/g de palha bruta) produzida.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coefficiente	
	Media	1,64E-01	2,51E-03	6,52E+01	2,35E-04	1,64E-01
(1)Concentração (g/g) (L)	-3,12E-02	2,36E-03	-1,32E+01	5,67E-03	-1,56E-02	
Concentração(Q)	4,93E-03	2,60E-03	1,89E+00	1,99E-01	2,46E-03	
(2)Tempo (h) (L)	-1,96E-02	2,36E-03	-8,31E+00	1,42E-02	-9,81E-03	
Tempo (Q)	2,51E-02	2,60E-03	9,66E+00	1,05E-02	1,26E-02	
(3)Temperatura (°C) (L)	2,60E-02	2,36E-03	1,10E+01	8,12E-03	1,30E-02	
Temperatura(Q)	3,15E-03	2,60E-03	1,21E+00	3,49E-01	1,58E-03	
	1*2	-4,18E-02	3,08E-03	-1,35E+01	5,41E-03	-2,09E-02
	1*3	1,68E-02	3,08E-03	5,43E+00	3,22E-02	8,38E-03
	2*3	1,83E-02	3,08E-03	5,92E+00	2,74E-02	9,12E-03

Na análise estatística apresentada na Tabela 7.7, observa-se que os efeitos quadráticos da temperatura e da concentração de cal não apresentaram influência estatisticamente significativa a 95% de confiança dentro da faixa estudada. Os efeitos linear e quadrático do tempo e o efeito linear da temperatura e da concentração de cal junto com todas as interações entre as três variáveis apresentaram efeito significativo na concentração de glicose a 95% de confiança, visto que apresentaram valores de $p < 0,05$ na faixa estudada. Nota-se que o maior efeito é a interação entre o tempo e concentração de cal seguido do efeito linear do tempo, como pode ser visto no gráfico de Pareto (Figura 7.6) e no gráfico normal de probabilidades (Figura 7.7).

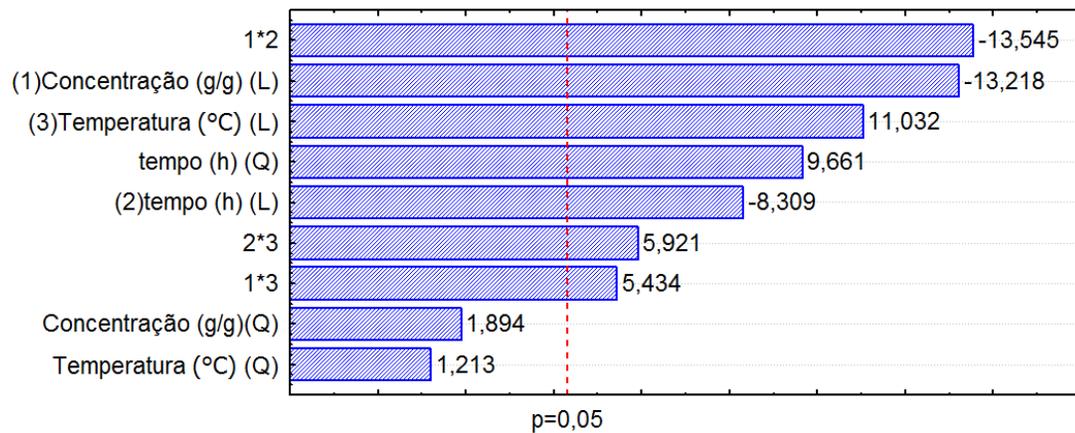


Figura 7. 6: Gráfico de Pareto da análise do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

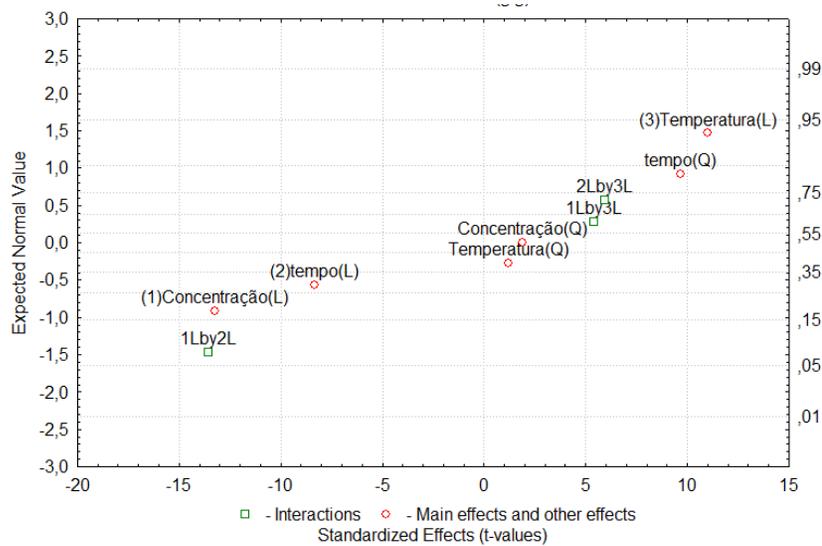


Figura 7. 7: Gráfico normal de probabilidades da análise do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Um modelo estatístico foi escrito em função das variáveis significativas, sendo, então, calculada a Tabela ANOVA (Tabela 7.8) para identificar se o modelo era estatisticamente significativo a 95% de confiança, dentro da faixa estudada. Os testes F também foram calculados para este fim.

Tabela 7. 8: Análise da variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos dados do planejamento fatorial 2^3 para análise da concentração de glicose da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Media quadrática	F calculado
Regressão R	1,34E-02	7	1,91E-03	6,84
Resíduos (r)	2,52E-03	9	2,80E-04	
Falta de ajuste (faj)	2,48E-03	7	3,55E-04	18,67
Erro puro (ep)	3,80E-05	2	1,90E-05	
Total (T)	1,59E-02	16		
¹ F Tabelado 7,9	3,29	< F calculado		
² F Tabelado 7,2	19,35	> F calculado		

O valor do teste para a regressão $F_{(7,9)} \text{ calculado} = 6,84$ foi maior que o $F_{(7,9)} \text{ Tabelado} = 3,29$ e o valor do teste F para a falta de ajuste foi $F_{(7,2)} \text{ calculado} = 18,67$, menor que o $F_{(7,2)} \text{ Tabelado} = 19,35$, indicando que o modelo é estatisticamente significativo a 95% de confiança.

Embora o maior rendimento após hidrólise tenha sido obtido para o ensaio 7 (57,3%), o ensaio 9 apresentou rendimento similar (53,9%), empregando um tempo de pré-tratamento inferior (53,07 h), quase metade do tempo usado no ensaio 7 (100 h). Como o tempo de pré-tratamento é um fator importante, diretamente relacionado ao tamanho do reator a ser utilizado em um processo industrial, escolheu-se trabalhar com o pré-tratamento nas condições do ensaio 9 (0,4 g/g; 90°C; 53,07 h), que resultou em liberação de 0,206 g glicose/g palha bruta.

7.1.5. ANÁLISE DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE GLICOSE A PARTIR DO PLANEJAMENTO 2^3 + CONFIGURAÇÃO ESTRELA COM TRIPLICATA NO PONTO CENTRAL

A Figura 7.8 mostra a superfície de resposta para concentração de glicose liberada após hidrólise da palha de cana-de-açúcar em função da concentração de cal e da temperatura, variando o tempo de pré-tratamento nos pontos estudados no planejamento.

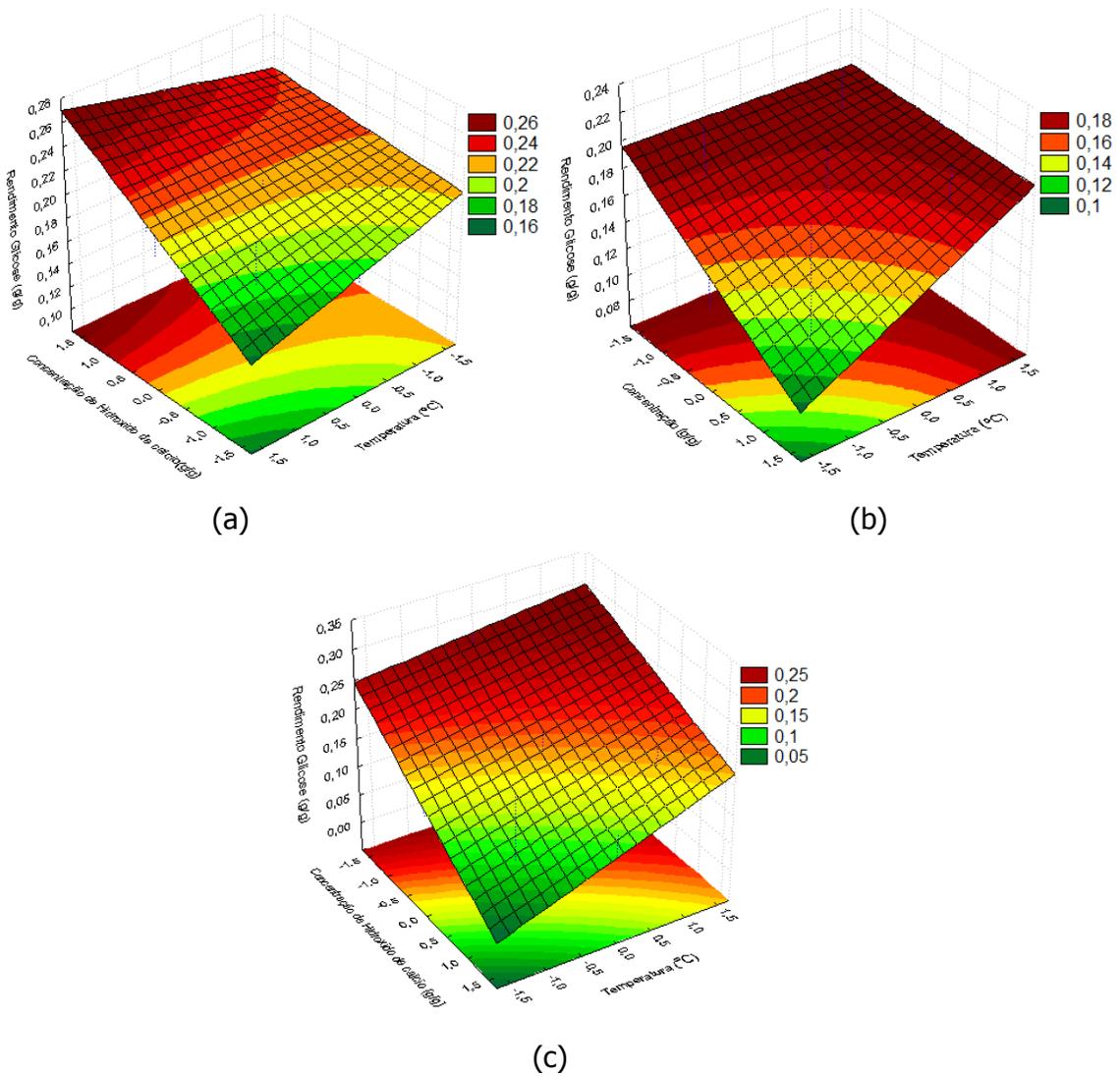


Figura 7. 8: Superfície de resposta para a concentração de glicose liberada após hidrólise da palha de cana-de-açúcar em função da temperatura e da concentração de cal mantendo o tempo no ponto mínimo -1,68 (a) no ponto central (b) e no ponto máximo +1,68 (c).

Quando analisamos a superfície da Figura 7.8 (a, b, c) podemos perceber na figura 8.8a que com tempos curtos é preciso uma maior quantidade de hidróxido de cálcio e temperaturas elevadas para atingir a maior liberação de glicose. Na Figura 7.8 (b – c) pode se observar que são necessárias altas temperaturas e longos tempos e a concentração de hidróxido de cálcio menor para atingir a maior formação de glicose.

7.1.6. ANÁLISE DE FTIR DO MATERIAL PRÉ-TRATADO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

O material pré-tratado nas condições do ensaio 9 foi analisado pela técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Figura 7.9) e pela técnica de difração de raios-X (DRX) (Figura 7.10).

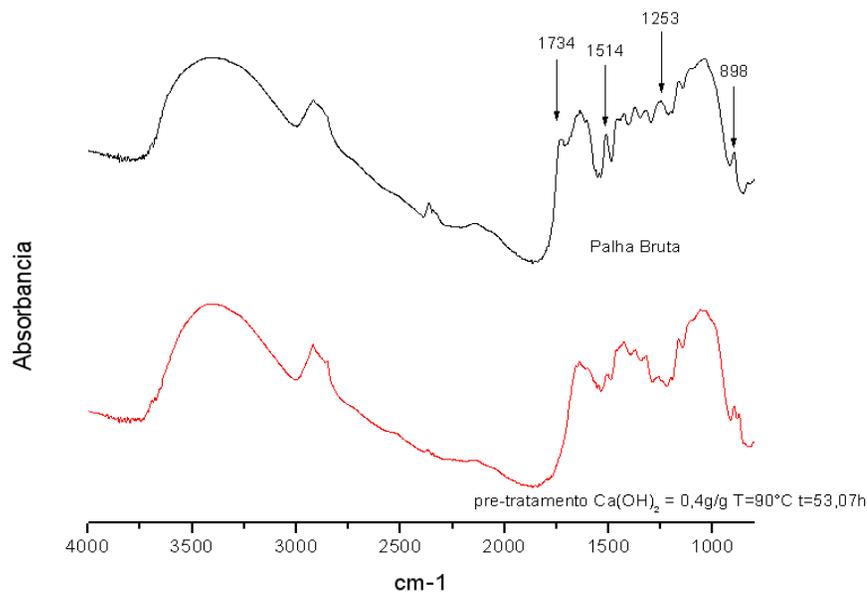


Figura 7. 9: Espectro de FTIR para a palha de cana bruta (-----) e espectro de FTIR da palha pré-tratada nas condições do ensaio 9 (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para melhor visualização, logo a escala de absorvância não foi mostrada.

Analisando a Figura 7.9 pode-se observar que, após o pré-tratamento, a intensidade dos picos da lignina (1253 e 1514 cm^{-1}) foram reduzidas, provavelmente devido a uma remoção parcial deste componente. Foi observado o desaparecimento do pico de 1734 cm^{-1} que representa o fracionamento das ligações complexas entre as hemiceluloses e a lignina. Após o pré-tratamento, os picos dos polissacarídeos (898 , 1094 , 1127 , 1200 , 1325 e 1374 cm^{-1}) tornaram-se mais nítidos devido à remoção da lignina no material (WANG, 2010).

6.4.7. ANÁLISE DE DRX DO MATERIAL PRÉ-TRATADO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

Como explicado anteriormente para pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o índice de cristalinidade mede a quantidade relativa da celulose cristalina no sólido total. À medida que a proporção da fração amorfa presente na biomassa é solubilizada, observa-se um aumento do índice de cristalinidade da biomassa. Assim, para efetuar uma correção destes índices calculados, foi levado em consideração o rendimento da etapa de pré-tratamento, obtendo assim o novo índice de cristalinidade corrigido.

A análise de DRX (Figura 7.10) demonstra a redução do índice de cristalinidade no caso da palha pré-tratada, passando de 49,01% da palha bruta para 32,82% da palha pré-tratada (corrigido pelo rendimento da etapa do pré-tratamento), nas condições do ensaio 9.

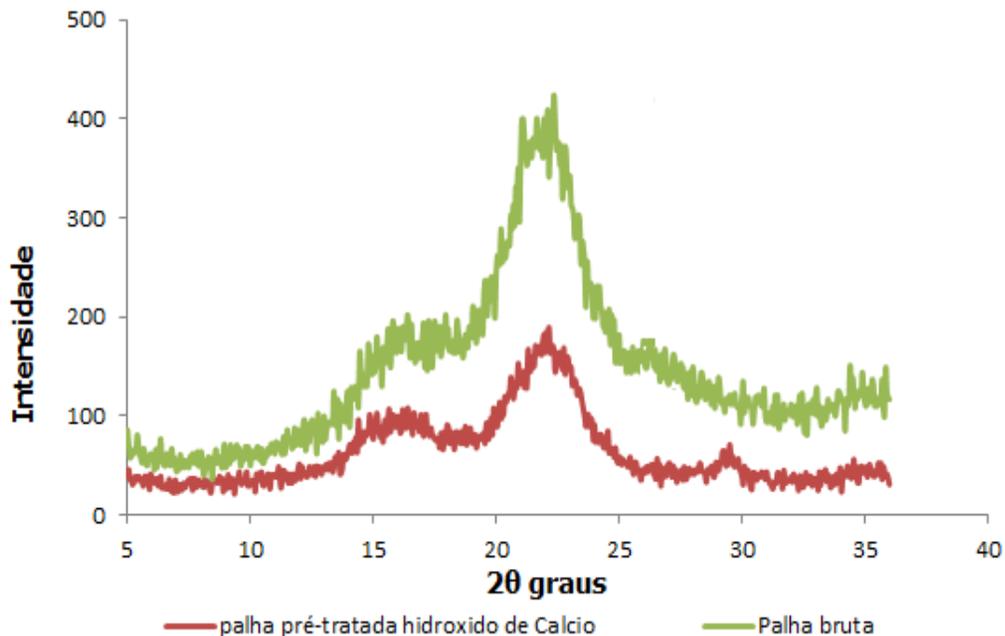


Figura 7. 10: Difratoograma da palha de cana bruta e da palha pré-tratada nas condições do ensaio 9, corrigido pelo rendimento na etapa do pré-tratamento.

6.4.8. ESTUDO DA CARGA ENZIMÁTICA NO PONTO ESCOLHIDO NO PLANEJAMENTO 2³+ CONFIGURAÇÃO ESTRELA.

Nas condições do ensaio 9 (53,07h, 90°C, 0,4g/g cal), escolhido como o ponto mais favorável para a maior obtenção de glicose, foi avaliada a influência da carga enzimática. Para isso, foram realizados testes nesta condição pré-estabelecida variando a carga enzimática de celulase na faixa de 30-50 FPU g/g de palha pré-tratada e mantendo fixa a carga de β -glicosidase em 25 CBU/g de palha seca pré-tratada. Os testes foram realizados em duplicata.

Na Tabela 7.9 são apresentadas as condições de cada um dos ensaios com cada uma das suas respostas em g de glicose/g de palha bruta, conversão na etapa da hidrólise e rendimento global do processo.

Tabela 7. 9: Rendimentos de glicose, conversão e rendimento global.

Ensaio	T (°C)	t (h)	C (g/g)	FPU (g/g)	Glicose (g /g palha bruta)	Conversão (%)	Rendimento Global (%)
1	90	53,07	0,4	15	0,206	56,58	53,90
2^b	90	53,07	0,4	30	0,339±0,002	92,88±0,494	88,69±0,471
3^c	90	53,07	0,4	50	0,354±0.002	96,92±0,195	92,54±0,187

b, c, são estatisticamente diferentes a 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Pode se observar que o aumento da carga enzimática na hidrólise contribuiu para o aumento do rendimento global de glicose. Nota-se que um aumento de 15 FPU/g para 30 FPU/g melhorou o rendimento de glicose em mais de 60% e de 30 para 50 FPU/g, houve um menor ganho no rendimento, aproximadamente 4%. Entretanto, um aumento na carga enzimática também vai ocasionar elevação dos custos do processo.

Na Figura 7.11 são apresentados os perfis de hidrólise enzimática em cada um dos ensaios (90°C, 53,07 h, 0,4 g/g) aumentando a carga de celulase na etapa de hidrólise enzimática.

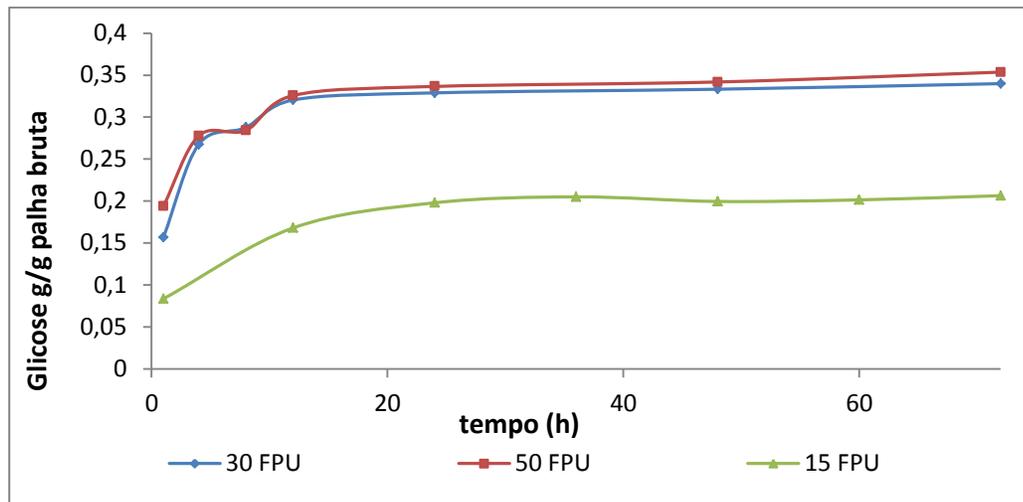


Figura 7. 11: Perfis na hidrólise enzimática aumentando a carga enzimática nas condições do ensaio 9.

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS E DISCUSSÕES COMPARAÇÃO DOS PRÉ-TRATAMENTOS

8.1. COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS PRÉ-TRATAMENTOS AVALIADOS SOBRE A PALHA DE CANA BRUTA

A comparação entre os dois pré-tratamentos avaliados foi realizada. Na Tabela 8.1 é apresentada a composição química da palha de cana submetida a cada um dos pré-tratamentos avaliados.

Tabela 8. 1: Composição química da palha de cana-de-açúcar bruta e da palha de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio.

Caracterização	Celulose (g)	Hemiceluloses (g)	Lignina (g)
PB (100 g /100g palha bruta)	34,43	23,61	34,09
P. PPHA (46 g /100 g palha bruta)	33,28	3,99	6,78
P. PHC (74 g /100 g palha bruta)	33,43	21,64	14,63

PB = Palha bruta

P. PPHA = Palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

P. PHC = Palha pré-tratada com hidróxido de Cálcio.

Pode-se observar na Tabela 8.1 que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio promoveu maiores mudanças na composição química da palha quando comparado com o pré-tratamento da palha com hidróxido de cálcio. Pode-se observar também que os dois pré-tratamentos estudados promoveram pouca solubilização de celulose, fator desejável na etapa do pré-tratamento, já que é nesta fração celulósica onde a glicose será convertida após a etapa da hidrólise enzimática, e é a glicose o monômero que entrará na fermentação na rota de obtenção de etanol de segunda geração.

8.2. SOLUBILIZAÇÃO DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

Na Figura 8.1 é apresentado o gráfico da solubilização de celulose, hemicelulose e lignina obtidas para os dois pré-tratamentos.

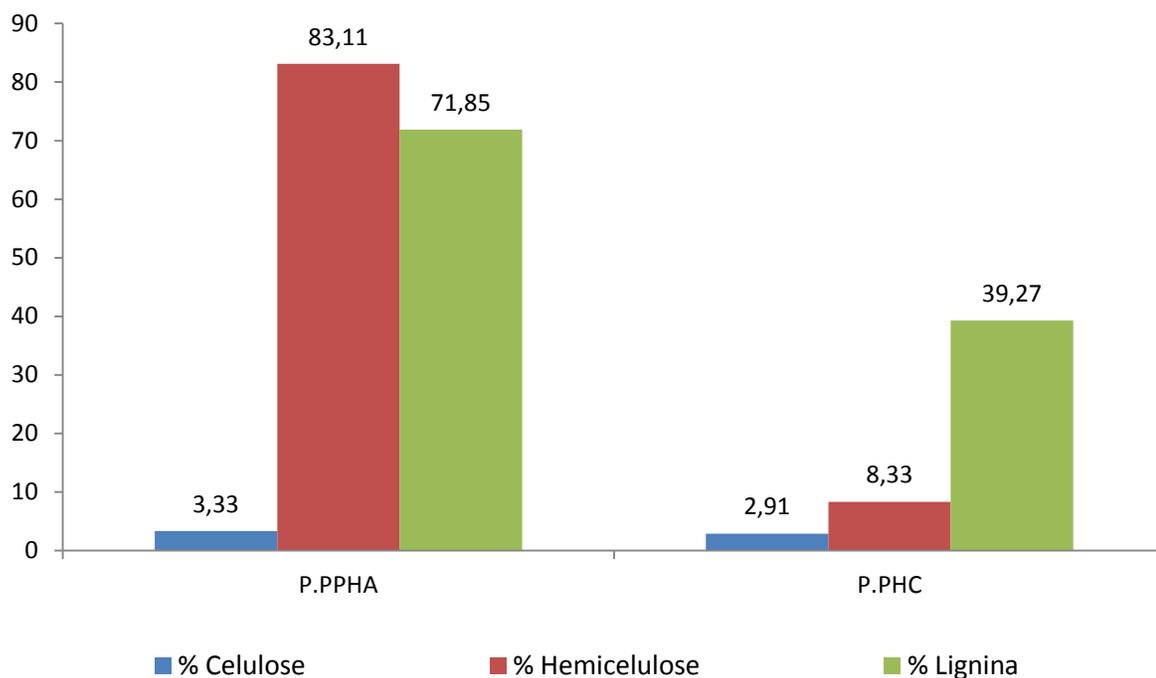


Figura 8. 1: Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina de cada um dos pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino (P.PPHA) e hidróxido de cálcio (P.PHC).

Pode-se observar na Figura 8.1 que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino promoveu as maiores solubilização das hemiceluloses e da lignina, quando comparado com o pré-tratamento realizado com hidróxido de cálcio.

8.3. RENDIMENTO DE GLICOSE

Na Tabela 8.2 são apresentados os rendimentos de glicose, rendimento global e conversão na etapa da hidrólise enzimática realizada 15 FPU/g de celulase e 25 CBU/g de β -glicosidase.

Tabela 8. 2: Comparação do rendimento na produção de glicose, na conversão e o rendimento global, da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e pré-tratada com hidróxido de cálcio.

Ensaio	T (°C)	t (h)	C	Glicose (g/g palha bruta)	Conversão (%)	Rendimento Global (%)
PB	NA	NA	NA	0,080	21,00	21,00
P.PPHA	60	1	6,6%	0,332	90,35	86,97
P. PHC	90	53,07	0,4 g/g	0,206	56,58	53,90

T= temperatura; t = tempo; C = concentração.

PB = Palha bruta

NA = não avaliado

P. PPHA = palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

P. PHC = Palha pré-tratada com hidróxido de Cálcio.

Pode se observar na Tabela 8.2 que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio proporcionou um rendimento global de glicose na hidrólise de, 86,97%, maior que o rendimento quando o pré-tratamento foi realizado com hidróxido de cálcio, 53,90%.

8.4. COMPARAÇÃO DO FTIR

Na Figura 8.3 são apresentados os FTIR da palha bruta e da palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio e com hidróxido de cálcio. Pode-se observar que os dois tipos de pré-tratamento tiveram uma redução dos picos da lignina (1253 e 1514 cm^{-1}). Foi observado o desaparecimento do pico de 1734 cm^{-1} que representa o fracionamento das ligações complexas entre a hemicelulose e a lignina. Após o pré-tratamento, os picos dos polissacarídeos (898, 1094, 1127, 1200, 1325 e 1374 cm^{-1}) tornaram-se mais nítidos devido à remoção da lignina no material (WANG, 2010).

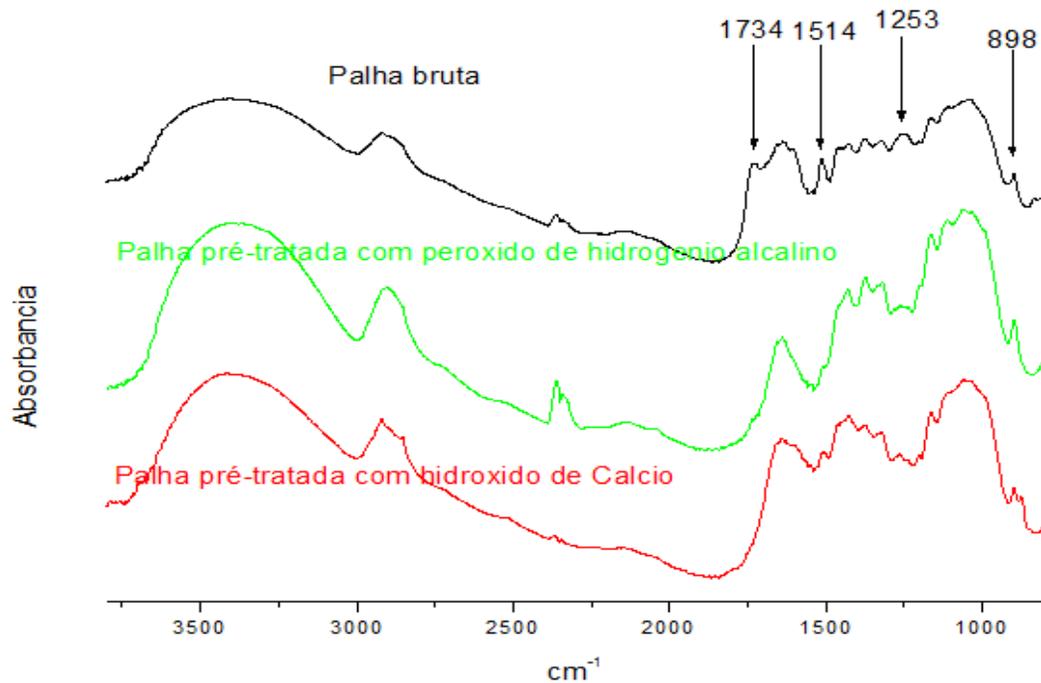


Figura 8. 2: Espectros de FTIR da palha bruta (-----) palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (-----) palha pré-tratada com Hidróxido de Cálcio (-----). Os espectros foram deslocados na vertical para melhor visualização, por isso não é mostrado o eixo de absorvância.

8.5. COMPARAÇÃO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE

Na figura 8.3 são apresentados os difratogramas da palha de cana bruta e da palha de cana pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e com hidróxido de cálcio. Observando-se uma diminuição do índice de cristalinidade com os dois tipos de pré-tratamento quando comparada como a palha bruta. E na Tabela 8.3 é apresentada a porcentagem de redução do índice de cristalinidade provocada por cada um dos pré-tratamentos avaliados.

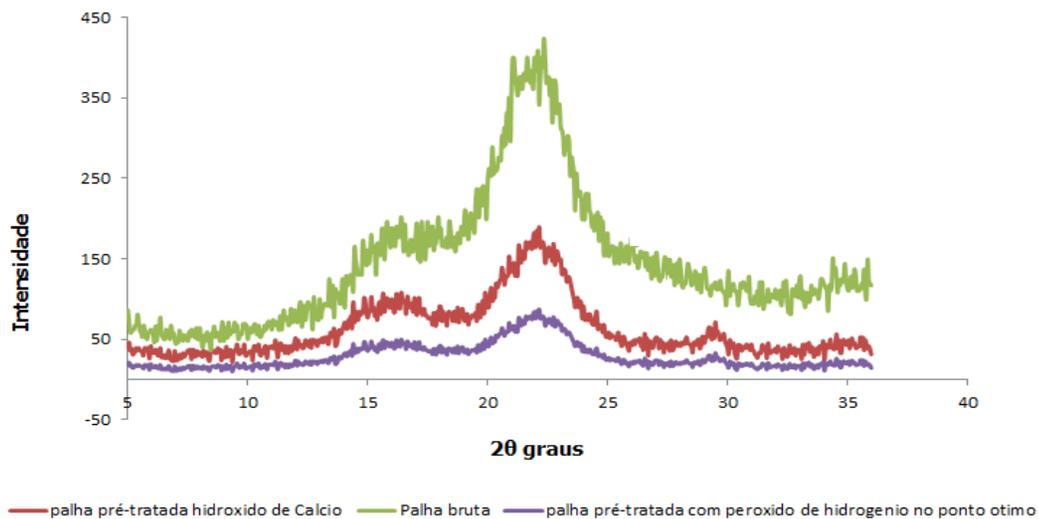


Figura 8. 3: Difratograma para a palha de cana bruta e pré-tratada com peróxido de hidrogênio e com hidróxido de cálcio.

Tabela 8. 3: Índices de cristalinidade (CrI) para a palha bruta e para a palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio e com hidróxido de cálcio.

Palha de cana de açúcar	Corrigido pelo pré-tratamento %	Redução da cristalinidade do material %
Palha bruta	49,01	
Palha pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino	31,80	35,11
Palha pré-tratada com Hidróxido de Cálcio	32,82	33,03

Pode se observar na Tabela 8.3 que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou uma diminuição do índice de cristalinidade um pouco maior quando comparado como o índice de cristalinidade da palha pré-tratada com hidróxido de cálcio. É importante destacar que os dois tipos de pré-tratamento avaliados promoveram uma redução do índice de cristalinidade acima de 30%.

CAPÍTULO IX

CONCLUSÃO

A palha de cana-de-açúcar se mostra uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol celulósico por conter um alto teor de celulose (34,43%) e por apresentar bons rendimentos na liberação de glicose após hidrólise enzimática, quando a palha de cana foi previamente pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino ou com hidróxido de cálcio.

O tempo de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino não apresentou significância estatística a 95% de confiança na faixa estudada, tendo sido fixado em 1 h (mesmo tempo determinado com ótimo por RABELO, 2010). As condições obtidas como ótimas para o pré-tratamento foram 60 min de reação à 60°C, utilizando uma concentração de peróxido de 6,6%. Nestas condições foi obtida uma concentração de glicose de 0,33 g/g de palha bruta, que corresponde a um rendimento global de reação de 86,97% e conversão de hidrólise de 90,35%. Estes resultados foram obtidos quando a hidrólise foi realizada com 3% de sólidos e carga enzimática de 15 FPU/g palha de celulase e 25 CBU/g palha de β -glicosidase.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio promoveu solubilização de celulose em menor escala quando comparado a outros tipos de pré-tratamentos encontrados na literatura, realizados para a palha. A solubilização da celulose foi de 3,3% e das hemiceluloses e lignina foram de 83,11% e 71,85%, respectivamente.

Neste estudo, foi considerada uma maior concentração de sólidos no pré-tratamento (15%) com peróxido de hidrogênio alcalino quando comparado com os trabalhos anteriores de Rabelo (2007) que trabalhou com 4% de sólidos. O aumento na carga de sólido é importante para diminuir o gasto de reagente, utilizando-se neste trabalho aproximadamente 0,44 mL de peróxido/g palha ou 0,65 g peróxido/g palha.

O pré-tratamento da palha com hidróxido de cálcio também melhorou a susceptibilidade do material à hidrólise enzimática, mas nas condições avaliadas não foi possível obter conversão em glicose após a hidrólise superior a 0,21 g/g de palha bruta correspondente a um rendimento de conversão de 56,58% com uma carga enzimática de 15 FPU/g palha seca pré-tratada. Na condição escolhida (0,4 g cal/g palha; 90°C; 53,07h) foi obtido um rendimento global de 53,90%. Nestas condições, a solubilização da celulose, hemiceluloses e lignina foram 2,91%, 8,33% e 39,27%, respectivamente.

No pré-tratamento da palha de cana com hidróxido de cálcio para se aumentar a conversão e o rendimento foi necessário dobrar a carga de celulase para 30 FPU/g, resultando em conversão de 0,34 g/g de glicose e uma porcentagem de conversão enzimática 92,88% e rendimento total de 88,69%.

Quando comparados os dois pré-tratamentos, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou os melhores rendimentos e conversão de glicose, o qual também foi observado mediante análises físicas (MEV, FTIR, DRX), as quais evidenciaram as mudanças da palha após a etapa do pré-tratamento. Por tal motivo vale a pena continuar com novos estudos para sua implementação a nível industrial, aproveitando mais um resíduo lignocelulósico na produção de etanol de segunda geração.

CAPÍTULO X

TRABALHOS PUBLICADOS

TRABALHOS PUBLICADOS

O. L. BAYONA AYALA¹, S. C. RABELO² e A. C. COSTA¹. *ALKALINE HYDROGEN PEROXIDE PRETREATMENT OF SUGARCANE STRAW*. 34th *Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 30 abril – 3 maio 2012, New Orleans, EUA.

CAPÍTULO XI

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Calcular a relação custo-benefício de cada um dos pré-tratamentos visando sua aplicação industrial. Podem do ser comparados com outros tipos de pré-tratamento;

Aumentar a porcentagem de massa de palha bruta na etapa do pré-tratamento e a porcentagem de palha pré-tratada na etapa da hidrólise enzimática;

Estudar a influência do conteúdo de cinzas nos rendimentos de processo empregando-se diferentes palhas de cana-de-açúcar;

Fazer estudos como a fração hemicelulósica utilizando enzimas xilanases na hidrólise enzimática com a finalidade de aumentar os açúcares fermentescíveis na etapa da fermentação;

Caracterizar fisicamente a palha de cana-de-açúcar após o pré-tratamento em relação a propriedades como porosidade, grau de polimerização e área superficial; para avaliar a influência destas propriedades na etapa da hidrolise enzimática;

CAPÍTULO XII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

REFERENCIAS

ALIZADEH, H., TEYMOURI, F., GILBERT, T.I., Y DALE, B.E. *Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). Applied Biochemistry and Biotechnology.* 121-124, 1133-41. 2005.

ALVIRA, P. *Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, Bioresource Technology,* 101: 4851–4861, 2010.

ARAÚJO, SELEMA DAVID. Co-Combustão de Biomassa e Carvão em Leito Fluidizado: Impactes nas emissões atmosféricas de NO_x, SO₂, CO, Dioxinas e Furanos e Material Particulado; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008. Dissertação de mestrado

ADÃO DE CAMARGO, FERNANDO. Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli(3-hidroxi-butirato-co-valerato)/(PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar. - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado)

ARO, N., PAKULA, T., PENTTILA, M. *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.* FEMS Microbiology Reviews, Oxford, 29: 719-739, 2005.

AUGSTBURGER, F. *et al.*; Asociación Naturland Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico Guías de 18 cultivos, Caña de Azúcar, 1ª Edición; 1; 2000.

AZZAM, A. M. *Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. Journal of Environmental Science and Health B,* 24(4):421-433, 1989.

AZZINI, A.; ZIMBACK, L.; GONDIM-TOMAZ, R.M.A.; Palha de cana de açúcar como matéria prima na obtenção de fibras celulósicas para papel. *Braganita campinas,* 51: 137 – 140, 1996.

BAILEY, C. W.; DANCE, C. W. *Tappi.* 58:104, 1975.

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

BANERJEE, G., CAR, S., SCOTT-CRAIG., J; HODGE, D., Walton, J.D. *Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. Biotechnology for Biofuels.* 4 – 16. 2011.

BAZÁN, JUAN HERALDO VILOCHE. Estudo de produção enzimática da dextrana clínica. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1993. Tese (Doutorado).

BIDLACK, J., MALONE, M., BENSON, R. *Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants Department of Biology, University of Central Oklahoma, Edmond.* 51 – 56, 1992.

CAMPOS, L.H.F., CARVALHO, S.J.P., NICOLAI, M., CHRISTOFFOLETI, P.J. Controle de plantas daninhas do gênero I pomo e a em plantio de cana-de-açúcar com aplicações de amicarbazone em pós-emergência dirigida. *Herbologia e biodiversidade numa agricultura sustentável.* Lisboa. 9: 1-4, 2009

CANTWELL, B.A., SHARP, P.M., GORMLEY, E., MCCONNELL, D.J. *Molecular cloning of bacillus β -glucanases. Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Academic Press, San Diego, CA.* 181–201, 1988.

CARDOSO, S.W., SANTOS, A.F., MOTA, C.M., Pré-tratamento de biomassa para produção de etanol de segunda geração. *Revista analytica.* 56: 64 – 77. 2011.

CARVALHO, W., CANILHA, L., MILAGRES, A.M.F. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vejeta. *Analytica.* 44: 48 -54, 2009.

PEREIRA Jr., N., CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova,* 33: 1-12.2010.

CAVENAGHI, A.L., ROSSI, C.V.S., NEGRISOLI, E., COSTA, E.A.D., VELLINI, E.D. Dinamica do herbicida sulfentrazone em palha de aveia e cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Gramado, Anais... Gramado: SBCPD, 162, 2002.

CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. *Lime pretreatment of switchgrass. Applied Biochem. Biotechnology.* 63 – 65: 3 – 19, 1997.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. *Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 74: 135 – 159, 1998.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., KIM, C. H., HOLTZAPPLE, M. T. *Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 94: 1 – 28, 2001.

CHANG, V.S., HOLTZAPPLE, M. T. *Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. Applied Biochem. Biotechnology.* 86: 5-37, 2000.

CHEN, C. L. *Lignins: occurrence in woody tissues, isolation, reactions, and structure. I. S.Wood structureandcomposition.* New York: Marcel Decker, 183-261, 1991.

CHEUNG, S.W., ANDERSON, B.C. *Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary waste water. Bioresour. Technol.* 59: 81–96, 1997.

CHRISTOFFOLETI, P.J., LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no Mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2. ed. Campinas: HRAC-BR. 3-22. 2004.

CHRISTOFFOLETI, P.J., LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Dinâmica de herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar. 49, 2005.

CHUM, H.L., DOUGLAS, L.J., FEINBERG, D.A., SCHROEDER, H.A. *Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose. Solar Energy Research Institute: Golden, Colorado,* 1 – 64,1985.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento de safra. 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Boletim del 13 de maio Acesso em 05 de julho de 2011.

CORREIA, N., DURIGAN, J. Emergência de plantas daninhas em solo coberto com palha de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*. 22: 1,11 – 17, 2004.

CURRELI, N., FADDA, M.B., RESCIGNO, A., RINALDI, A.C. *MILD alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw*. *Process Biochem.*, 32: 665 – 670, 1997.

DEL RIO, J. *Valorización de productos agroforestales para la fabricación de pasta de papel: Caracterización química y modificación estructural de sus constituyentes en los procesos de cocción y blanqueo, Sevilla-España*. <http://www.irnase.csic.es/users/delrio/web-Proy-AGL2005-01748/Proyecto.htm> consultada junho 2011.

DIEN, B. *Mass balances and analytical Methods for biomass pretreatment experiments. En Biomass to biofuels: strategies for global industries*, Vertés Alain, et al. Editor. 2007.

DOS REIS GARCIA, DANIELLA. Determinação De Dados Cinéticos Do Pré-Tratamento De Bagaço De Cana-De-Açúcar Com Peróxido De Hidrogênio Alcalino E Da Hidrólise Enzimática Posterior. São Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

DURAND, H., BARON, M., CALMELS, T., TIRABY, G. *Classical And Molecular Genetics Applied To Trichoderma Reesei For The Selection Of Improved Cellulolytic Industrial Strains. Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Academic Press, San Diego, CA, 135 – 151. 1988.*

FAN L. T., GHARPURAY, M. M., LEE, Y. H. *Cellulose Hydrolysis*. Berlin, Alemanha. Springer-Verlag. 3: 1-68, 1987.

FAN, L.T., LEE, Y., BEARDMORE, D.H. *Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis*. *Biotechnol.Bioeng.* 22: 177 – 199. 1980.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter, Berlin., 1989.

FERREIRA, F. A., AGUILERA, D. B., CECON, P.R. Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. *Planta Daninha*, Viçosa. 22: 1, 43-51, 2004.

FERREIRA, VERÔNICA Produção De B-Glucosidase Em *Saccharomyces Cerevisiae* Recombinante E Avaliação De Seu Emprego No Processo De Hidrólise Enzimática Simultânea À Fermentação Para A Produção De Etanol De Segunda Geração, Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010 (Tesis de Doutorado)

FREITAS, T. Etanol de 2ª geração já é quase realidade. <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/985140-etanol-de-2-geracao-ja-e-quase-realidade.shtml>, consultada em novembro de 2011.

FREUDENBERG, K., NEISH, A. C. *The constitution and biosynthesis of lignin*. Berlin : Springer-Verlag. 129p, 1968

FUKUSHIMA, R. S.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 3135-3143, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 505-511, abr. 2003.

GALBE, M., Y ZACCHI, G. A. *review of the production of ethanol from softwood*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 618 - 628, 2002.

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

GÍRIO, F., FRANCISCO, M., CARVALHEIRO, LUÍS C. *Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments*. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 67: 849-864, 2008

GONÇALVES, E., MARCELO B. W., SAAD, M. Utilização Da Palha Da Cana-De-Açúcar Pré-Tratada Biologicamente Para A Produção De Polpa Celulósica, VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. UNICAMP, 2005.

GOULD, J.M. *Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic. Saccharification. Biotechnology and Bioengineering.* 26: 46-52, 1984.

GOULD, J.M. *Studies on the Mechanism of Alkaline Peroxide Delignification of Agricultural Residues, Biotechnology and Bioengineering,* 27: 225-231 1985

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, 1 – 4, 2009.

GREGG, D.J., SADDLER, J.N. *Factors Affecting Cellulose Hydrolysis And The Potential Of Enzyme Recycle To Enhance The Efficiency Of An Integrated Wood To Ethanol Process Biotechnol. Bioeng,* 51: 375– 383, 1996.

GUIMARÃES, S.C., SOUZA, I.F., PINHO, E. Emergência de Tridax procumbens em função de profundidade de semeadura, do conteúdo de argila no substrato e da incidência de luz na semente. Planta Daninha, Viçosa. 20: 3, 413-419, 2002.

HAMELINCK, C. N., VAN, H., G & FAAIJ A P C., *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, Biomass Bioenergy,* 28: 384-410, 2005.

HARMSSEN,P., BAKKER, R., HUIJGEN, W., BERMÚDEZ LÓPEZ, L. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. University & Research centre - Food &Biobased Research (WUR-FBR, NL) Energy Research Centre of the Netherlands (ECN, NL) Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías,* 11- 13, 2010.

HON, D.N.S., SHIRAIISHI, N. *Wood and Cellulosic Chemistry,* second ed. Dekker, New York. 2001.

HUANG, X.L., PENNER, M.H. *Apparent substrate inhibition of the Trichoderma reeseicellulase system. J. Agric. Food Chem.* 39: 2096 – 2100, 1991.

JORGENSEN, H., KRISTENSEN, J.B., FELBY, C. *Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 1, 119-134, 2007.

KAAR WE, HOLTZAPPLE MT using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biomass Bioenergy* v.18, p.189–199, 2000.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. *Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment Biosource Technology*, 97: 778 – 785, 2006.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover Bioresource technology*, 96:18, 1994 – 2006, 2005.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. *Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover Bioresour Technol.* 97: 583 – 591, 2006.

KIM, SE HOON. *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover.* Texas: escola de quimica. Texas A&M University. 2004. Tese (Doutorado).

KOVÁCS, K., SZAKACS, G., ZACCHI, G. *Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of Trichoderma reesei and Trichoderma atroviride* *Bioresour Technol.*, 100: 1350-1357, 2009.

KONG, R., ENGLER, C., SOLTES, E. *Effects of cell wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood.* *Appl Biochem Biotechnol*, 34: 23-35, 1992.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. L J. E.; STROEVE, P. *Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production.* *Ind. Eng. Chem. Research.*, 2009.

LEE, Y., FAN, L. *Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates.* *Biotechnol and Bioengineering*, 24: 2383-2406, 1982.

LEITE, C. P., ZAMBONI, L. M., TRIBESS, A., OLIVEIRAJUNIOR, S. *Use fo Natural Gas And Sugar Cane Bagasse Incogeration systems*, 209 – 216.2003.

LIU, C., Y WYMAN, C.E. *The effect of low rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover*. Ind. Eng. Chem. Res. 42: 5409–541, 2003.

LÓPEZ, R., POBLANO, V.M., LICEA-CLAVERIE, A., ALVALOS, M., ALVAREZ-CASTILLO, A., CASTAÑO, V.M., *Alkaline modification of sugar cane bagasse*. Adv. Compos. Matter. 9(2), 99–108. 2000

LOPEZ, A. *Pretratamiento De La Biomasa Lignocelulósica Para La Producción De Biocombustibles: Aspectos Técnicos Y Económicos*. México: escola de economia. Universidad autónoma metropolitana, 2008.

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

MACHADO, F. B. P. Brasil. A doce terra. Disponível em: <http://www.canaweb.com.br/conteudo/historiadosetor.htm>. Acesso em: 15 nov. 2010.

MACHADO DE CASTRO, ALINE. *Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (Saccharum spp.)*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado).

McMILLAN, J. D. *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, 292–324, 1994.

MANSFIELD, S., SAAKE, B., GUBITZ, G., DE-JONG, E., PULS, J., SADDLER, J. *Identification, purification, and characterization of the predominant endoglucanases from two brown-rot fungal strain of Gloeophyllum*. In *Carbohydrates from Trichoderma reesei and other microorganisms: structures, biochemistry, genetics and applications*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 227-244. 1998

MISHIMA, D., TATEDA, M., IKE, M., FUJITA, M. *Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes*. Bioresource Technol. 97: 2166 – 2172. 2006.

MOHAN, D., PITTMAN, C. U., STEELE, P. H., Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review; *Energy & Fuels*, 20: 848-889. 2006

MOHAM, D. J., TAHERZADEH AND KEIKHOSRO KARIMI. *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review*, *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1621 – 1651, 2008.

MORAIS, S. A. L. Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*: isolamento, quantificação e análise estrutural. Ciências – Química Orgânica. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992. Tese (doutorado)

MOREIRA VASCONCELOS DE OLIVEIRA, FERNANDO. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e designificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Lorena: escola de Biotecnologia Industrial, Universidade De São Paulo, 2010, Dissertação (Mestrado)

MOSIER, N., WYMAN, C. E., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. T., LADISCH, M. *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technology*. 96: 6, 673 – 686, 2005.

MUSSATO SI, ROBERTO IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technol.* .93: 1-10, 2004.

MOUTTA DE OLIVEIRA, RONDINELE. Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol, LORENA: Escola De Engenharia Química. Universidade de Lorena, 2009. Dissertação (mestrado).

MUSEO MTC, <http://museu.mct.gov.mz/acucar/>, Consultado novembro 2011.

NIGAM, A., SINGH, B., *Production of liquid biofuels from renewable resources*, *Progress in Energy and Combustion Science*, *Science* 37: 52 – 68, 2011.

O'CONNOR, R. P., R. WOODLEY, J.J., KOLSTAD, R., KEAN, D.A., GLASSNER, B. MASTEL, J.M., RITZENTHALER, H., JOHN, J. WARWICK, J.R. HETTENHAUS& R.K. *Process for fraction-*

atingligno-cellulosic biomass into liquid and solid products. assignee U. S. A. Nature-works LLC, patent number WO 2007120210., 2007.

OLIVA DOMÍNGUEZ, JOSÉ MIGUEL. *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus..* Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2003. (Tesis de doctorado).

O'DWYER, JONATHAN PATRICK. *Developing a fundamental understanding of biomass structural features responsible for enzymatic digestibility.* Texas A&M University, College Station, Texas, 2005. Disertação (mestrado).

PALMQVIST, E., HAGERDAL, B. *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, 74:1, 25-33, 2000.*

PENNER, M.H., LIAW, E.-T. *Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on Trichoderma cellulase.* In: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, DC, 363–371, 1994.*

PEREZ, J., DORADO, J. M., RUBIA, T. D., MARTINEZ, J. *Biodegradation And Biological Treatment Of Cellulose, Hemicellulose And Lignin: An Overview.*Int. Microbiol, 5: 53 – 63, 2002.

PETRI, D., OGEDA, T. *Hidrólise enzimática de biomassa, Química. Nova, 33:7, 1549-1558, 2010.*

PITARELO, ANNA PAULA. *Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.* Curitiba: Escola De Química Universidade Federal Do Paraná, 2007, Dissertação (Mestrado).

PLAYNE, M. J. *Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. Biotechnol. Bioeng. 26: 426 - 433, 1984.*

PROTEC - APROVEITAMENTO TOTAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR. 2008. Disponível em: <<http://www.protec.org.br/noticias.asp?cod=2766>>. Acesado em: 09 de agosto de 2010.

RABELO, S., MACIEL, R., CARVALHO, A. *Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production Appl Biochem Biotechnol. 153: 139 – 150. 2009.*

RABELO, SARITA CÂNDIDA. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. São Paulo: Escola 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 a produção de etanol de segunda geração. São Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2010. tese (Doutorado).

RAMIREZ SIERRA, ROCIO *Long-Term Lime Pretreatment Of Poplar Wood*. Texas: Escola De Ciências Texas A&M University, 2005. Dissertação (Mestrado).

RAMOS, L. P., SADDLER, J. N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46: 193-207. 1994.

ROSA, S. S., GARCIA, J. L. Etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *Revista do BNDES*, 32: 119-150, 2009.

ROSSELL, C. E., LAHR FILHO, D., HILST, A. G. P. *Saccharification of sugar cane bagasse for ethanol production using the organosolv process* *Sugar Industry*, 131: 105-109, 2006.

RUBIRA, A. F., SILVA, R., HARAGUCHI, S. K., MUNIZ, E. C. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos *Quím. Nova*. 32: 3 São Paulo. 2009.

SAHA, B.C.; COTTA, M.A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb. Tech.* 41: 528 – 532. 2007.

SAHA, B.C.; COTTA, M.A. *Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw*. *Biotechnol.* 22: 449 – 453. 2006

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. *Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol* *Biotechnol Progr.* 21: 816 – 822, 2005.

SANTOS, F., QUIEROZ, J.H., COLODETTE, J. L., POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brasil. Recebido em 26/4/11; aceito em 11/11/11; publicado na web em 13/1/12

SHELL, D.J., TORGET, R., POWER, A., WALTER, P.J., GROHMANN, K., HINMAN, N.D. *A technical and economic analysis of acid-catalyzed steam explosion and dilute sulfuric acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 28/29: 87-97, 1991.

SCHURZ, J., GHOSE, T.K. *Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings*, IIT, New Delhi, 37, 1978.

SIERRA, R., HOLTZAPPLE M.T., Oxidative Lime Pretreatment of Dacotah Switchgrass Matthew. *Appl Biochem Biotechnol* 165: 243–259, 2011.

SILVA, M.G.E., SILVA JUNIOR, J.L., PINTO JUNIOR, R. T. Produção de etanol de segunda geração uma revisão. *Revista Científica da UNIFAE, São João da Boa Vista*, 4: 2, 2010.

SILVA, S., HIROYUKI, I., TAKASHI, E., SHINICHI, Y., ELBA, P. *Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation.* *Bioresource Technology* 101: 7402–7409. 2010.

SMITH, Y W., CRUTZEN, P.J., MOSIER, A.R. El “lanzamiento del óxido nitroso de la producción agro-biofuel niega la reducción que se calienta global substituyendo química y física atmosféricas de los combustibles fósiles”. *Disucss.* 7 11191-11205, 2007.

SUN, X. F., XU, F., SUN, R. C., FOWLER, P., BAIRDD. *Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw.* *Carbohydr.* 340: 97 – 106. 2005.

SUN, Y., CHENG, J. *Hydrolysis of Lignocellulosic Materials For Ethanol Production: A Review* *Technology Bioresource.* 83: 1 – 11. 2002.

SULLIVAN, J.T. *A rapid method for the determination of acid-insoluble lignin in forages and its relation to digestibility.* *Journal of Ani Science.* 18: 1292-1298, 1959.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J., *technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Biomassa and bioenergy*, 10: 367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. *Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. Bio Resources.*, 2: 707-738, 2007.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. *Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review Int. J. Mol. Sci.* 9: 1621-1651, 2008.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - UNICA. Perfil da produção. Disponível em: <www.portalunica.com.br>. Acesso em: 30 mar. 2010.

VERDECIA, J., DÍAZ, M., *Aspectos Tecnológicos Generales Para La Conversión A Etanol De La Biomasa Lignocelulósica Tecnología Química. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.* 28: 3, 64, 2008.

WBCSD Encomenda de publicações Versão Original (Inglês), c/o Earth print Limited. As publicações estão disponíveis em: www.wbcd.org. acessado em novembro 2011.

WALSETH, C.S. *The influence of the fine structure of cellulose on the action of cellulases. Tappi.* 35: 233-238. 1952

WYMAN, C E., DALE, B E., ELANDER, R T., HOLTZAPPLE, M. *Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover, Biores Technol*, 96: 2026- 2032, 2005.

WYMAN, C.E. *Handbook on bioethanol: production and utilization*; Taylor & Francis: Washington DC, USA, 1996.

XU, J. *Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. Bioresource Technology*, 101: 2900 – 2903, 2010.

ZHANG, Y.H.P., LYND, L.R. *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed systems. Biotechnology and Bioengineering.* 88: 797-824, 2004.

ZHAO, X., ZHANG, L., LIU, D., *Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. Bioresource Technol*, 99: 3729 – 3736. 2007.

ZHENG, Y-Z., TSAO, G.T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion *Biotechnology Progress*. 14: 6 890-896, 1998.

Zhu, L., 2005. *Fundamental study of Structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass*. PhD dissertation, Texas A&M University, College Station, Texas.