**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de
bioetanol**

Juliano Bragatto

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica
de Plantas**

**Piracicaba
2010**

Juliano Bragatto
Químico

Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol

Orientador:
Prof Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Bragatto, Juliano

Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol /
Juliano Bragatto. - - Piracicaba, 2010.
154 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bagaços 2. Biocombustíveis 3. Biomassa 4. Cana-de-açúcar 5. Carboidratos
6. Cascas (Planta) 7. Celulose 8. Enzimas hidrolíticas 9. Fermentação alcoólica I. Título

CDD 581.192482
B813a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À Deus,

pela força e a coragem de continuar nos momentos mais difíceis desta caminhada

Aos meus pais,

Luiz Antonio e Maria Rosa

Pelo imenso apoio para que eu chegasse até aqui

À minha amada esposa,

Simone

Por acreditar em mim, me apoiar e fazer minha vida
mais feliz

À luz da minha vida,

Laura

Por fazer de mim pai, enchendo
meus dias de felicidade e orgulho

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao estimado professor Dr. Carlos Alberto Labate, pelos valiosos ensinamentos, oportunidade, confiança e acima de tudo pela importante amizade construída ao longo destes 12 anos de convivência.

À Dra. Mônica T. V. Labate pelo apoio e pela amizade.

Ao grande amigo de todas as horas e futuro doutor Luis Felipe Boaretto, pela sua amizade e generosidade em todos os momentos desta “nossa” caminhada, “Valeu cara”.

Às excelentes estagiárias Gabriela Bassetti Lavorente e Hana Karina Pereira da Silva, pela grande ajuda em todos os trabalhos realizados, muito obrigado!

À prof^a Dra Sandra Helena da Cruz pelo incondicional apoio na condução das análises de fermentação alcoólica, e também à Vivian Cristrina Pietrobom e Ellen Karine Diniz.

À secretária do departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pelo excepcional atendimento e apoio incondicional.

Ao Prof Dr. Igor Polikarpov do Instituto de Física de São Carlos/USP pelo fornecimento das enzimas.

À doutoranda Marisa Lima da USP/São Carlos pela ajuda no desenvolvimento das hidrólises enzimáticas.

Aos funcionários da Companhia Suzano de Papel e Celulose, Dr. Esteban González e José Mateus Wisniewski pelas ajudas nas coletas de material.

Ao Prof Dr. José Otávio Brito e Udenilson Luiz Ceribelli, pelas análises de cinzas.

Aos meus queridos sobrinhos Luiz Felipe “Tal”, Luiz Fernando “Dico”, Luiz Eduardo “Dudu”, e Gabriela “Bi” pelo carinho e por se fazerem sempre presentes nos momentos de alegria.

Aos meus estimados irmãos, Marcelo, Luiz Antonio “Macarrão”, Adriana e minha cunhada Eliana, e ao meu cunhado Severino Bezerra “Gilvan”.

Aos amigos de todas as horas Livia Franceschini, Cristiano Barbosa, agradeço pelos valiosos momentos de alegria.

Aos antigos amigos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Edenilson Rabelo, Lilia Barbosa, Gisele Lacerda, Dra. Daniela D. Nascimento, Dona Palmira, Dra. Danielle Gregório.

Aos amigos do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Ilara Budzinski, Maria Juliana Calderan Rodrigues, Dr. David H. Moon, Dr. Pedro Barreto, Thiago Falda, Felipe Garbelini e Ivan Mozol, Luiz Magrini, Julia Morosini, Fabio e Fernando pela harmoniosa convivência.

Aos novos integrantes do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas Ana Carolina Murad, Camila Ribeiro, Danielle Izilda e Larissa Cruz.

Aos professores do curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP, pelos ensinamentos e abertura de novos horizontes, em especial aos professores Dr. Ricardo Alfredo Kluge e Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria e Alimentos, Pedro Dorival Lucentini e Sylvino Luiz Torrezan.

Aos Funcionários do Departamento de Genética, Dr. Luiz Humberto Gomes, Nivaldo Laerte Pivetta, Carmo José Bueno de Campos, Rudinei de Jesus Graciani, Antonio Marques Silveira, Benedito Edson Soares.

À Suzano de Papel e Celulose pela bolsa de doutorado e o fornecimento dos materiais.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigado !

“Se vi mais longe que os outros é porque estava sobre os ombros de gigantes”

ISSAC NEWTON.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Composição química das biomassas lignocelulósicas	27
2.2 Arquitetura da parede celular.....	29
2.2.1 Celulose	31
2.2.2 Hemiceluloses	32
2.2.3 Lignina.	33
2.2.4 Extrativos e outros componentes	35
2.3 Biomassa residual e energia	36
2.3.1 Setor florestal e produção de celulose	36
2.3.2 Produção de celulose e geração de cascas	37
2.4 Propriedades da casca	39
2.4.1 Propriedades fisiológicas.....	39
2.4.2 Propriedades anatômicas.....	39
2.4.3 Propriedades químicas.....	41
2.5 Bagaço de cana-de-açúcar.....	41
2.6 Biomassa lignocelulósica como fonte para a produção de etanol de segunda geração (E2G).....	42
2.7 Pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas	44
2.7.1 Pré-tratamentos físicos	45
2.7.2 Pré-tratamentos físicos-químicos.....	45

2.7.3 Pré-tratamentos químicos.....	46
2.8 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....	46
2.9 Desafios para a produção de etanol de segunda geração (E2G).....	47
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 Biomassa lignocelulósica	49
3.2 Coleta das cascas de eucalipto.....	49
3.2.1 Painéis de casca	49
3.2.2 Resíduos deixados no campo.....	49
3.3 Preparo da biomassa lignocelulósica para procedimentos analíticos	50
3.3.1 Secagem e teor de umidade.....	50
3.3.2 Cavaqueamento e moagem das cascas.....	50
3.4 Composição química dos materiais lignocelulósicos.....	50
3.4.1 Determinação dos extrativo.....	50
3.4.2 Determinação das cinzas.....	50
3.4.3 Determinação dos carboidratos estruturais (parede celular).....	51
3.4.4 Determinação das ligninas (insolúvel e solúvel).....	52
3.5 Composição dos carboidratos no macerado de fibras	52
3.6 Parâmetros para a extração dos carboidratos solúveis totais (CST) presentes nas cascas de eucalipto.....	52
3.6.1 Planejamento fatorial para remoção dos CST.....	52
3.6.2 Determinação dos CST em fase alcoólica.....	54
3.6.3 Determinação dos CST em fase aquosa.....	54
3.6.4 Determinação dos CST em amostras de cavaco e serragem	54
3.6.5 Determinação dos CST em amostras secas e frescas	54
3.6.6 Remoção dos CST utilizando extrator de inox.....	55

3.7 Fermentação alcoólica.....	56
3.7.1 Rendimento alcoólico.....	56
3.7.2 Viabilidade celular	57
3.8 Produtividade de etanol a partir dos CST.....	57
3.9 Extração do caldo da casca de eucalipto por dois processos: moagem e prensagem	58
3.10 Anelamento das árvores de eucalipto.....	59
3.11 Pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas.....	59
3.11.1 Ácido sulfúrico H_2SO_4	60
3.11.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinado com ácido sulfúrico (H_2SO_4).....	60
3.11.3 Ácido clorídrico (HCl).....	61
3.11.4 Pré-tratamentos sequenciais com meios ácidos (HCl) e alcalinos (NaOH).....	62
3.12 Hidrólise enzimática das cascas de eucalipto e bagaço de cana	63
3.12.1 Eficiência da hidrólise enzimática.....	64
3.13 Planejamento fatorial para hidrólise enzimática da casca de eucalipto.....	64
3.14 Análise estatística.....	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 Composição química das cascas de eucalipto.....	67
4.1.2 Composição química das cascas de eucalipto comparadas com o bagaço de cana-de-açúcar.....	68
4.1.3 Composição química do macerado de fibras das cascas de eucalipto e bagaço de cana	72
4.2 Quantificação dos açúcares solúveis nas cascas de eucalipto.....	73
4.3 Remoção dos CST e extrativos das cascas de eucalipto com água ou etanol.....	76
4.4 Remoção dos CST das cascas de eucalipto em amostras de cavacos e serragem.....	77
4.5 Secagem das cascas de eucalipto e degradação dos CST.....	79
4.6 Remoção dos CST das cascas de eucalipto utilizando extrator de inox e água quente.....	80
4.7 Quantificação de CST nos caldos de cascas de eucalipto (concentrado).....	81
4.8 Fermentação alcoólica dos caldos de casca de eucalipto.....	82

4.9 Moagem e prensagem das cascas de eucalipto.....	83
4.10 Estimativas para a produção de etanol a partir dos açúcares solúveis nas cascas de eucalipto.....	84
4.11 Conteúdo de CST nas cascas de eucalipto submetidas ao anelamento.....	86
4.12 Pré-hidrólise dos materiais lignocelulósicos	87
4.12.1 Pré-hidrólise da biomassa com ácido sulfúrico (H_2SO_4).....	88
4.12.2 Pré-hidrólise da Biomassa com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinado com ácido sulfúrico (H_2SO_4).....	94
4.12.3 Pré-hidrólise da biomassa com ácido clorídrico (HCl).....	103
4.12.3.1 Determinação dos carboidratos na fase líquida (hidrolisado).....	104
4.12.3.2 Determinação dos carboidratos na fase sólida (biomassa residual).....	106
4.12.4 Determinação dos carboidratos nas biomassas pré-tratadas HCl e NaOH	109
4.13 Hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas.....	111
4.13.1 Planejamento fatorial para otimizar a hidrólise enzimática da casca de eucalipto.....	115
4.14 Estimativas da produção de etanol celulósico a partir das cascas de eucalipto.....	118
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
REFERÊNCIAS	123
ANEXOS	141

RESUMO

Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol

A utilização de fontes renováveis para a produção de biocombustíveis tem sido incentivada no mundo todo. Assim, na proposta de um novo cenário energético mundial, aliado as condições ambientais, surge a necessidade de se procurar outras fontes alternativas de matéria primas renováveis. Neste contexto, o Brasil possui condições especiais, se considerarmos os resíduos lignocelulósicos do setor florestal. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de celulose à partir de fibra curta de *Eucalyptus* spp, com um setor bem desenvolvido e em plena expansão. Toda esta atividade industrial produz anualmente cerca de 2,8 a 5,7 milhões de toneladas resíduos sólidos na forma de casca (principalmente de eucaliptos). Em muitos casos o destino aplicado para essas biomassas é pouco eficiente e representa uma perda significativa do potencial energético, pois estes resíduos lignocelulósicos são passíveis de biotransformação a compostos com elevado valor agregado, tais como os biocombustíveis (etanol). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das cascas de eucalipto frente a produção de etanol combustível. Desta maneira, as cascas de 5 clones comerciais (*E.urophylla* x *E. grandis* e *E. grandis*) foram caracterizadas quanto a composição química. As cascas de eucalipto foram submetidas a uma série de pré-tratamentos ácidos e alcalinos, avaliados em planejamento fatorial com o objetivo de recuperar os açúcares potencialmente fermentecíveis. As cascas de eucalipto apresentaram aproximadamente 20% de carboidratos solúveis totais – CST (glicose, frutose e sacarose). Os CST foram extraídos com água quente à temperatura de 80°C e em seguida fermentados com leveduras convencionais (*Saccharomyces cerevisiae*). A produção de etanol por tonelada de casca seca foi de 106 litros (etanol de primeira geração). Após a extração dos CST, as biomassas residuais das cascas de eucalipto foram submetidas a uma série de pré-tratamentos. O pré-tratamento alcalino (NaOH) apresentou uma eficiência enzimática de conversão da glicose de aproximadamente 30% após 24 horas de incubação. Com os resultados obtidos da hidrólise enzimática, estima-se que possam ser produzidos mais 94 litros de etanol por tonelada de casca livre de extrativos (etanol celulósico).

Palavras-chave: Carboidratos; Enzimas; Fermentação; *Saccharomyces cerevisiae*; Bagaço de cana de açúcar; Celulose e papel

ABSTRACT

Evaluation of the potential use of *Eucalyptus* spp. bark for bioethanol production

The use of no fossil source for biofuels production has been stimulated in the all world. Proposing a new global scenario related to the energy matrix, together with the environmental conditions, there is the need to search alternative renewable raw materials. In this context, Brazil presents special conditions, considering the lignocellulosic residues from the forestry industry. Nowadays, Brazil is the largest cellulose short fiber producer from *Eucalyptus* spp, having a strong sector in expansion. This industrial activity produces in average 2,8 to 5,7 million tons of solid waste in the form of bark (mostly from eucalyptus). Usually, the destiny of this biomass is inefficient and represents a significant loss of the energetic potential, since these lignocellulosic residues can suffer biotransformation and produce high value components, like the biofuels (ethanol). Therewith, the aim of this work was to evaluate the potential of the eucalyptus bark related to ethanol fuel production. In this way, barks from 5 commercial clones (*E. urophylla* x *E. grandis* e *E. grandis*) were characterized due to the chemical composition. Eucalyptus barks were subjected to a series of acid and alkaline pretreatments, evaluated in factorial design aiming to recover potentially fermentable sugars. Eucalyptus bark presented on average 20% of total soluble carbohydrates – TSC (glucose, fructose and sucrose). TSC were extracted with hot water (80 °C) and fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. Ethanol production per ton of dry bark was 106 liters (first generation ethanol). After TSC extraction, the residual biomass from eucalyptus bark were subjected to several pretreatments. The alkaline pretreatment (NaOH) presented a high enzymatic efficiency of glucose conversion of approximately 30% after 24 hours of incubation. With the results obtained in enzymatic analysis, is estimated that it can be produced more than 94 liters of ethanol per ton of bark (cellulosic ethanol).

Keywords: Carbohydrates; Enzymes; Fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; Sugarcane bagasse; Cellulose and paper

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arquitetura da parede celular vegetal.....	30
Figura 2- Estrutura da fração celulósica	32
Figura 3- Esquema estrutural para a lignina da madeira <i>Eucalyptus grandis</i>	33
Figura 4 - Evolução da produção anual de celulose e casca.....	38
Figura 5 - Estrutura da casca das árvores	39
Figura 6 - Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	44
Figura 7 - Esquema da coleta das cascas de eucalipto.....	49
Figura 8 - Esquema de funcionamento do extrator de inox.....	55
Figura 9 - Equipamentos para a extração do caldo da casca de eucalipto.....	58
Figura 10 - Anelamento das árvores de eucalipto.....	59
Figura 11 - Esquema do pré-tratamento seqüencial para as cascas de eucalipto.....	63
Figura 12 - Perfil comparativo da composição química das cascas de eucalipto e bagaço de cana-de-açúcar.....	72
Figura 13 - Carboidratos das fibras de eucalipto e bagaço cana.....	73
Figura 14 - Curva de contorno (CST e extrativos) para a casca de eucalipto (HGU2).....	75
Figura 15 - Conteúdo de carboidratos solúveis e extrativos para as casca de eucalipto HGU2 removidos em tratamento com água e etanol.....	76
Figura 16 - Conteúdo de carboidratos solúveis e extrativos para a casca de eucalipto EG2 removidos com água e etanol.....	77
Figura 17 - Conteúdo de carboidratos solúveis removidos nas amostras de serragem e cavacos para a casca de eucalipto HGU2.....	78

Figura 18 - Curva de degradação dos carboidratos solúveis totais e teor de umidade para as cascas de eucalipto.....	79
Figura 19 - Curva de degradação dos carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose) em função do tempo de secagem.....	80
Figura 20 - Rendimento alcoólico e viabilidade celular para os caldos de casca de eucalipto no processo de fermentação.....	83
Figura 21 - Concentração de açúcares solúveis nos caldos das cascas de eucalipto originados da moenda e da prensa.....	84
Figura 22 - Balanço de massa para a produção de etanol de casca de eucalipto.....	86
Figura 23 – Carboidratos solúveis nas cascas de eucalipto.....	87
Figura 24 - Perfil da remoção da xilose no planejamento (H_2SO_4) para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.....	90
Figura 25 - Perfil da remoção da glicose no planejamento (H_2SO_4) para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.....	91
Figura 26 - Curvas de contorno para a razão H/P (H_2SO_4) para casca de eucalipto e bagaço de cana.....	94
Figura 27 - Perfil da biomassa residual após a pré-hidrólise ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.....	96
Figura 28 - Perfil da lignina insolúvel do resíduo proveniente da pré-hidrólise ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.....	97
Figura 29 - Perfil da razão H/P do resíduo proveniente da pré-hidrólise ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.....	101
Figura 30 - Metodologia de superfície de resposta (MSR) para H/P ($H_2SO_4 + H_2O_2$).....	100

Figura 31 - Metodologia de superfície de resposta (MSR) para os açúcares fermentescíveis ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$).....	102
Figura 32 - Perfil da biomassa residual após a pré-hidrólise com HCl.....	104
Figura 33 - Conteúdo de glicose removida após pré-hidrólise com ácido clorídrico (HCl).....	106
Figura 34 - Curvas de contorno para a glicose (HCl) para as cascas de eucalipto.....	107
Figura 35 - Eficiência da hidrólise enzimática.....	113
Figura 36 - Carboidratos liberados no processo enzimático.....	114
Figura 37 - Eficiência hidrolítica para os pré-tratamento I e III para as cascas de eucalipto e bagaço.....	115
Figura 38 - Superfície de resposta para a liberação de glicose da hidrólise enzimática.....	118
Figura 39 - Balanço de massa para a produção de etanol celulósico a partir de casca de eucalipto.....	86

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos materiais lignocelulósicos.....	27
Tabela 2 - Composição química da madeira e da casca.....	28
Tabela 3- Variáveis de estudo do planejamento 2^3 remoção dos CST.....	53
Tabela 4 - Esquema do planejamento fatorial 2^3 remoção dos CST.....	53
Tabela 5 - Variáveis de estudo do planejamento 2^4 (H_2SO_4).....	60
Tabela 6 - Variáveis de estudo do planejamento 2^3 ($H_2SO_4 + H_2O_2$).....	61
Tabela 7 - Variáveis de estudo do planejamento 2^3 (HCl).....	61
Tabela 8 - Variáveis de estudo do planejamento 2^3 para a hidrólise enzimática.....	65
Tabela 9 - Composição química das cascas de eucalipto.....	67
Tabela 10 - Composição química das cascas de eucalipto e do bagaço de cana.....	70
Tabela 11 - Conteúdo de carboidratos solúveis do planejamento experimental.....	74
Tabela 12 - ANOVA para o conteúdo carboidratos solúveis.....	75
Tabela 13 - Eficiência do extrator de inox.....	81
Tabela 14 - Concentração dos carboidratos solúveis dos caldos de casca	82
Tabela 15 - Produtividade de etanol a partir dos açúcares solúveis da casca de eucalipto.....	85
Tabela 16 - Ensaios do planejamento experimental (H_2SO_4) para a glicose e xilose.....	89
Tabela 17 - Ensaios do planejamento experimental (H_2SO_4) para as hexoses e pentoses.....	92
Tabela 18 - ANOVA para os valores da razão H/P (H_2SO_4).....	93
Tabela 19 - Planejamento experimental ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para biomassa residual e lignina.....	95
Tabela 20 - Planejamento experimental ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para glicose e xilose.....	98
Tabela 21 - Planejamento experimental ($H_2SO_4 + H_2O_2$) para hexoses e pentoses.....	99
Tabela 22 - ANOVA para os valores da razão H/P ($H_2SO_4 + H_2O_2$).....	100

Tabela 23 - ANOVA para os valores de açúcares fermentescíveis ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$).....	102
Tabela 24 - Planejamento experimental (HCl) para a biomassa residual e lignina.....	103
Tabela 25 - Planejamento experimental (HCl) para glicose e xilose da fase líquida	105
Tabela 26 - ANOVA para os valores de glicose (HCl).....	107
Tabela 27 - Planejamento experimental (HCl) para glicose e xilose da fase sólida.....	108
Tabela 28 - Resumo do planejamento experimental (HCl) para glicose, xilose e gli/xil.....	109
Tabela 29 - Composição química das biomassas pré-tratadas.....	110
Tabela 30 - Carboidratos liberados na hidrólise enzimática.....	111
Tabela 31 - Eficiência da hidrólise enzimática.....	112
Tabela 32 - Planejamento experimental (enzima) com os respectivos conteúdos de carboidratos.....	116
Tabela 33 - ANOVA para a liberação de glicose da hidrólise enzimática.....	116
Tabela 34 – Coeficientes de regressão para a resposta de glicose no planejamento fatorial.....	11

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, grande parte da energia utilizada para o transporte e manufatura de diversos produtos químicos têm sido realizadas às custas de petróleo (combustível não-renovável), isso equivale a 86,6 milhões de barris/dia (AIE, 2010). A quantidade existente de energia fóssil disponível no planeta ainda é uma incógnita, e as reservas mundiais de petróleo requerem uma boa gestão a fim de terem sua disponibilidade prolongada. Além disso, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo por países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental fizeram renascer nos últimos anos a atenção para as fontes alternativas de energia (BASTOS, 2007). Diante disto, a utilização de fontes renováveis para a produção de biocombustíveis tem sido fortemente incentivada no mundo todo, pois estas fontes podem diminuir significativamente a poluição do ar atmosférico (BADGER, 2002).

O mais comum combustível de fonte renovável é o etanol, o qual pode ser derivado de milho (amido) ou da cana de açúcar (sacarose). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de bioetanol, a safra de 2008/2009 produziu 27,5 bilhões de litros de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar (UNICA, 2010).

Outra fonte de matéria prima renovável que está sendo amplamente estudada para a conversão em biocombustível é a biomassa lignocelulósica. A produção de biocombustível a partir da biomassa lignocelulósica residual (resíduos agroindustriais) tem um enorme aspecto ambiental favorável, uma vez que a emissão de CO₂ na atmosfera é compensada pela absorção deste gás durante o desenvolvimento vegetativo de novas biomassas.

Anualmente, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumulados no planeta, decorrentes da produção agrícola ou agroflorestal. Em muitos casos o destino aplicado para esses materiais é pouco valorizado e representa uma perda significativa do potencial energético. Neste contexto, o Brasil possui condições especiais, se considerarmos os resíduos lignocelulósicos do setor florestal, pois estas biomassas residuais estão disponíveis em uma forma razoavelmente limpa e em grandes quantidades.

O Brasil é o maior produtor mundial de celulose à partir de fibra curta de *Eucalyptus spp*, com um setor bem desenvolvido e em plena expansão. O consumo de madeira para a produção de celulose e papel em 2008 foi de 28,56 milhões de toneladas (IBGE, 2009). As indústrias de base florestal estão realizando vultosos investimentos no setor, aumentando ainda mais a capacidade

de processar a madeira. Em contrapartida, ocorrerá a geração de uma quantidade considerável de resíduos florestais que, se não tiverem um destino adequado poderão causar sérios impactos ao meio ambiente (ABRAF 2010).

Na colheita da madeira para a produção de celulose, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são gerados (cascas, galhos e ponteiros). Dentre estas biomassas residuais lignocelulósicas, as cascas representam de 10 a 20% em peso da madeira coletada. Assim, estima-se que, anualmente sejam geradas de 2,8 a 5,7 milhões de toneladas de cascas, principalmente as de eucalipto. A casca de eucalipto contém inúmeros compostos químicos (óleos essenciais, taninos, carotenóides, flavonóides, polissacarídeos, açúcares solúveis, etc.) (FENGEL; WEGENER, 1989). Algumas espécies de eucalipto na Austrália são conhecidas como *gum tree*, devido às altas concentrações de açúcares na seiva da casca. Assim, dentre as biomoléculas encontradas nas cascas de eucalipto, os carboidratos solúveis (glicose, frutose, sacarose e rafinose) tem alto potencial para serem utilizados, pois estão prontamente disponíveis para a produção de etanol de primeira geração (fermentação dos açúcares solúveis).

No que se refere a matriz lignocelulósica (biomassa), existe um enorme potencial de utilização, mas a produção do etanol celulósico (segunda geração) ainda apresenta muitas limitações tecnológicas e custo elevado. O desenvolvimento de um processo convencional para a produção de etanol a partir de biomassa residual envolve a otimização de forma integrada de quatro etapas; caracterização química da biomassa, pré-tratamentos, hidrólise e fermentação (GOUVEIA et al, 2009).

Dentro deste contexto, surge a nossa proposta de estudos da biomassa residual geradas pelas empresas de celulose e papel. Assim, diante desta problemática avaliamos o potencial das cascas de eucalipto para a produção de etanol.

Desta maneira, grande parte dos estudos devem ser focados no conhecimento da composição química da biomassa lignocelulósica, pois é nesta etapa que os materiais lignocelulósicos são selecionados ou descartados. Além da seleção da biomassa, algumas etapas de pré-tratamentos (otimização da matriz lignocelulósica) devem ser desenvolvidas para melhorar a liberação de carboidratos fermentescíveis e consequentemente gerar menores quantidades de substâncias inibitórias da fermentação. Nas etapas de pré-tratamento, a utilização de técnicas de planejamento experimental (fatorial) é uma ferramenta valiosa (RODRIGUES E IEMMA, 2005).

Após um adequado pré-tratamento da biomassa, a hidrólise pode ser realizada com enzimas específicas (celulases). A hidrólise enzimática tem baixo rendimento em açúcares, porém gera menos poluentes ambientais se comparado com a hidrólise ácida (MATSUSHITA et al, 2009). Na seqüência da etapa de hidrólise, a fermentação é conduzida convencionalmente com levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produzindo-se etanol.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo geral, avaliar o potencial da casca de eucalipto para a produção de etanol. Os objetivos específicos foram: a) Avaliar a composição química; b) Desenvolver uma metodologia adequada para extrair os carboidratos solúveis totais (CST); c) Produzir etanol a partir dos CST; d) Avaliar diferentes processos de pré-tratamentos (ácido e alcalino) utilizando planejamento experimental; e) Avaliar o rendimento da hidrólise enzimática; f) Comparar resultados obtidos com o bagaço de cana de açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição química das biomassas lignocelulósicas

Segundo Omachi et al. (2004) a biomassa vegetal é todo material orgânico, não fóssil que tenha conteúdo de energia química no seu interior, isso inclui todas as vegetações aquáticas ou terrestres, árvores, resíduos agrícolas, resíduos agroindustriais, etc. Já o termo resíduo pode ser definido como aquilo que sobra de um processo de produção ou exploração, de transformação ou utilização (QUIRINO, 2002).

A biomassa lignocelulósica representa a fração mais significativa da biomassa vegetal, e compõem a maior fonte de compostos orgânicos da biofera (LEE, 1997). A biomassa lignocelulósica, geralmente contém 30-45% de celulose, 25-30% de hemiceluloses e 25-30% de lignina. Os três principais componentes juntos representam mais de 90% da massa seca da biomassa (PANDEY et al., 2000). Além destes componentes são encontrados compostos inorgânicos (cinzas), pectinas, proteínas, carboidratos solúveis, terpenos, alcalóides, saponinas, polifenóis, gomas, gorduras, entre outros (KHUAD; SINGH, 1993; MOHAN et al., 2006).

A composição química da biomassa lignocelulósica varia muito em função do tipo de material, como se observa na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química dos materiais lignocelulósicos (valores expressos em porcentagem de matéria seca)

<i>Componentes (% MS)</i>	Material lignocelulósico			
	Bagaço de cana	Resíduo de milho^a	Palha de trigo	Eucalipto^b
Celulose	39,01	37,69	32,64	48,07
Xilanas	22,05	21,61	19,22	10,42
Arabinanas	2,06	2,42	2,35	0,3
Mananas	0,35	0,38	0,31	1,23
Galactanas	0,46	0,87	0,75	0,74
Lignina	23,09	18,59	16,85	26,91
Ácidos Urônicos	2,16	2,99	2,24	4,07
Cinzas	3,66	10,06	10,22	1,22
Extrativos	3,78	5,61	12,95	4,15

^a resíduo de milho (palha e sabugo)

^b madeira de eucalipto (xilema)

Fonte: Carroll; Somerville, 2009.

Na avaliação da composição química das madeiras de espécies arbóreas (folhosas e coníferas), os principais componentes podem variar significativamente, como mostra a Tabela 2. Por exemplo, altos níveis de carboidratos hemicelulósicos (arabinose, galactose e manose) são encontrados em madeiras de coníferas ou “softwood”. Já na madeira das folhosas ou “hardwood” encontra-se principalmente xilose (HARKIN; ROWE, 1971; GOLDSTEIN, 1981; COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993).

A composição química também pode variar significativamente entre os tecidos. Na Tabela 2 pode-se observar que a madeira (tecido xilemático) das folhosas e coníferas contém mais ácidos urônicos do que as respectivas cascas (tecido floemático). A casca apresenta também maiores conteúdos de extrativos e cinzas (minerais). Segundo Fengel e Wegener (1989), quimicamente as cascas se diferenciam das madeiras principalmente pelos altos teores de extrativos e minerais. Bragatto et al (2010)¹ (em fase de elaboração), determinaram a composição química dos diferentes tecidos que compõem o caule de plantas de tabaco, e observaram que o tecido xilemático contém quase 10 vezes mais xilose que tecido medular. O tecido xilemático é composto predominantemente por células fibrosas com parede celular secundária rica em cadeias de xilanas.

Tabela 2 - Composição química da madeira e casca de espécies folhosas e coníferas (valores expressos em porcentagem de matéria seca)

<i>Componentes (% MS)</i>	Folhosas		Coníferas	
	<i>Madeira</i>	<i>Casca</i>	<i>Madeira</i>	<i>Casca</i>
Glicose	55-73	53-65	61-65	57-63
Xilose	20-39	18-36	9-13	11-15
Manose	0,4-4	0,3-3	7-16	6-16
Galactose	1-4	1-6	6-17	1-5
Arabinose	<1	2-8	<3,5	4-11
Rhamnose	<1	<1	<1	<1
Lignina	18-25	40-50	25-30	40-55
Ácidos Urônicos	4-7	--	4-7	--
Cinzas	0,2-0,6	acima de 20	0,2-0,6	acima de 20
Extrativos	2-5	5-10	2-9	2-25

Fonte: GOLDSTEIN (1981); HARKIN; ROWE (1971)

¹Bragatto, J.; Defavari do Nascimento, D.; Labate C.A. (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo). **Cell wall polysaccharides composition in different tissues of *Nicotiana tabacum* L.**

Do ponto de vista tecnológico, os carboidratos contidos na parede celular na forma de frações celulósicas (glicose) e hemicelulósicas (fucose, arabinose, galactose, glicose, xilose e manose) representam os substratos que podem ser convertidos em bioprodutos. Entretanto, a complexidade das interligações das três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) na estrutura da parede celular, é o principal desafio na recuperação dos carboidratos (monômeros) com elevado grau de pureza (SUN; CHENG, 2002).

2.2 Arquitetura da parede celular

A parede celular é uma das principais estruturas que distingue a célula vegetal da célula animal. É formada por agrupamentos de macromoléculas de natureza heterogênea, com composição química muito diversificada (Figura 1). A íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros (SUN; CHENG, 2002). Além dos polissacarídeos existem também pequenas quantidades de proteínas e substâncias fenólicas (lignina). As proporções destes componentes químicos na parede celular variam de espécie para espécie e também sofrem significativas alterações durante o ciclo de vida de uma planta (RAVEN et al., 2001). A parede celular é uma estrutura muito complexa possuindo diversas funções. Proporciona às células rigidez mecânica, mantém a sua morfologia, controla a expansão celular e transporte intercelular, protege a célula contra uma grande quantidade de organismos potencialmente patogênicos e predadores (BRETT; WALDRON, 1990; GIBEAUT; CARPITA, 1994; DHUGGA, 2001; RAVEN et al., 2001).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões distintas, a lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é a região de intersecção entre duas células. Esta camada intercelular é rica em substâncias pécticas mergulhadas em um meio aquoso (RAVEN et al., 2001). A parede primária de grande parte dos vegetais é composta por estruturas independentes; as microfibrilas de celulose (~30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (~30%), as pectinas (~30%) e as proteínas estruturais (~10%). Este tipo de parede é produzido por células em expansão podendo assim, se alongar com crescimento difuso ou orientado (HAYASHI, 1989; McCANN; ROBERTS, 1991; CARPITA; GIBEAUT, 1993; RAVEN et al., 2001).

Figura 1 – Arquitetura da parede celular vegetal (adaptado; RITTER, 2008)

Os polissacarídeos da parede celular estão localizados em duas interfases, a microfibrilar e a matricial. A microfibrilar distingue-se da matricial pelo alto grau de cristalinidade e por possuir composição química homogênea. Esta estrutura é constituída basicamente de microfibrilas de celulose, normalmente arranjadas em padrão helicoidal, ordenadas em estruturas longas e finas, unidas por pontes de hidrogênio (Figura 1) (ROLAND et al., 1992). Juntamente ao longo das microfibrilas de celulose estão os polissacarídeos não-celulósicos ou hemicelulósicos, localizados em zonas amorfas sem orientação regular (Figura 1). A fase matricial consiste de polissacarídeos, compostos pécticos, glicoproteínas e substâncias fenólicas. A composição desta estrutura varia em função das camadas da parede celular, tipos de células e fases do ciclo celular (CARPITA; GIBEAUT, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Quando o crescimento celular é finalizado, inicia-se o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária. A transição da parede celular primária para a parede secundária é marcada pela redução da síntese de pectina e um aumento significativo da síntese de celulose, hemiceluloses e lignina (RAVEN et al., 2001). O processo de lignificação da parede é a fase final da diferenciação celular, onde a lignina depositada estabelece ligações cruzadas com a matriz de carboidratos, formando o chamado complexo lignina-carboidratos

(LCC) (SARKANEN, 1998; LAWOKO et al., 2005; 2006). A lignificação da parede celular tem início na região da parede celular primária e se estende em dois sentidos, para o exterior em direção à lamela média, ou para o interior da célula, onde se desenvolve a parede secundária (TAIZ; ZEIGER, 2004). Células com parede celular secundária são muito rígidas, como é o caso das fibras e elementos vasculares, e são extremamente importantes para a sustentação do vegetal, atuando no suporte e condução de água e outros fluídos na planta (HOPKINS, 1995).

A parede celular secundária contém tipicamente três camadas distintas, S_1 , S_2 e S_3 , as quais são diferenciadas, em espessura, composição e orientação das microfibrilas de celulose. A camada exterior S_1 é a mais fina (0,1-0,35 μm) e representa apenas 5-10 % da espessura total da parede celular. Nesta camada as microfibrilas de celulose formam um ângulo de 60-80° em relação ao eixo da célula. A camada intermediária S_2 é a mais espessa (1-10 μm) e representa 75-85 % da espessura total da parede celular, e a orientação das microfibrilas forma um ângulo de 5-30° em relação ao eixo da célula. As características relacionadas à espessura e à orientação das microfibrilas influenciam diretamente as propriedades físicas e mecânicas da célula. Assim, a camada S_2 é a mais importante na parede celular. Já a camada S_3 é relativamente fina (0,5-1 μm), e forma um ângulo de 60-90° em relação ao eixo da célula (FENGEL; WEGENER, 1989; EMONS; MULDER, 2000; PLOMION et al., 2001; MELLEROWICZ, et al., 2001). A camada S_3 e parte interior da S_2 têm um conteúdo de celulose mais elevado, enquanto a camada S_1 e a parte exterior da camada S_2 são relativamente ricas em hemiceluloses (SELVENDRAN, 1983; TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.2.1 Celulose

A celulose encontrada na parede celular das plantas é a biomolécula mais abundante na natureza. Todos os anos as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007). Em geral, a parede primária contém de 10 a 40% de celulose e a secundária aproximadamente 40 a 60% (McNEIL et al., 1984; BACIC et al., 1988). Na célula, a celulose é produzida na forma de microfibrilas de celulose (semi)-cristalina agrupadas em cadeias lineares de β -(1 $\rightarrow$ 4) D-glicose ligadas por pontes de hidrogênio (DELMER, 1999). Cada microfibrila de celulose consiste de aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e promovem o suporte e resistência à parede celular (FRY, 1988; EMONS; MULDER, 2000; EMONS et al.,

2002). Na estrutura microfibrilar da celulose existe diferentes graus de ordenação, desde regiões cristalinas muito ordenadas a regiões de menor ordenação (amorfias). A cristalinidade é resultado da linearidade das moléculas de celulose, pelas ligações de hidrogênio intermoleculares (DELMER, 1999). As regiões de elevada cristalinidade são pouco acessíveis por solventes e reagentes. Em contrapartida, as regiões relativamente mais desordenadas (amorfias) são mais acessíveis e mais susceptíveis a reagentes químicos.

Figura 2- Estrutura da fração celulósica (adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989)

Na estrutura da celulose, dois monômeros de glicose adjacentes são ligados pela eliminação de uma molécula de água, esta ligação química dá origem à molécula de celubiose, a qual é a unidade repetitiva da celulose. A molécula de celulose pode conter até 10.000 unidades de glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). A celulose quando hidrolisada com ácidos ou enzimas produz exclusivamente monômeros de glicose (KLEMM, 2005) (Figura 2). A glicose pode ser fermentada para produzir etanol ou entrar em uma cadeia reacional industrial e produzir inúmeros compostos, tais como: etileno, buteno, propileno, ácidos acrílicos, poliésteres entre outros (SCHUCHARDT, 2001). Assim, a molécula de celulose tem enorme valor comercial para diversos setores industriais (FRY, 1988; ENGLEHARDT, 1995).

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose, porém com muitas ramificações (cadeias laterais). As cadeias hemicelulósicas são formadas por diversos grupos de polissacarídeos, principalmente pentoses (xilose e arabinose)

(HOLTZAPPLE, 1993). As hemiceluloses estão associadas às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio, e promovem a união das microfibrilas de celulose adjacentes. Esta interação parece estar relacionada com as propriedades mecânicas da parede celular (FRY, 1988; HAYASHI et al., 1987; HAYASHI, 1989; HAYASHI; MACLACHLAN, 1984; WHITNEY et al., 1995, 1999).

O polímero de xilana é o principal componente da fração hemicelulósica das biomassas. Este polímero é constituído por unidades de xilose, e são facilmente hidrolisadas com ácidos minerais (KHUAD; SINGH, 1993). A xilana possui uma estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações β (1-4). Esta hemicelulose faz ligações cruzadas com as microfibrilas de celulose e lignina, formando o complexo lignina-carboidratos (*Lignin-Carbohydrate Complexes-LCC*) (LAWOKO et al, 2005; 2006). As xilanas representam cerca 5% dos componentes da parede primária e 20% da parede secundária. (HATFIELD et al., 1999; AWANO et al., 2001). Nas cadeias de xilanas ocorrem substituições em algumas ramificações com grupos de 4-O-metilglucurônico, ácido glucurônico, acetil e arabinose (FRY, 1988; GRUPPEN et al., 1992; EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; O'NEILL; YORK, 2003). A natureza dos grupos substituídos nas cadeias de xilanas depende do material vegetal. Os grupamentos com carboidratos (arabinose) são preferencialmente encontrados em madeiras de coníferas e nas madeiras de folhosas são encontrados principalmente grupos de ácidos urônicos (glucurônico) (COUGHLAN; HAZLEWOOD, 1993).

As cadeias de hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida se comparado com a celulose. Os polímeros hemicelulósicos oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais, isso se deve ao caráter amorfo destas estruturas (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2.3 Lignina

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na superfície terrestre, é superado apenas pela celulose. Tem papel fundamental na estrutura dos materiais lignocelulósicos, representando cerca de 15 a 35% de seu peso seco. A lignina é um complexo polimérico com caráter fenólico formando uma estrutura rígida e hidrofóbica, estas características são importantes para o suporte mecânico, e provavelmente permitiram uma melhor adaptação das plantas superiores. A complexidade deste polímero na célula permitiu a alta eficiência na condução de água da base até o topo das grandes plantas vasculares e também na defesa contra patógenos. A

distribuição do conteúdo de lignina é diferente para cada região da célula, sendo que a maior concentração da lignina está localizada na região da lamela média (intersecção entre duas células). A deposição dos monômeros de lignina na parede celular vai depender da espécie vegetal, tipo de célula e estágio do desenvolvimento do tecido (FRY, 1988; TERASHIMA et al., 1993; RAVEN et al., 2001).

Figura 3- Esquema estrutural para a lignina da madeira moída de *E. grandis* (a); estruturas dos álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G),iringila (S) e *p*-hidroxifenila (H) (b). Piló-Veloso et al., (1993)

A lignina é um biopolímero complexo, com estrutura de natureza aromática e alto peso molecular, é composta por várias combinações de três tipos de ligninas, a lignina *p*-hidroxi-fenila (H), lignina guaiacila (G) e siringila (S), tendo como precursores os três álcoois do tipo fenilpropanóides (*p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico), respectivamente (Figura 3b) (FENGEL; WEGENER, 1989). As unidades G e S são precursoras da lignina encontrada em madeiras de folhosas, já a lignina das coníferas é formada por unidades G (CHEN, 1991).

A solubilidade da lignina em meios ácidos, neutros ou alcalinos depende dos precursores da lignina (GRABBER, 2005). Embora, alguns autores já tenham observado que o grau de solubilidade da lignina varia muito em função do tipo de material lignocelulósico e também das

condições hidrolíticas empregadas (FRAZER; MCCASKEY, 1989; SILVA et al., 1998a). No complexo polimérico da lignina ocorre uma variedade de ligações, incluindo éster, éter e carbono-carbono. A ligação éter é dominante, representando aproximadamente 2/3 das ligações, o restante das ligações são do tipo carbono-carbono e éster (BOLWELL, 1993; SJÖSTRÖM, 1993; BOUDET, 2003; BOERJAN et al., 2003). Como resultado destas ligações, ocorre a formação de uma complexa rede tridimensional hidrofóbica, com importantes ligações covalentes e não covalentes com a celulose e as hemiceluloses, em particular com as cadeias de xilanas (LAWOKO et al., 2005; 2006).

Nos últimos anos a lignina foi exaustivamente estudada, mas a sua estrutura ainda não foi completamente determinada, o que se deve principalmente a sua complexa rede estrutural em determinados vegetais. Piló-Veloso et al. (1993), propuseram um esquema estrutural para a lignina da madeira moída de *Eucalyptus grandis* (Figura 3a).

2.2.4 Extrativos e outros componentes

Os extrativos são uma fração significativa dos compostos químicos existentes nos materiais lignocelulósicos. Estas substâncias podem ser extraídas utilizando-se diversos solventes, e em alguns casos, os extrativos são classificados pelo tipo de solvente empregado para extraí-los (ROWELL et al., 2005). Os extrativos são substâncias orgânicas extrínsecas, ou seja, não fazem parte da parede celular. A concentração e o tipo de extrativo encontrado nas espécies vegetais varia significativamente, por exemplo, nas madeiras de folhosas são encontrados de 3 a 10% e nas coníferas de 5 a 8% (D'ALMEIDA, 1998). As quantidades também variam bastante nos diferentes tecidos do corpo vegetal. Assim, a casca da maioria das espécies arbóreas contém maiores concentrações de extrativos do que a madeira (xilema) (Tabela 2). A quantidade e a qualidade dos extrativos pode influenciar na escolha do material lignocelulósico para determinados fins. Por exemplo, os extrativos coloridos (valor estético), os voláteis (repelentes de fungos e insetos) e os com altos teores de taninos e resinas (interferem na produção da polpa celulósica) (ROWELL et al., 2005).

Os principais extrativos da casca são caracterizados como compostos polifenólicos poliméricos (taninos, ácidos fenólicos, etc.), incluindo também ceras, quercitinas e flavonóides e açúcares solúveis (FENGEL; WEGENER, 1989). Assim, os extrativos apresentam inúmeras utilidades para o setor industrial (SCHUCHARDT et al, 2001).

As cinzas também são encontradas em grande quantidade nos materiais lignocelulósicos, mas também não pertencem a arquitetura da parede celular. Compostos inorgânicos (cinzas) são encontrados na forma de sais, sendo os mais significativos os compostos de silício, cálcio e magnésio (RAMOS, 2003). Nas cascas de árvores, a grande quantidade de minerais pode resultar no acúmulo de cristais de oxalato ou carbonatos de cálcio ou magnésio (FOELKEL, 2010).

2.3 Biomassa residual e energia

2.3.1 Setor florestal e produção de celulose

Os plantios de florestas comerciais no Brasil cobrem uma área de 6,31 milhões de hectares. O eucalipto é a espécie mais plantada, com 4,51 milhões de hectares, e o restante é de árvores de pinus com 1,79 milhões de hectares plantados (ABRAF, 2010). De acordo com o anuário estatístico de 2009 da ABRAF, o plantio de eucalipto aumentou 30% no período de 2005 à 2009 (ABRAF, 2010). Grande parte das florestas plantadas de eucalipto (1,6 milhões de hectares) é dedicada ao setor de celulose e papel. O Brasil conta com 220 empresas de celulose e papel utilizando somente madeira de reflorestamento com espécies de eucalipto e pinus (ABRAF, 2010). O estado de São Paulo concentra 30% das indústrias do setor de celulose e papel. Este estado também tem a segunda maior área de eucaliptos plantados do território brasileiro, com 22,8% do total (ABRAF, 2010).

Em 2009 foram consumidos aproximadamente 162,6 milhões m³ (81,3 milhões de toneladas) de toras de florestas plantadas. Deste total, 68,4% referem-se ao consumo de eucalipto e 31,6% de pinus. O segmento de celulose e papel foi o principal consumidor, absorvendo cerca de 37,3% das toras produzidas, o que corresponde a 30,32 milhões de toneladas de madeira.

As crescentes produções de madeira e os avanços tecnológicos na fabricação de celulose e papel colocaram o Brasil no 4º lugar na produção mundial de celulose (13,496 milhões de toneladas/ano) e a 11ª posição mundial na produção de papel (9,368 milhões de toneladas/ano), no ano de 2009 (BRACELPA, 2010). Segundo a Bracelpa, os indicadores econômicos do setor mostram o surgimento de um novo ciclo de investimentos com aportes financeiros da ordem de US\$ 20 bilhões até 2017. Assim, com as instalações de novas indústrias a capacidade de produção de celulose pode superar 20 milhões de toneladas anuais, o que colocaria o Brasil em patamares semelhantes à atual produção de canadenses e chineses (BRACELPA, 2009).

2.3.2 Produção de celulose e geração de cascas

Definem-se como resíduos das indústrias de base florestal as sobras que ocorrem no processamento mecânico, físico ou químico da madeira, e que não são incorporadas ao produto final. Estes resíduos contêm alto percentual de matéria orgânica e alto potencial energético. Na produção de celulose há a geração de vários resíduos ao longo do processo, tais como; cascas, a lama de cal, o lodo biológico, o resíduo celulósico e as cinzas de caldeira. Estima-se que para cada tonelada de celulose produzida 480kg de resíduos são gerados (STEINER et al., 1990). Steiner et al. (1990) cita que, a maior parte dos resíduos sólidos nos pátios industriais do setor de celulose e papel é composto por cascas. Segundo Foelkel (2010), para cada mil toneladas de celulose produzida são geradas aproximadamente 150 toneladas de cascas secas. Geralmente, a casca da árvore precisa ser retirada para a utilização da madeira. A operação de descascamento pode ser necessária conforme a utilização da madeira (tora), podendo ser realizada para a extração da celulose, fabricação de chapas, aglomerados e laminados. O descascamento mecânico pode ser feito tanto no campo como no pátio da indústria. Quando realizado no pátio da fábrica (descascadores fixos) visa geralmente à utilização da casca para a geração de energia (vapor) ou outros produtos (fertilizantes orgânicos ou terra para vasos) (ZOETTL, 1980; FOELKEL, 2010). Quando o descascamento for processado no campo (*harvesters*), um dos principais objetivos é diminuir a exportação de matéria orgânica e de nutrientes. Este procedimento devolve ao solo uma carga significativa de matéria orgânica, a qual, mineralizada contribui com os macros e micros nutrientes na recuperação do solo (ANDRADE, 1989). Embora, Zoettl (1980), considere um problema deixar a casca no campo, uma vez que contém compostos orgânicos que podem ser tóxicos ou atuar como inibidores de crescimento para as rotações seguintes. Desta maneira, Campos e Graça (1986), afirmam que o emprego dos resíduos florestais para a geração de novos produtos com valor comercial agregado, pode se apresentar economicamente viável, compensando inclusive a reposição de nutrientes através da adubação química. Seixas e colaboradores (2005) verificaram que as principais empresas que utilizam madeira no estado de São Paulo (Duratex, Ripasa, VCP, International Paper e Suzano), têm 56% de suas práticas de descascamento no campo e 36% no pátio da fábrica, sendo que os 8% restantes não necessitam de descascamento. Com o objetivo de agregar valor as cascas de eucalipto, a empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose) estabeleceu uma parceria com a Eucabraz Produtos de Eucalipto LTDA. A Eucabraz retira as cascas de eucalipto do pátio de rejeitos da indústria e transforma-as em

briquetes. Neste caso, o processamento anual ultrapassa as 4000 mil toneladas de casca (VIEIRA, 2005).

Os dados sobre a quantidade de casca nas árvores ou nas madeiras coletadas se aproximam de uma faixa de 9-20% em peso. Ainda que, o conteúdo de casca nas madeiras relatados na literatura apresente significativas diferenças. Para Foelkel (2010), os clones comerciais de eucalipto melhorados geneticamente para altos incrementos volumétricos apresentam de 9 a 12% de casca em volume. Segundo Husch et al. (1972) o volume de casca é de 10 a 20% do volume comercial coletado. Miranda et al. (2002), encontraram 10,1% do volume em casca, para os híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* com 9 anos. Seixas et al. (2005) determinaram um volume de 14,4% de casca para as árvores de *E. grandis* com 7 anos de idade. Segundo Yadav et al. (2002), de 15 a 20% da madeira coletada para a produção de celulose é composta por casca.

Para se produzir uma tonelada de celulose são necessárias duas toneladas de toras de madeira, com aproximadamente 12% em casca. Assim, no ano de 2009 foram gerados aproximadamente 3,24 milhões de toneladas de casca. A Figura 4 apresenta a evolução histórica (2000-2009) da produção de celulose no Brasil, bem como a estimativa da geração de cascas.

Figura 4 - Evolução da produção anual de celulose e casca (resíduo) no Brasil (2000-2009)

2.4 Propriedades da casca

2.4.1 Propriedades fisiológicas

A casca é de grande importância para a árvore, pois é o tecido que protege o xilema contra danos mecânicos e o preserva contra ações do ambiente. Entre 10 e 15% do peso da madeira é composta por casca (SJOSTROM, 1993).

É também através deste tecido que a seiva orgânica rica em nutrientes se transloca através do caule da planta. A seiva orgânica é composta de açúcares (sacarose, frutose, glicose, manitol e sorbitol), proteínas, extrativos, ácidos graxos, aminoácidos, e nutrientes minerais (cálcio, potássio, ferro, manganês, magnésio, fósforo, etc.) (HARKIN; ROWE, 1971; FOELKEL, 2010). O transporte das substâncias orgânicas e minerais é realizado pelo tecido denominado floema, presente na casca interna (mais próximo do câmbio vascular). O tecido floemático da casca possui tanto células vivas como células mortas (FOELKEL, 2010).

2.4.2 Propriedades anatômicas

A casca é um material com estrutura anatômica muito heterogênea, pois é constituída de muitos tipos de células e diferentes tecidos (Figura 5).

Figura 5 – Tecidos que compõem o tronco de uma árvore. (A) Esquema dos tecidos que formam a madeira; (B) Esquema do tecido casca (adaptado: The Columbia Encyclopedia, 2008)

O três principais tipos de células presentes nas cascas de eucalipto são: fibras do floema, células crivadas e células do parênquima floemático. As fibras do floema são lignificadas e as células crivadas e parenquimáticas são pouco lignificadas sendo constituída de parede celular primária espessa (MATSUSHITA et al., 2009).

Nas cascas são encontrados tipicamente dois tipos básicos de tecidos. O tecido da casca interna, a qual se localiza entre o câmbio vascular e o felogênio (câmbio da casca), é constituído por floema secundário, incluindo fibras e parênquima (radial e longitudinal) (Figura 5). A casca externa ou ritidoma é constituída por camadas de células suberificadas (peridermes) intercaladas com camadas de floema secundário morto (APPEZZATO; GUERREIRO, 2003) (Figura 5).

A formação do tecido casca tem como origem o mesmo local do tecido xilemático. Assim, o cambio vascular produz aproximadamente nove células para o interior do caule, as quais irão formar o tecido xilemático (madeira), e uma célula para exterior, onde será formado o tecido floemático (casca). O câmbio vascular apresenta dois tipos principais de células geradoras: as fusiformes iniciais e as iniciais do raio. As células fusiformes dão origem às células alongadas do floema (elementos de tubos crivados, fibras de floema, parênquima axial do floema). Os elementos de tubos crivados são muito importantes na casca, pelas suas características de tecidos vasculares (transporte de seiva) (APPEZZATO; GUERREIRO, 2003). Já, as células iniciais do raio dão origem às células do parênquima, a qual no tecido floemático secundário possuem duas funções: transporte radial e armazenamento de substâncias químicas (APPEZZATO; GUERREIRO, 2003; FOELKEL, 2010).

As fibras floemáticas podem ocorrer em feixes bem ordenados ou distribuídos na área da casca interna (Figura 5). Igualmente as fibras no xilema, sua principal função esta ligada à sustentação da estrutura do tecido da casca (BURGER; RICHTER, 1991). Estas fibras também têm parede celular secundária espessa, rica em celulose, hemicelulose e lignina.

As cascas típicas de *Eucalyptus spp.* podem conter cerca de 25 a 45% de elementos fibrosos (fibras de floema e tubos crivados), 40 a 60% de parênquima e raios de 2 a 15% de esclereídes (ANGYLOSSI-ALFONSO, 1987). As cascas de eucalipto apresentam baixo teor de fibras, alto teor de células pequenas e células de parênquima, denominadas genericamente de finos. Os esclereídes são em geral células com parede celular finas e muitas vezes deformadas (FOELKEL, 2010)

2.4.3 Propriedades químicas

As cascas das espécies arbóreas, tais como as do eucalipto contém inúmeros componentes químicos não estruturais (açúcares, ceras, óleos, resinas, minerais, etc). Os componentes estruturais são bastante semelhantes aos encontrados em outros materiais lignocelulósicos (ex: xilema de arbóreas e bagaço de cana). Estes materiais são constituídos basicamente por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Da mesma forma que na madeira a celulose da casca é um polímero linear, que quando hidrolisada produz exclusivamente monômeros de D-glicose (KLEMM et al, 2005). As hemiceluloses são formadas por diversos grupos de polissacarídeos (arabinanas, galactanas, mananas e ramnanas), em especial as xilanas que na hidrólise completa produz D-xilose (RAGAUSKAS et al., 2006; AWANO et al., 2001). A lignina segundo biopolímero natural mais abundante tem estrutura tridimensional com caráter fenólico (fenilpropanos) (DAVIN; LEWIS, 2005).

A composição química da casca é mais complexa se comparado à madeira, pois este tecido contém uma grande variedade de produtos químicos, sendo que a maioria é potencialmente explorável. Em geral, a exploração da composição química se faz à partir dos mesmos métodos utilizados para a madeira (BROWNING, 1963).

As cascas de eucalipto têm alto teor de sais minerais (cálcio, nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio), variando de 3 a 10% do peso seco. O cálcio (Ca) é o nutriente em maior proporção, (LADEIRA, 1999; BELLOTE et al, 1980). Estes altos teores de cinzas nas cascas causam sérios problemas para indústria que utiliza esta biomassa para queima direta. As cinzas obstruem o fluxo de ar comburente nas grelhas e reagem quimicamente com refratários (WEBER, 1987; FOLKEL, 2010).

2.5 Bagaço de cana de açúcar

Além das cascas de eucalipto, outro resíduo abundante da agroindústria brasileira é o bagaço de cana de açúcar. As pesquisas no Brasil voltadas para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica residual, são quase que exclusivamente para o bagaço de cana de açúcar. O Brasil processou na safra 2008/2009 mais de 569 milhões de toneladas de cana de açúcar, gerando aproximadamente 136 milhões de toneladas de bagaço (UNICA, 2010). O bagaço é caracterizado como um subproduto fibroso do processo de extração do caldo da cana de açúcar para a fabricação de açúcar ou álcool. Assim, estima-se que para cada tonelada de cana moída aproximadamente 240 kg seja bagaço (MANZANO et al., 2000; FERRARI, 2002). Souza

(2003) destaca que o bagaço da cana-de-açúcar é considerado o maior dejetado da agroindústria nacional e seu aproveitamento industrial vai desde composto para ração animal, fertilizante, biogás, matéria-prima para compensados até para a indústria química em geral.

Os componentes químicos da parede celular das fibras do bagaço variam de acordo com diversos fatores, dentre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio, mas em média a composição química do bagaço pode ser caracterizada por lignina (25%), celulose (50%) e hemicelulose (25%) (VILLAVICENCIO, 1974; PANDEY et al., 2000). Aguiar (2002) estudou a transformação do bagaço da cana em açúcares fermentescíveis pelo processo de hidrólise e concluiu ser possível obter até 60% de conversão. Uma das grandes dificuldades encontradas para fermentar os açúcares encontrados no hidrolisado lignocelulósico é a presença de inibidores do metabolismo microbiano, tais como: furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e também compostos aromáticos derivados da degradação da lignina e extrativos (RODRIGUES et al., 2001; MUSSATO; ROBERTO, 2004).

2.6 Biomassa lignocelulósica como fonte para a produção de etanol de segunda geração (E2G)

O aproveitamento dos resíduos florestais e agro-industriais como substratos em processos biotecnológicos para a produção de produtos de alto valor agregado é uma alternativa atrativa e promissora, haja visto que estes materiais são abundantes, renováveis e de baixo custo.

Nas últimas duas décadas vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de converter materiais lignocelulósicos em etanol (AZZAM, 1989; DALE et al., 1994; DUFF; MURRAY, 1996; MARTIN et al., 2002; RESHAMWALA et al., 1995; YANASE et al., 2005). Dentre as diferentes biomassas que compõem os materiais lignocelulósicos os resíduos de eucalipto são fontes promissoras para produção de biocombustíveis, uma vez que se constituem em resíduo florestal abundante, renovável e de baixo custo (PARAJÓ et al., 1998; CANETTIETI et al., 2001). Muitos outros resíduos agro-industriais lignocelulósicos já foram estudados, tais como: o bagaço da cana de açúcar (SANTOS E GOUVEIA 2009), palha de arroz (SILVA; ROBERTO, 2001), palha de trigo (NIGAM, 1995).

As espécies de *Miscanthus*, um tipo de herbácea, vem recebendo grande atenção no campo da bioenergia, pois tem rápido crescimento e grande acúmulo de matéria seca (10-30 toneladas de matéria seca por hectare) (LEWANDOWSKI et al., 2000). Gia-Luen et al. (2008) avaliando o potencial fermentativo dessas espécies, juntamente com o bagaço de cana de açúcar,

verificaram que os conteúdos de xilose produzidos na pré-hidrólise foram muito similares, porém o processo de fermentação sofreu uma redução de 25% para as amostras de bagaço. Gia-Luen et al. (2008) verificaram que o bagaço gerou mais de quatro vezes o conteúdo de furfural e duas vezes o conteúdo de ácido acético. Sabe-se que o ácido acético é gerado no processo de hidrólise a partir dos grupos acetil localizados nas hemiceluloses, principalmente nas xilanas (GIA-LUEN et al., 2008; MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Desta maneira, a bioconversão da celulose contida nos materiais lignocelulósicos em etanol de segunda geração (E2G) requer um processo que compreende três etapas: pré-tratamento, hidrólise (ácida ou enzimática) dos polímeros, seguido do processo fermentativo dos monômeros (glicose) em etanol (LOHMEIER-VOGER et al., 1998). A hidrólise pode ser catalisada por enzimas específicas (celulases) ou por meio químico (ácido minerais) e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias.

Na hidrólise ácida não é necessária uma seleção das características químicas do material lignocelulósico. A metodologia ácida produz altas concentrações de monossacarídeos disponíveis para a fermentação, porém a desvantagem do uso de ácidos minerais (sulfúrico ou clorídrico) está centrada na corrosão de equipamentos e recuperação dos reagentes.

A hidrólise enzimática não utiliza reagentes químicos, e conseqüentemente não gera poluentes ambientais. A desvantagem deste processo envolve a aplicação em escala industrial, pois, são necessários grandes volumes de enzimas, além da baixa eficiência do processo em biomassas *in natura* (sem pré-tratamento) (MATSUSHITA et al, 2009). Desta maneira, a hidrólise enzimática necessita de etapas de pré-tratamento, afim de alterar a biomassa *in natura*, com o objetivo de melhorar o acesso das enzimas.

Outras características que podem influenciar a hidrólise da matriz lignocelulósica são: tamanho da partícula, arranjo molecular das microfibrilas de celulose (cristalino ou amorfo) e conteúdo de hemicelulose e lignina (McMILLAN, 1994). A presença de hemiceluloses e lignina dificulta o acesso das enzimas celulases na superfície da parede celular, reduzindo assim a eficiência de hidrólise.

Embora sejam evidentes os avanços tecnológicos alcançados pelo Brasil, no que tange a produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), poucos foram os investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de etanol de segunda geração (E2G). Se o setor florestal também utilizasse os resíduos do eucalipto como

fonte de carboidratos, seria possível diminuir os custos da produção de celulose, deixando a o setor ainda mais competitivo.

2.7 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Embora a hidrólise final seja a etapa mais importante da conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis, as etapas de pré-tratamento são essenciais para a remoção da lignina e das hemiceluloses. É nesta fase que ocorre também a redução da cristalinidade das microfibrilas de celulose, melhorando assim a eficiência do processo de ataque químico ou enzimático (McMILLAN, 1994). A presença de altas concentrações de lignina e hemiceluloses na matriz lignocelulósica limitam a utilização integral das moléculas de celulose (glicose), logo são necessárias etapas que removam eficientemente estes interferentes.

Figura 6 - Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (HSU et al, 1980)

A Figura 6 apresenta o esquema da desestruturação que sofre a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento. Neste o processo ocorrem alterações na estrutura da parede celular, com significativos aumentos da área superficial da celulose. Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos são mais eficientes e representam as melhores opções para o processo de fracionamento da biomassa lignocelulósica (RAMOS, 2003).

Os pré-tratamentos devem seguir alguns pré-requisitos: i) maximizar a hidrólise enzimática, ii) minimizar a perda de carboidratos fermentescíveis, iii) não requerer a adição de reagentes que possam inibir os microrganismos fermentativos, iv) minimizar o uso de energia, reagentes e equipamentos, e v) permitir a transposição para a escala industrial (LYND et al.,

1996; HOLZTAPPLE; HUMPHREY, 1984; SUN; CHENG, 2002; ZHANG; LYND, 2004; MOSIER et al., 2005).

Vários tipos de pré-tratamentos hidrolíticos já foram desenvolvidos com o objetivo de desestruturar a parede celular. Pré-tratamentos com ácido concentrado (LIAO et al., 2006), ácido diluído (CARA et al., 2008), álcali (CARRILHO et al., 2005), sulfeto de sódio (KAPOOR et al., 2008), clorito de sódio (SUN et al., 2004), explosão a vapor (*SE-steam explosive*) (SUN; CHENG, 2002; OHGREN et al., 2005), explosão da fibra com amônia (*AFEX- ammonia fiber explosion*) (SUN; CHENG, 2002; TEYMOURI et al., 2005), cal (KIM; HOLTZAPPLE, 2005), peróxidos de hidrogênio (MAES; DELCOUR, 2001; RABELO et al., 2008) e solventes orgânicos (XU et al., 2006). Todos estes pré-tratamentos estão sendo usados para remover a lignina e as hemiceluloses, otimizando significativamente o processo de hidrólise.

2.7.1 Pré-tratamentos físicos

Pré-tratamentos puramente físicos também podem ser utilizados para aumentar a reatividade do material lignocelulósico frente às enzimas hidrolíticas. Por exemplo, a moagem do material bruto (redução da granulometria), pode aumentar significativamente a área superficial e também diminuir a cristalinidade da celulose, favorecendo assim o processo de hidrólise. Embora, a moagem de materiais lignocelulósicos envolva equipamentos com alto consumo de energia, sendo assim desfavorável do ponto de vista energético (RIVERS; EMMERT, 1987).

2.7.2 Pré-tratamentos físico-químicos

A explosão a vapor (SE) é um método físico-químico tecnicamente simples e comumente utilizado para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2002; OHGREN et al., 2005; McMILLAN, 1994). Neste método a biomassa é tratada com alta pressão de vapor saturado, este processo faz com que o material lignocelulósico se decomponha, o que aumenta significativamente a superfície de contato. Segundo Sun e Cheng (2002) este processo também causa a degradação das hemiceluloses e alterações na molécula de lignina, aumentando assim o potencial para a hidrólise da celulose. Pode-se adicionar no pré-tratamento de SE alguns catalisadores, tais como; ácido sulfúrico, sulfatos ou até mesmo dióxido de carbono (MORJANOFF; GRAY, 1987).

A explosão da fibra com amônia (AFEX), é outro pré-tratamento muito utilizado para os materiais lignocelulósicos. Neste pré-tratamento, a biomassa é exposta a uma solução de amônia a alta temperatura e pressão. O tratamento com AFEX melhorou significativamente o processo de hidrólise de materiais como, alfafa, trigo, palha (MES-HARTREE et al., 1988), palha de cevada, palha de arroz, milho (VLASENKO et al., 1997), resíduo sólido municipal (HOLTZAPPLE et al., 1992), cavacos de álamo (TENDERDY; NARGY, 1988) e bagaço de cana de açúcar (HOLTZAPPLE et al., 1991).

2.7.3 Pré-tratamentos químicos

Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácidos diluídos (sulfúrico ou clorídrico) é amplamente utilizado (MOISIER et al., 2005). Geralmente os materiais lignocelulósicos submetidos ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído são resíduos da agricultura, tais como: sabugo de milho (LLOYED; WYMAN, 2005), bagaço de cana-de-açúcar (LAVARACK et al., 2002; RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004) e palha de arroz (KARIMI et al., 2006). A aplicação desta metodologia pode melhorar a hidrólise da celulose, alcançando altos conteúdos de glicose para o processo fermentativo (ESTEGHLALIAN et al., 1997; LLOYED; WYMAN, 2005).

Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio alcalino já foi descrito por inúmeros autores (GOULD; FREER, 1984; GOULD, 1984; GOULD, 1985; GOULD, 1985; MAES; DELCOUR, 2001; RABELO et al, 2008). O peróxido de hidrogênio é utilizado na indústria de celulose e papel, é freqüentemente usado no processo de branqueamento da polpa celulósica. A vantagem do uso deste reagente é que não há formação de produtos secundários da reação e conseqüentemente não ocorre a geração de poluentes, pois quase todo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é convertido em oxigênio molecular e água (RABELO et al, 2008).

2.8 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Métodos enzimáticos para a sacarificação da biomassa são comuns, mas cada biomassa necessita de um pré-tratamento adequado (químico, físico ou combinado) (MOISIER et al., 2005). As vantagens da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos são; apresentar especificidade de reação, ausência de reações secundárias e ausência de formação de inibidores fermentativos, este processo também não necessita de altas temperaturas e pressão (BASTOS,

2007). As desvantagens que cercam esta metodologia estão no que concerne a estrutura química das biomassas, como por exemplo, a cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina, o que tornam este tipo de hidrólise um processo lento e pouco econômico (CANETTI, 2004).

Nas etapas de pré-tratamentos ocorrem reações que acarretam alterações na estrutura da parede celular vegetal, favorecendo a acessibilidade das enzimas para a hidrólise da celulose (HIMMEL et al., 2007). Além das etapas de pré-tratamentos outros fatores podem influenciar a hidrólise enzimática tais como; tipo de biomassa e dosagem aplicadas para as enzimas (ESTEGHLALIAN et al., 2001)

O ataque enzimático ocorre com três classes de enzimas (complexo celulolítico): 1) exo-1,4 β -D-glucanases, que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando as celobioses; 2) endo-1,4- β -D-glucanases, que hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória; 3) 1,4- β -D-glucosidases, que promovem a hidrólise da celubiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligosacarídeos. As celulasas, atuam em sinergia para hidrolisar a celulose criando sítios acessíveis umas as outras e aliviando problemas de inibição pelos próprios produtos (ERIKSSON et al., 2002; VIALJAMAE et al., 2003). A maior parte das enzimas envolvidas na hidrólise de carboidratos são proteínas modulares, constituídas por um módulo catalítico e por um módulo de ligação a carboidrato, este último promove o contato entre substrato e módulo catalítico. Entretanto, quando o substrato é um material lignificado, a lignina pode promover intensa adsorção inespecífica das enzimas envolvidas (CANILHA et al., 2010).

2.9 Desafios para a produção de etanol de segunda geração (E2G)

No geral, materiais lignocelulósicos são resistentes à hidrólise direta e requerem etapas de pré-hidrólise, isso pode aumentar significativamente o acesso do ácido ou enzimas no complexo celulósico. Os métodos de pré-tratamentos podem ser classificados em quatro categorias: físicas, químicas, biológicas e combinadas. Os pré-tratamentos são relativamente as etapas mais caras e menos tecnológicas do processo de conversão de biomassas à carboidratos fermentescíveis (LASER et al., 2002). Os elevados custos são devido ao uso de reagentes químicos, que necessitam de reatores com alta resistência a corrosão. Mas inúmeras pesquisas estão voltadas para minimizar estes custos de produção (MOSIER, 2005; WYMAN et al., 2005).

A principal barreira encontrada para a produção do E2G envolve o custo de produção. Um dos fatores importantes na determinação do custo final é o da matéria prima (biomassa). Neste sentido o Brasil larga na frente para o desenvolvimento de um processo viável e comercial de produção de E2G, pois há no território nacional uma quantidade enorme e barata de matérias primas (resíduos lignocelulósicos agroindustriais de diversas naturezas). No Brasil, o preço por tonelada da biomassa pode variar muito em função do frete. Descontando o fator logístico, a tonelada do bagaço de cana seco fique entorno de 5 a 30 reais (UNICA, 2010). Enquanto que nos Estados Unidos a tonelada de biomassa (sabugo de milho) é cotada à aproximadamente 100 reais (DOE, 2010). As projeções do Departamento de Energia dos Estados Unidos (*U.S. Department of Energy*) apontam para o custo da biomassa nos EUA a uma faixa de 60-70 reais a tonelada em 2020 (DOE, 2010).

Portanto, em termos de custo da matéria prima para a produção de E2G, os setores agroindústrias brasileiros apresentam condições muito competitivas se comparados aos custos internacionais, mesmos para os estimados para além de 2020.

No que tange os processos de hidrólise enzimática, os custos dos pré-tratamentos e das enzimas estão estimados em torno de um terço do custo final para a produção do E2G (DOE, 2010). Segundo o Departamento de Energia dos EUA, atualmente o custo da produção do E2G está em torno de 1,2 reais por litro. Após 2010 espera-se uma redução para cerca de 0,56 reais, e após 2020 o preço se reduza para 0,32 reais. Entre os avanços previstos que justificam essas previsões está o desenvolvimento de enzimas e microorganismos para a fermentação simultânea de glicose e xilose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biomassa lignocelulósica

Para o desenvolvimento dos experimentos, as cascas dos clones comerciais de eucalipto (*Eucalyptus grandis x urophylla* e *Eucalyptus grandis*) foram coletadas entre os anos de 2008 a 2010. As coletas foram realizadas na cidade de Itapetininga/SP, onde se localizam as plantações de eucalipto da companhia Suzano de Papel e Celulose.

Com o objetivo de avaliar o potencial da casca de eucalipto para a produção de etanol, todas as análises envolvendo a composição química da parede celular foram conduzidas e comparadas com o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço de cana foi fornecido pela empresa Dedini S/A Indústrias de Base.

3.2 Coleta das cascas de eucalipto

3.2.1 Painéis de casca

As cascas de eucalipto foram retiradas das árvores na forma de painel (5 painéis por clone comercial) na altura do DAP (1,3m) (Figura 7). Foram coletadas as cascas de dois clones comerciais de *E. grandis* (EG1 e EG2) e de três híbridos *E. grandis x E.urophylla* (HGU1, HGU2 e HGU3).

Figura 7 - Coleta das cascas de eucalipto; (a) vista frontal dos painéis abertos nas árvores de eucalipto; (b) árvore de eucalipto com painel de casca retirado; (c) casca dos clones comerciais coletados

3.2.2 Resíduos deixados no campo

A coleta na forma de resíduo foi realizada após a colheita e descascamento mecanizado da madeira (*harvesters*). Foram coletados aproximadamente 100 Kg de cascas de eucalipto (HGU2 e EG2).

3.3 Preparo da biomassa lignocelulósica para procedimentos analíticos

3.3.1 Secagem e teor de umidade

Os materiais lignocelulósicos amostrados (cascas de eucalipto e bagaço de cana), foram secos ao ar livre durante três semanas, e para uma completa remoção da água foram mantidos por mais três dias em estufa com circulação de ar (45°C). Após a secagem os materiais foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em ambiente desprovido de umidade. O teor de umidade do material foi determinado utilizando a estufa (104°C) (SLUITER et al., 2005)

3.3.2 Cavaqueamento e moagem das cascas

Ao término do processo de secagem, o bagaço e uma parte das cascas foram moídos em moinho tipo wiley, com seleção da serragem em peneiras de 40 e 60 *mesh* utilizando agitador granulométrico eletromagnético de acordo com as metodologias ASTM E 1757-01 (2001) e TAPPI T264 (1999). A outra parte das cascas foi manualmente cavaqueada em dimensões médias de (80 x 30 mm). Novamente as amostras de casca de eucalipto (cavacos e serragem) e bagaço foram armazenadas em sacos plásticos para futuras análises.

3.4 Composição química dos materiais lignocelulósicos

3.4.1 Determinação dos extrativos

Aproximadamente 1g das serragens das cascas e do bagaço foram colocadas em saquinhos de papel de filtro e transferidas para uma plataforma de extração *Soxhlet* (Marconi). A remoção dos extrativos foi realizada em três etapas. A primeira, com uma mistura de toluol/etanol 2:1 (v/v) durante 4 horas, em seguida uma extração com etanol 99 GL° por mais 4 horas, e finalizando com água quente (100°C) por uma hora. Após as etapas de extração o resíduo foi pesado e a quantidade de extrativo foi determinada por análise gravimétrica. A metodologia adotada para esta etapa segue as normas (ASTM E 1690-01, 2001; TAPPI T 264 om-88, 1999).

3.4.2 Determinação das cinzas

Aproximadamente 1g das serragens das cascas de eucalipto e do bagaço foram colocadas em cadinhos de porcelana (tarados) e incubados em mufla à 600°C durante 6 horas. Após este período os cadinhos foram resfriados e a quantidade de cinza foi determinado gravimetricamente. Esta metodologia foi realizada de acordo com a norma ASTM E 1755-01 (2001).

3.4.3 Determinação dos carboidratos estruturais (parede celular)

A serragem das cascas de eucalipto e do bagaço de cana livre de extrativos foram utilizadas para a determinação dos principais componentes da parede celular (celulose, hemiceluloses e lignina). Para determinação destes componentes foi desenvolvido o procedimento de hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L) dos carboidratos de acordo com a metodologia descrita por Effland (1977), juntamente com a norma ASTM E 1758-01 (2001). O ácido sulfúrico utilizado nos experimentos, foi cuidadosamente padronizado (24 N, densidade de $1,6338\text{g/cm}^3$ à temperatura de 10°C) de acordo com as normas TAPPI T222 om-88 (1998).

Em tubos de 30 mL, pesou-se aproximadamente 100 mg de matéria seca (triplicata) das serragens (casca e bagaço). Foram adicionados 1 mL de H_2SO_4 (12 mol/L) e levadas ao banho-maria (30°C) por 1 hora, sob agitação com bastão de vidro em intervalos de 15 minutos. Após este período adicionou-se 28 mL de água ultrapura. As amostras foram submetidas a um processo de autoclavagem (120°C , 15 psi) por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo, para completa paralisação do processo de hidrólise. O resíduo proveniente do processo de autoclavagem foi filtrado com membrana de microfibras de vidro GF-1 (47 mm) (Macherey-Nagel) acoplada ao copo de filtração (placa porosa), e com auxílio de uma bomba de vácuo. O filtrado foi avolumado com água ultrapura para 200 mL. Após a hidrólise ácida o hidrolisado (filtrado) foi utilizado para a determinação da composição dos carboidratos estruturais (fucose, arabinose, ramnose, galactose, glicose e xilose) via HPAE-PAD (*High Performance Anion Exchange – Pulsed Amperometric Detection*) (FARDIM; DURÁN, 2001; ASTM E 1758-01, 2001).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construídas com os referidos padrões: L- fucose, L-arabinose, L-rhamnose, D-galactose, D-glicose e D-xilose, todos da Sigma®. As determinações foram realizadas no equipamento ICS 2500, HPAE-PAD Dionex® equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste foi 5mM de NaOH e o eluente de limpeza 200mM de NaOH com fluxo de $0,25\text{ mL min}^{-1}$, e pressão no sistema de aproximadamente 1500 psi. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex® CarboPac PA1 (4 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA10 (4 x 50mm), e o detector amperométrico associado ao eletrôdo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100mV (0 a 200ms), +100mV de integração (200 a 400ms), -2000mV (410 a 420ms), +600mV (430ms) e -100mV (440 a 500ms).

3.4.4 Determinação das ligninas (insolúvel e solúvel)

As ligninas, insolúvel e solúvel foram determinadas por método gravimétrico e via espectrofotômetro, respectivamente. O resíduo proveniente da filtragem do item 3.4.3, ou seja, a fração residual retida na membrana foi determinada como lignina insolúvel (ASTM D 1106-96, 2001). A lignina solúvel foi determinada no filtrado por espectrofotometria (GOLDSCHMIDT, 1971).

3.5 Composição dos carboidratos no macerado de fibras

Para a obtenção do macerado de fibras das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana, adotou-se o método de Franklin (1937). Essa metodologia utiliza agentes químicos que removem a lamela média (região de união entre as células), mas mantêm a integridade das fibras, separando as fibras de outras estruturas celulares.

As cascas de eucalipto e bagaço foram cortadas manualmente na forma de palitos (2 x 2 x 30mm) de largura, espessura e comprimento, respectivamente. Os palitos foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada. Após a remoção da água, adicionou-se uma solução de ácido acético glacial (8,74 mol/L) e peróxido de hidrogênio (21,61 mol/L). As amostras foram incubadas em banho-maria (60°C) por 48 horas. Em seguida, removeu-se a solução (reagente) utilizada na maceração, e o material fibroso foi lavado cinco vezes com água destilada.

O material resultante (fibras isoladas) foi liofilizado por 48 horas e hidrolisado com ácido sulfúrico como citado no item 3.4.3. As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construídas com os referidos padrões: D-glicose e D-xilose de acordo com os perfis cromatográficos das amostras analisadas.

3.6 Parâmetros para a extração dos açúcares solúveis totais (CST) presentes nas cascas de eucalipto

3.6.1 Planejamento fatorial para a remoção dos CST

Para avaliar o processo de extração dos açúcares solúveis totais (CST) (glicose, frutose, sacarose e rafinose) presentes nas cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), foi realizado um planejamento estatístico configurado no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), de acordo com Rodrigues e Iemma (2005). As faixas de trabalho utilizadas são apresentadas na Tabela 3. As variáveis independentes estudadas durante o processo foram: concentração de etanol

(mol/L), tempo (min) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$). A razão sólido:líquido foi fixada em 1:40 (p/v). A Tabela 4 mostra a configuração experimental completa. Os carboidratos foram quantificados via HPAE-PAD como citado no item 3.4.3. A quantidade de extrativos totais foi determinada gravimetricamente. As curvas de concentração para os carboidratos foram construídas de acordo com os perfis cromatográficos das amostras, com os referidos padrões: D-glicose, D-frutose, sacarose e D-rafinose todos da Sigma. A quantidade de extrativos totais foi determinada gravimetricamente.

Tabela 3 – Valores utilizados no DCCR 2³ para as variáveis independentes avaliadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-1,68</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,68</i>
Etanol (M)	9,6	11,2	13,6	16	17,6
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	48	53	60	67	72
Tempo (min)	23	30	40	50	57

Tabela 4 - Esquema do planejamento fatorial 2³ completo, com as unidades naturais e codificadas

código da unidade				unidade natural		
Ensaio	$X_1 : \text{Cet}$	$X_2 : T$	$X_3 : Tp$	Etanol (M)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
1	-1	-1	-1	11,2	50	45
2	1	-1	-1	16	50	45
3	-1	1	-1	11,2	70	45
4	1	1	-1	16	70	45
5	-1	-1	1	11,2	50	75
6	1	-1	1	16	50	75
7	-1	1	1	11,2	70	75
8	1	1	1	16	70	75
9	-1,68	0	0	9,6	60	60
10	1,68	0	0	17,6	60	60
11	0	-1,68	0	13,6	43	60
12	0	1,68	0	13,6	77	60
13	0	0	-1,68	13,6	60	35
14	0	0	1,68	13,6	60	85
15	0	0	0	13,6	60	60
16	0	0	0	13,6	60	60
17	0	0	0	13,6	60	60

Cet = concentração do etanol

T = temperatura

Tp = tempo

3.6.2 Determinação dos CST em fase alcoólica

Para a determinação dos CST na fase alcoólica, foram pesados aproximadamente 500 mg de serragem das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) em frascos de 30 mL e adicionados 20 mL de etanol (13,6 mol/L). Os frascos foram incubados em banho-maria (60°C) por uma hora, em seguida os materiais foram filtrados e a solução foi avolumada para 200 mL com água ultrapura. O filtrado foi utilizado para a determinação da composição dos CST via HPAE-PAD (FARDIM; DURÁN, 2001; ASTM E 1758-01, 2001). As curvas de concentração dos carboidratos foram construídas como descrito no item 3.4.3 A quantidade de extrativos totais foi determinada gravimetricamente.

3.6.3 Determinação dos CST em fase aquosa

Na determinação dos CST na fase aquosa, foram pesados aproximadamente 500 mg da serragem das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) em frascos de 30 mL e adicionados 20 mL água ultrapura. Os frascos foram incubados em banho-maria (80°C) por uma hora, em seguida os materiais foram filtrados e a solução foi avolumada para 200 mL com água ultrapura. Os carboidratos foram determinados via HPAE-PAD (FARDIM; DURÁN, 2001; ASTM E 1758-01, 2001). As curvas de concentração dos carboidratos foram construídas como descrito no item 3.4.3. A quantidade de extrativos totais foi determinada gravimetricamente.

3.6.4 Determinação dos CST em amostras na forma de cavacos e serragem

Os açúcares solúveis foram extraídos da casca do eucalipto (HGU2) na forma de serragem (60 *mesh*) e cavacos (80 x 30mm). Para isso, em tubo de 30 mL, pesou-se aproximadamente 500 mg das amostras na forma de cavacos e serragens, adicionou-se 20 mL de água ultrapura. O tubos foram incubados em banho-maria (80°C) por uma hora. As quantificações dos carboidratos foram realizadas via HPAE-PAD como descrito no item 3.4.3.

3.6.5 Determinação dos CST em amostras secas e frescas

Após serem coletadas no campo as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) foram cavaqueadas em pedaços de aproximadamente 80 x 30 mm. Os cavacos foram secos em bandejas na bancada do laboratório a uma temperatura média de 25 °C por um período de 33 dias. Iniciou-se a determinação dos CST momentos após a coleta do material, denominado (tempo – 0), e na

seqüência para os próximos dias (1, 2, 5, 9, 12, 16, 23 e 33). Os carboidratos foram removidos com água (80°C) e quantificados via HPAE-PAD como descrito no item 3.4.3. Concomitantemente às análises dos carboidratos, foram realizados também a determinação da perda de umidade por técnica de pesagem simples (SLUITER et al., 2005).

3.6.6 Remoção dos CST utilizando extrator de inox

Para a realização do processo de fermentação são necessários grandes volumes do caldo de casca de eucalipto com altas concentrações de CST. Assim, para a obtenção de volumes maiores foi construído um extrator de inox (difusor), como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Esquema de funcionamento do extrator de inox para as cascas de eucalipto (a); extrator de inox montado na bancada do laboratório (b)

O funcionamento do equipamento foi baseado em um extrator por difusão. As dimensões do extrator são de 300 mm de diâmetro e 600 mm de altura, com um volume útil de 42 L. Internamente o extrator tem um cesto metálico com capacidade para 1kg de casca seca na forma de cavacos. A Figura 8a apresenta um esquema simplificado do funcionamento do extrator (difusor); a água de embebição é alimentada na parte de cima com o auxílio de bomba, desta maneira, o ciclo fica fechado, com a água circulando a uma temperatura entre 78 e 82°C. O aquecimento foi realizado com um aquecedor por contato (serpentina) através de um banho-

maria. A temperatura do sistema foi controlada constantemente por um termômetro (termopar) digital acoplado dentro do cesto metálico (Figura 3b).

Para a remoção dos CST, aproximadamente 1 kg das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) na forma de cavacos foram colocadas no cesto metálico com 20 L de água destilada (80°C) em circulação por uma hora. O carregamento do cesto metálico foi repetido por mais quatro vezes. Após o término do processo o extrator foi esgotado e o caldo levado para a etapa de concentração por aquecimento em chapa aquecedora. Os conteúdos de açúcares solúveis nos concentrados de cascas de eucalipto foram determinados via HPAE-PAD.

3.7 Fermentação alcoólica

No experimento de fermentação das cascas de eucalipto, foi utilizado o caldo de cana de açúcar (*Saccharum spp.*) como controle do processo fermentativo. Desta maneira, os extratos concentrados de casca de eucalipto (HGU2 e EG2), juntamente com o caldo de cana de açúcar foram submetidos a fermentação nas mesmas condições experimentais. Em frascos *Erlenmeyer* (500 mL), foram colocados 100 mL do caldo de casca de eucalipto e adicionados 1 mL de fosfato de amônio (0,1g/L). O pH foi ajustado para 5; e então foram adicionados 3g de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae* linhagem Y-904). Foram realizadas cinco repetições por amostra do caldo (casca e cana). A incubação ocorreu em estufas (32°C) por 24 horas de acordo com Lalluce et al. (2009).

3.7.1 Rendimento alcoólico

Após o processo de fermentação os caldos de casca (HGU2 e EG2), bem como o caldo de cana, foram destilados e a porcentagem alcoólica foi determinada utilizando densímetro digital *Anton Paar* (DMA 4500M) do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ/USP.

As equações a seguir foram formuladas com base na produção de etanol a partir dos açúcares redutores. O balanço estequiométrico das reações envolvidas no processo fermentativo produz 51,11 g de etanol (64 mL) a partir de 100 g de açúcares à 20°C (MENEZES, 1980).

Portanto, o rendimento em gramas de etanol por grama de CST, ao final de 24 horas de fermentação foi determinado pela Equação 3.1. de acordo com Pacheco (2010).

$$Y = \frac{C_{etanol\ 24}}{(CST_{in} - CST_{24})} \quad (3.1)$$

Para expressar o rendimento em porcentagem, utilizou-se a Equação 3.2, que considera o rendimento teórico de 0,511 g_{etanol}/g_{CST} como 100%.

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Y \cdot 100}{0,511} \quad (3.2)$$

Onde:

Y = rendimento de etanol formado em relação a concentração de CST (g_{etanol}/g_{CST});

C_{etanol24} = concentração de etanol (g/L) ao final de 24 horas de fermentação;

CST_{in} = concentração de CST inicial (g/L);

CST₂₄ = concentração de CST final (g/L).

Os conteúdos dos carboidratos solúveis após 24 horas de incubação (CST₂₄), para os caldos (casca e cana) não foram detectados por cromatografia, sendo este valor considerado igual a zero.

3.7.2 Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular da levedura foi realizada pela simples contagem de células vivas e mortas. Neste método utilizou-se a solução de eritrosina para a obtenção da coloração diferencial das células de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (1996).

3.8 Produtividade de etanol a partir dos CST

A produtividade de etanol por tonelada de casca seca ao final de 24 horas de fermentação foi determinada em função da concentração de carboidratos solúveis totais (CST) presentes nas cascas de eucalipto, bem como os rendimentos alcoólicos alcançadas.

A partir desses parâmetros, foi elaborada a seguinte Equação 3.3.

(3.3)

$$P_{etanol} = CST \cdot \left[\frac{0,6475 \cdot Rend_{alcoólico}}{100} \right]$$

Onde:

P_{etanol} = produtividade de etanol em litros a partir de uma tonelada de casca de eucalipto seca;

CST = concentração de CST (kg/t) presentes na casca de eucalipto seca;

$Rend_{alcoólico}$ = Rendimento alcoólico alcançado para os extratos de casca de eucalipto;

Obs; 0,6475 é a conversão estequiométrica de 1g de carboidratos redutores à 0,6475 mL de etanol

3.9 Extração do caldo da casca de eucalipto por dois processos: moagem e prensagem

Segundo Foelkel (2010), o teor de água nas cascas de eucalipto recém colhidas pode chegar a 70%. Assim, este experimento visou retirar a água (caldo) por processos puramente físicos (moagem e prensagem).

O processo de moagem das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) foi realizado em moenda de um terno (três rolos esmagadores) (Figura 9b). Foram introduzidas na moenda aproximadamente 5 Kg de casca de eucalipto na forma de lascas (1000 x 200mm). A casca foi submetida a uma pressão que expulsou o caldo do interior das células. Este processo foi repetido continuamente até a obtenção de 1 L de caldo (Figura 9b). O caldo proveniente da moagem foi analisado no HPAE-PAD para verificar a concentração de carboidratos extraídos.

Para a prensagem das cascas de eucalipto utilizou-se a prensa Codistil/PE (DEDINI). Aproximadamente, 500 g de casca na forma de cavacos (80 x 30mm) foram colocadas no cilindro da prensa hidráulica. As cascas foram prensadas com uma força de 250 kgf/cm² por 1 minuto, segundo a norma da CONSECANA (2003). Durante cada prensagem, um béquer foi usado para recolher o caldo da casca extraída (Figura 9a). O caldo proveniente da prensagem foi analisado no HPAE-PAD.

Figura 9 - Equipamentos para a extração do caldo da casca de eucalipto; (a) prensa; (b) moenda

3.10 Anelamento das árvores de eucalipto

Foi realizado um experimento de anelamento das árvores de eucalipto com o objetivo de induzir o acúmulo de açúcares solúveis. O anelamento foi realizado 7 dias antes da coleta (Figura 10). Como controle foi usada uma árvore sem o anelamento ao lado da árvore anelada (mesma soca-planta) como mostra a Figura 10. Foram realizados os anelamentos em duplicata para dois clones de *Eucalyptus urophylla* (UR01 e UR02) e um *E.grandis* (EG03). Os carboidratos foram analisados como descrito no item 3.4.3.

Figura 10 – Coleta da casca de eucalipto com anelamento; (a) região do anelamento (b) amostras coletadas

3.11 Pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas

No presente trabalho, foram desenvolvidos vários procedimentos de pré-tratamentos para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana de açúcar. O objetivo desta etapa foi extrair a maior quantidade de interferentes (hemiceluloses e lignina) do material lignocelulósico, preservando a maior concentração de carboidratos fermentescíveis (glicose). Os experimentos foram realizados de acordo com os planejamentos fatoriais (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Os pré-tratamentos avaliados foram: ácido sulfúrico (H_2SO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinado com ácido sulfúrico, ácido clorídrico (HCl) e pré-tratamentos sequenciais de ácido (HCl) e bases (NaOH). Outras variáveis independentes estudadas durante os processos foram: razão sólido:líquido, tempo e temperatura de reação. Os carboidratos da fase líquida (hidrolisado), bem como os da fase sólida (biomassa residual) foram determinados via HPAE-PAD.

3.11.1 Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Para este experimento foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2⁴, incluindo 8 ensaios axiais e três repetições no ponto central, totalizando 27 ensaios. Foram utilizadas neste experimento as serragens das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e do bagaço de cana “*in natura*” (casca e bagaço moídos e peneirados). Foram pesados 500 mg dos materiais para cada ensaio (em triplicatas). Após o pré-tratamento as amostras foram filtradas e os carboidratos removidos foram determinados na fase líquida (hidrolisado) via HPAE-PAD. As variáveis independentes avaliadas foram; relação sólido:líquido, concentração de ácido sulfúrico (H₂SO₄), temperatura de incubação e tempo de reação. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 5. A configuração experimental completa esta descrita no Anexo A.

Tabela 5 – Valores utilizados no DCCR 2⁴ para as variáveis independentes avaliadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-2</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
sol:liq	1:4	1:7	1:10	1:13	1:16
H₂SO₄ (M)	3,33	5	6,66	8,33	10
Temperatura (°C)	25	40	55	70	85
Tempo (min)	12	24	36	48	60

3.11.2 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) combinado com Ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Para avaliar a interação do peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico foi montado um fatorial completo 2³, incluindo os 6 pontos axiais com três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. Foram utilizadas as serragens das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e do bagaço de cana “*in natura*”. Aproximadamente 500 mg (em triplicatas) das amostras (cascas de eucalipto e bagaço) foram pesadas e incubadas com a solução combinada de peróxido hidrogênio (H₂O₂) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) de acordo com o planejamento experimental descrito na Tabela 6. O tempo de reação e a relação sólido:líquido foram fixados em 60 minutos e 1:10, respectivamente. A configuração experimental em ensaios do planejamento esta descrita no Anexo B. Os carboidratos liberados neste processo de pré-hidrólise foram determinados na fase sólida (biomassa residual) via HPAE-PAD. Para a determinação dos carboidratos na fase sólida

foi desenvolvido o procedimento de hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L) (FARDIM; DURÁN, 2001; ASTM E 1758-01, 2001).

Tabela 6 – Valores utilizados no planejamento experimental para as variáveis independentes avaliadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-1,68</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,68</i>
H_2SO_4 (M)	1	2	3,33	4,66	5,66
H_2O_2 (M)	0,65	1,73	3,47	5,21	6,51
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	33	40	50	60	67

3.11.3 Ácido clorídrico (HCl)

Para avaliar a ação do ácido clorídrico na parede celular dos materiais lignocelulósicos foi realizado um fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes avaliadas foram; concentração de ácido clorídrico (HCl), temperatura e tempo. A relação sólido:líquido foi fixada em 1:10. Os valores utilizados nos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 7. A configuração experimental completa do experimento esta descrita no Anexo C.

Neste experimento, foram utilizadas as serragens das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e do bagaço de cana livre de extrativos. Foram pesados aproximadamente 500 mg dos materiais para cada ensaio (em triplicata). Após o pré-tratamento as amostras foram filtradas e os carboidratos removidos foram determinados na fase líquida (hidrolisado) via HPAE-PAD. O resíduo proveniente do pré-tratamento foi submetido a hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L), para a determinação dos carboidrato da fase sólida, como descrito no item 3.11.2.

Tabela 7 – Valores utilizados no planejamento experimental para as variáveis independentes avaliadas

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-1,68</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,68</i>
HCl (M)	3,6	5	7	8,8	10
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	48	53	60	67	72
Tempo (min)	23	30	40	50	57

3.11.4 Pré-tratamentos sequenciais com meios ácidos (HCl) e alcalinos (NaOH)

Com o objetivo de preparar a biomassa lignocelulósica para a hidrólise enzimática, foram realizados os pré-tratamentos sequenciais em meios ácidos e alcalinos (Figura 11).

Figura 11 – Esquema dos processos de pré-tratamento para as cascas de eucalipto e bagaço de cana de açúcar

As condições dos pré-tratamentos para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e para o bagaço de cana foram as seguintes:

Tratamento controle, remoção dos CST com água quente (80°C) por 1 hora. O material recuperado por filtração foi seco em estufa (60°C) até atingir massa constante.

Tratamento I, compreende o tratamento I seguido da remoção de hemiceluloses com HCl (5 mol/L) à temperatura de 67°C por 50 min. O material recuperado por filtração foi lavado com água até a neutralidade (pH = 7) e seco em estufa (60°C) até atingir massa constante.

Tratamento II, compreende o tratamento II seguido da remoção da lignina com NaOH (0,5 mol/L) à temperatura de 121°C (autoclave) por 40 min. O material recuperado por filtração foi lavado com água até a neutralidade (pH = 7) e seco em estufa (60°C) até atingir massa constante.

Tratamento III, compreende o tratamento I seguido da remoção da lignina com NaOH (0,5 mol/L) à temperatura de 121°C (autoclave) por 40 min. O material recuperado por filtração foi lavado com água até a neutralidade (pH = 7) e seco em estufa (60°C) até atingir massa constante.

As composições químicas (carboidratos e lignina insolúvel) das biomassas pré-tratadas foram determinadas através da hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L) (FARDIM; DURÁN, 2001; ASTM E 1758-01, 2001).

3.12 Hidrólise enzimática das cascas de eucalipto e bagaço de cana

Nos experimentos de hidrólise, foi utilizado o preparado enzimático comercial Accelerase 1500 (Genencor), fornecidas pelo professor Dr. Igor Polikarpov do Instituto de Física de São Carlos/USP. A atividade enzimática (AE) apresentada pela enzima foi de 104,17 U/mL, calculados pelo método de hidrólise em papel de filtro e com base na curva de glicose, sendo portanto, 1U (unidade de atividade) igual à quantidade de enzima que cataliza um micromol de produto por minuto. Segundo Sun e Cheng (2002), as quantidades de enzimas comumente utilizadas nas hidrólises das biomassas estão entre 7 e 33 U/grama de substrato. Assim, a quantidade de enzima utilizada nos procedimentos de hidrólise descrito a seguir foi padronizada em 25U/grama de biomassa. Os ensaios de hidrólise foram realizados de acordo com as condições ótimas de atividade do preparado enzimático estabelecidas para substratos comerciais, especificado pelo fabricante (temperatura 50°C e pH 5).

Os materiais lignocelulósicos utilizados na hidrólise enzimática foram as biomassas pré-tratadas (controle - I, II e III) para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana, como descrito no item 3.11.4. Foram pesados aproximadamente 1g das biomassas pré-tratadas e adicionados 10 mL de tampão citrato de sódio - 50mM (pH 5). O material foi homogeneizado e esterilizado (autoclave - 121°C por 20 minutos). Após a esterilização foram adicionados 240µL da enzima; os frascos foram incubados em banho-maria a 50 °C com agitação constante (200 rpm) por 24 horas. Ao término do tempo de incubação, a temperatura do banho foi elevada para 100 °C por 15 minutos, a fim de inativar a ação das enzimas. As amostras foram filtradas em papel de filtro Whatmann nº1, com auxílio da bomba de vácuo. A biomassa foi lavada para a remoção dos açúcares residuais e os filtrados (hidrolisado enzimático) analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-PAD) para verificar a concentração dos açúcares liberados.

Na hidrólise enzimática para o período de incubação de 48 horas foi utilizado o pré-tratamento III, para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana.

3.12.1 Eficiência da hidrólise enzimática

A eficiência da hidrólise enzimática foi calculada pela relação entre o conteúdo de glicose liberada e a quantidade presente na amostra inicial após os pré-tratamentos. A Equação 3.4 descreve o cálculo da eficiência hidrolítica.

$$\text{Eficiência hidrolítica (\%)} = \left(\frac{\text{gli}_{\text{liberada}}}{\text{gli}_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

Onde:

$\text{gli}_{\text{liberada}}$ = conteúdo de glicose (mg/g MS) liberada da biomassa após a hidrólise enzimática, determinada via HPAE-PAD.

$\text{gli}_{\text{inicial}}$ = conteúdo de glicose (mg/g MS) na biomassa inicial, determinada com H_2SO_4 (12mol/L) via HPAE-PAD.

3.13 Planejamento fatorial para hidrólise enzimática da casca de eucalipto

Com o objetivo de avaliar as melhores condições para a hidrólise enzimática das cascas de eucalipto, foram avaliados os parâmetros; pH (4,35 – 5,8) e temperatura (42,95 – 57,05 °C). Para o desenvolvimento deste experimento, foi utilizada a biomassa pré-tratada (III) da casca HGU2. Foi construído um planejamento fatorial 2^2 , incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições do ponto central, totalizando 11 ensaios. Os valores de pH e temperatura utilizados nos ensaios estão apresentados na Tabela 8. O Anexo D descreve a configuração completa do experimento. Foi pesado aproximadamente 1g da biomassa e adicionados 10 mL de tampão citrato de sódio - 50mM (pH de acordo com o planejamento). O material foi homogeneizado e esterilizado (autoclave - 121°C por 20 minutos). Após a esterilização foram adicionados 240µL da enzima (Accelerase 1500); os frascos foram incubados em banho-maria temperatura (de acordo com o planejamento), com agitação constante (200 rpm) por 3 horas. Ao término do tempo de incubação, a temperatura do banho foi elevada para 100 °C, para inativar as enzimas. As amostras foram filtradas à vácuo e os filtrados (hidrolisados enzimáticos) foram injetados no HPAE-PAD para verificar a concentração de açúcares liberados.

Tabela 8 – Valores utilizados no planejamento experimental para avaliar as condições da hidrólise enzimática

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-1,41</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1,41</i>
Temperatura (°C)	42,95	45	50	55	57,05
pH	4,35	4,6	5,2	5,8	6,04

3.14 Análise estatística

Todas as análises dos experimentos foram feitas em triplicatas. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *SAS-Statistical Analysis System V9.2*. Os níveis de significância estatística estabelecidos foram ($p < 0.01$ e $p < 0.05$), para o teste de Tuckey na comparação das médias obtidas nos experimentos. O programa *STATISTICA V9.0*. foi utilizado para as análises de variância (ANOVA) dos planejamentos experimentais e também para as metodologias de superfície de resposta (MSR) e contorno de linhas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química das cascas de eucalipto

A composição química dos materiais lignocelulósicos pode fornecer informações importantes a respeito da qualidade da biomassa para a produção de diversos produtos, inclusive biocombustíveis (etanol).

Assim, inicialmente foram determinadas as composições químicas das cascas de eucalipto de cinco clones comerciais (Tabela 9). Os resultados da Tabela 9 representam a média de cinco repetições por árvore (clone) com três repetições por análise.

Tabela 9 - Composição química das cascas de eucalipto (valores expressos em % MS $\pm$ desvio padrão)

	HGU1	HGU2	HGU2	EG1	EG2
<i>Carboidratos Estruturais (%)</i>					
Fucose	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00
Ramnose	0,17 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,13	0,17 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,03
Arabinose	1,96 $\pm$ 0,16	2,20 $\pm$ 0,14	2,22 $\pm$ 0,22	1,99 $\pm$ 0,17	2,09 $\pm$ 0,18
Galactose	1,47 $\pm$ 0,14	1,55 $\pm$ 0,13	1,55 $\pm$ 0,16	1,50 $\pm$ 0,13	2,14 $\pm$ 0,22
Glicose	47,03 $\pm$ 2,85	45,85 $\pm$ 2,77	46,17 $\pm$ 1,56	43,62 $\pm$ 2,27	44,52 $\pm$ 2,48
Xilose	14,11 $\pm$ 0,68	14,35 $\pm$ 0,58	13,49 $\pm$ 0,40	12,75 $\pm$ 0,59	11,45 $\pm$ 0,65
Total	64,83	64,29	63,83	60,12	60,61
<i>Ligninas (%)</i>					
Lignina Insolúvel	19,54 $\pm$ 0,09	21,15 $\pm$ 0,11	18,91 $\pm$ 0,13	25,40 $\pm$ 0,17	20,78 $\pm$ 0,17
Lignina Solúvel	2,65 $\pm$ 0,02	1,72 $\pm$ 0,00	1,92 $\pm$ 0,03	1,96 $\pm$ 0,02	2,11 $\pm$ 0,02
Total	22,19	22,87	20,83	27,36	22,89
<i>Carboidratos Solúveis (%)</i>					
Glicose	0,66 $\pm$ 0,18	0,96 $\pm$ 0,11	0,37 $\pm$ 0,14	0,44 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,07
Frutose	1,17 $\pm$ 0,27	1,96 $\pm$ 0,10	0,73 $\pm$ 0,22	0,75 $\pm$ 0,11	0,83 $\pm$ 0,19
Sacarose	1,52 $\pm$ 0,11	1,92 $\pm$ 0,17	1,37 $\pm$ 0,24	0,93 $\pm$ 0,12	1,42 $\pm$ 0,20
Total	3,35	4,84	2,47	2,12	2,71

Os carboidratos e as ligninas são os principais componentes das cascas de eucalipto, correspondendo a quase 85% do peso seco (Tabela 9). Embora, a literatura sobre a composição química detalhada da casca de eucalipto seja pouco explorada, os resultados obtidos estão de acordo com os trabalhos realizados com cascas eucalipto por Yadav et al. (2002).

A média dos três clones (HGU) para o conteúdo de carboidratos estruturais totais, apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Os valores médios dos carboidratos foram: 64,31% e 60,36%, para o HGU e EGs, respectivamente (Tabela 9). Para os resultados da concentração de carboidratos solúveis totais (CST), os HGUs apresentaram maiores conteúdos que os EGs, embora resultados não significativos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Concentrações de açúcares solúveis acima de 5% em peso seco para cascas de eucalipto, já foram encontrados por Yadav et al. (2002).

4.1.2 Composição química das cascas de eucalipto comparadas com o bagaço de cana-de-açúcar

Os resultados da Tabela 9 mostram que o HGU2 e EG2 apresentaram as maiores quantidades de carboidratos solúveis, 4,84 e 2,71%, respectivamente. Desta maneira, optamos por trabalhar especificamente com estes dois clones. Assim, uma nova coleta foi realizada, e as cascas (HGU2 e EG2) foram coletadas na forma de resíduo no campo como descrito no item 3.2.2. A partir deste experimento os resultados foram comparados com o bagaço de cana de açúcar nas mesmas condições analíticas (Tabela 10). A comparação dos resultados das cascas de eucalipto com o bagaço de cana é devido ao bagaço ser a biomassa mais estudada para a produção de etanol celulósico (PANDEY et al, 2000).

De acordo com os resultados da Tabela 10, o bagaço de cana apresentou maiores concentrações de carboidratos estruturais totais do que as cascas de eucalipto (HGU2 e EG). As cascas de eucalipto apresentam em média 50% da massa como carboidratos, enquanto o bagaço apresentou quase 70%. Esta diferença se deve pelo alto conteúdo de xilose presente no bagaço de cana. Assim, o bagaço apresentou 2,5 vezes mais xilose que as cascas de eucalipto (Tabela 10). Devido a estas altas concentrações de xilose, o bagaço é alvo de vários estudos para a produção de xilitol (ALVES, et al, 1998).

Dividindo-se o conteúdo total de carboidratos com seis carbonos (C6) pelo conteúdo total de carboidratos com cinco carbonos (C5), têm-se os valores da razão hexoses/pentoses (H/P).

Assim, os valores de H/P indicam que o bagaço teve quase o dobro de pentoses por unidade de hexoses na parede celular, quando comparado com as cascas de eucalipto.

A razão H/P dos materiais lignocelulósicos é um fator muito importante para o processo de conversão da biomassa em etanol. Pois, no processo de hidrólise (ácida ou enzimática) da biomassa, são gerados dois grupos de carboidratos; o grupo das hexoses, oriundas da quebra de pequenas partes das hemiceluloses e preferencialmente das cadeias de celulose, e o grupo das pentoses, provenientes da hidrólise da fração hemicelulósica (principalmente xilose).

Assim, no processo de hidrólise, além da liberação dos monossacarídeos vários outros compostos tóxicos são gerados, e estes inibem o processo fermentativo. Por exemplo, a partir da desidratação de pentoses e hexoses são produzidos o furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. (DELGENES et al, 1996).

No processo de fermentação alcoólica, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* convertem as hexoses (C6) em etanol, e não fermentam as pentoses (C5). Os carboidratos C5 podem causar inibição do processo fermentativo (DELGENES et al, 1996). Portanto, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 10, as cascas de eucalipto apresentaram baixo conteúdo de xilose, esta característica pode influenciar diretamente no processo fermentativo, aumentando os rendimentos alcoólicos.

As cascas de eucalipto por são tecidos de condução da seiva, portanto apresentam altos conteúdos de carboidratos solúveis totais (CST). As quantidades de CST presentes nas cascas de eucalipto HGU2 e EG2 foram: 9,15 e 5,17%, respectivamente (Tabela 10). Os resultados obtidos para os CST na Tabela 10 são referentes a segunda coleta (resíduo no campo). Os conteúdos de CST na segunda coleta foram praticamente o dobro dos valores encontrados na primeira coleta (Tabela 09). Esta diferença pode ser explicada pelas épocas em que foram realizadas as coletas do material. A primeira coleta foi realizada no início de abril de 2008 (período de altas precipitações) e a segunda coleta foi realizada no final de setembro de 2008 (período de baixas precipitações). Segundo George et al. (1989), a produção e a concentração de carboidratos solúveis nos tecidos e órgãos das plantas são dependentes de muitos fatores (condições do ambiente, estado nutricional e estágio fisiológico). Assim, a primeira coleta foi realizada no período em que os eucaliptos apresentavam altas taxas de crescimento devido as boas condições climáticas. Este período é caracterizado pelo consumo de carboidratos solúveis presentes na casca. A segunda coleta foi realizada no período em que as condições climáticas não eram

favoráveis, ocorrendo assim, um acúmulo dos carboidratos solúveis presentes nas cascas do eucalipto.

Tabela 10 - Composição química das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), e do bagaço (valores expressos em % matéria seca $\pm$ desvio padrão)

	HGU2	EG2	<i>bagaço</i>
<i>Carboidratos Estruturais (%)</i>			
Fucose (C6)	0,10 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00
Ramnose (C6)	0,32 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,03
Arabinose (C5)	1,03 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,04
Galactose (C6)	0,91 $\pm$ 0,03	1,19 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,02
Glicose (C6)	38,85 $\pm$ 0,90	39,55 $\pm$ 0,66	44,25 $\pm$ 1,51
Xilose (C5)	9,62 $\pm$ 0,10	8,64 $\pm$ 0,15	23,39 $\pm$ 0,74
Total	50,83	50,98	69,37
Hexoses (C6)/Pentoses (C5)	3,77	4,21	1,81
<i>Ligninas (%)</i>			
Lignina Insolúvel	16,86 $\pm$ 0,41	11,41 $\pm$ 0,45	14,09 $\pm$ 0,88
Lignina Solúvel	2,82 $\pm$ 0,36	3,30 $\pm$ 0,20	1,78 $\pm$ 0,16
Total	19,68	14,71	15,87
<i>Carboidratos Solúveis (%)</i>			
Glicose	1,71 $\pm$ 0,17	0,76 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,00
Frutose	4,54 $\pm$ 0,58	2,60 $\pm$ 0,15	0,01 $\pm$ 0,00
Sacarose	2,90 $\pm$ 0,28	1,81 $\pm$ 0,07	0,01 $\pm$ 0,00
Total	9,15	5,17	0,03
<i>Extrativos (%)</i>			
Toluol/Etanol	9,60 $\pm$ 0,88	11,19 $\pm$ 0,92	1,47 $\pm$ 0,07
Etanol	6,35 $\pm$ 0,81	5,06 $\pm$ 0,4	0,91 $\pm$ 0,22
Água	9,82 $\pm$ 0,81	10,39 $\pm$ 0,6	4,17 $\pm$ 0,82
Total	25,77	26,64	6,55
Cinzas	4,06 $\pm$ 0,04	7,14 $\pm$ 0,25	8,99 $\pm$ 0,55

(C5) Carboidratos composto estruturalmente por 5 carbonos

(C6) Carboidratos composto estruturalmente por 6 carbonos

Para corroborar com estes resultados, Carvalho et al. (2001), determinaram a concentração dos carboidratos solúveis ao longo de 12 meses em plantas forrageiras, e

verificaram que as maiores quantidades de carboidratos solúveis ocorreram durante os meses referentes ao período de inverno (baixa precipitação) e as menores concentrações encontradas foram nos período de verão (alta precipitação). George et al. (1989) comenta que o decréscimo da concentração de CST nos vegetais seja provavelmente por causa das melhorias das condições climáticas (alta luminosidade e pluviosidade). Este período proporciona maiores taxas de acúmulo de matéria seca e conseqüentemente maior demanda de reservas orgânicas a fim de constituírem novos tecidos.

Os resultados da quantidade de lignina insolúvel apresentados na Tabela 10 foram bem diferentes dos resultados apresentados na Tabela 9 para as mesmas cascas (HGU2 e EG2). Essas diferenças se devem principalmente pelos conteúdos de cinzas presente nos materiais avaliados (Tabela 10). Segundo Foelkel (2010), freqüentemente ocorre erros na quantificação da lignina insolúvel em materiais com altas concentrações de cinzas. Assim, na análise da lignina insolúvel com H_2SO_4 (12 mol/L), a quantidade de cinzas deve ser descontada do peso da lignina insolúvel.

Para os materiais avaliados, as quantidades de cinzas determinadas foram: 4,06%, 7,14% e 8,99 % para o HGU2, EG2 e bagaço, respectivamente. Os resultados de cinzas para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) foram próximos dos valores encontrados por Yadav et al (2002). A cinza do bagaço de cana é composta praticamente na forma de sílica (SiO_2) (VILLAR-COCIÑA et al, 2006; CORDEIRO et al, 2009). Já as cinzas das cascas de eucalipto são compostas principalmente por cálcio (RAMOS, 2003).

Os extrativos são componentes não-estruturais presentes nos materiais lignocelulósicos. Os extrativos presentes nas cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), juntamente com o bagaço, foram removidos seletivamente com mistura de toluol/etanol, etanol e água, como descrito no item 3.4.1. As cascas de eucalipto apresentaram altas concentrações de extrativos em relação ao bagaço (Tabela 10). Como relatado na literatura, as cascas de eucalipto apresentam altas quantidades de extrativos (GOLDSTEIN, 1981). Pode-se observar ainda na Tabela 10, que aproximadamente 40% dos extrativos totais presentes nas cascas de eucalipto foram removidos somente com água quente. Yadav et al. (2002) removeu 60% dos extrativos das cascas de eucalipto utilizando somente água quente. A quantidade e qualidade dos extrativos presentes nas biomassas lignocelulósicas também influenciam significativamente a produção de etanol, pois estas substâncias podem inibir o processo fermentativo (ANDO et al, 1986).

Com os resultados da composição química das cascas de eucalipto (HGU2 e EG), foi feita uma média dos principais componentes, e comparados com o bagaço de cana de açúcar. Assim, foi construído um perfil da composição química para estes dois tipos de materiais lignocelulósicos, resultados apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Composição química média (% MS) da casca de eucalipto e bagaço de cana de açúcar

Os carboidratos principais (glicose, xilose e CST) foram extraídos da figura circular e plotados nas colunas em destaque. Pela Figura 12, podemos observar que o bagaço de cana contém 67,12% de carboidratos e a casca de eucalipto contém 55,74%. Assim, o bagaço de cana apresentou 20% mais carboidratos que as cascas de eucalipto, porém deste total, o bagaço apresentou somente 65,4% de carboidratos convensionalmente fermentescíveis (C6), enquanto a casca de eucalipto apresentou 83% deste grupo de carboidratos. Portanto, as cascas de eucalipto com seus altos conteúdos de CST apresentaram quase 6% mais carboidratos fermentescíveis do que o bagaço de cana.

4.1.3 Composição química do macerado de fibras das cascas de eucalipto e bagaço de cana

Os elementos celulares (fibras) são as estruturas mais importantes nas biomassas residuais. Portanto, a quantificação dos carboidratos destes elementos isolados pode fornecer informações adicionais a respeito dos materiais lignocelulósicos. O macerado de fibras foi realizado através de reagentes químicos que removem a lamela média (região de união entre as células), separando as fibras das outras células (vasos e parênquima), mantendo a integridade das fibras.

Os principais carboidratos presentes nas fibras das cascas de eucalipto e bagaço de cana foram: glicose (C6) e xilose (C5) (Figura 13). Os valores encontrados para o conteúdo de glicose nas fibras dos materiais lignocelulósicos foram: 92,8%, 84,9% e 77,6 %, para bagaço, HGU2 e EG2, respectivamente (Figura 13). E os valores de xilose foram: 11,10%, 3,79% e 2,63%, para o bagaço, HGU2 e EG2, respectivamente. Com estes resultados calculamos a razão H/P, e os valores encontrados foram: 22,3; 29,4 e 8,3 para a casca HGU2, EG2 e bagaço, respectivamente.

Apesar das fibras do bagaço terem apresentado maiores quantidades de glicose por matéria seca, as fibras das cascas de eucalipto apresentaram três vezes mais glicose por unidade de xilose na parede celular. O bagaço de cana apresentou maiores concentrações de xilose, e tanto a xilose quanto os produtos de sua degradação (ex; furfural) inibem a atividade metabólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LOHMEIER-VOGER, 1998; MUSSATO; ROBERTO, 2004). Portanto, é de se esperar que as baixas concentrações de xilose presentes nas cascas de eucalipto produzam menores quantidades de subprodutos na hidrólise, aumentando assim, o rendimento do processo fermentativo.

Figura 13 – Carboidratos estruturais em % MS presente na parede celular das fibras das amostras de casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana de açúcar

4.2 Quantificação dos açúcares solúveis nas cascas de eucalipto

Como observado na Tabela 10, as cascas de eucalipto apresentaram altas concentrações de açúcares solúveis. Estes carboidratos fermentescíveis estão prontamente disponíveis nas biomassas, mas precisam ser extraídos para o processo de fermentação. Portanto, o objetivo desta

etapa foi otimizar as condições de remoção dos CST para a casca de eucalipto HGU2. Esta avaliação foi realizada através do estudo das variáveis por planejamento fatorial (Tabela 4). Foram avaliadas as influências das variáveis independentes; concentração de etanol (9,6 a 17,6 mol/L); temperatura (50 a 77°C) e tempo (35 a 75 min), sobre as variáveis dependentes; glicose, frutose, sacarose, rafinose e extrativos totais. Os carboidratos foram determinados via HPAE-PAD, e o conteúdo de extrativos pelo método gravimétrico. O conteúdo de CST e extrativos totais obtidos após os tratamentos para a casca HGU2 estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Planejamento experimental com os respectivos conteúdos de carboidratos solúveis e extrativos para a casca de eucalipto (HGU2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos Solúveis % (MS) ^a					
	Glicose	Frutose	Sacarose	Rafinose	CST	Extrativos
1	1,96	3,42	3,59	0,34	9,32	27,53
2	2,01	3,47	3,52	0,39	9,39	27,60
3	2,00	3,47	3,68	0,36	9,50	27,79
4	2,02	3,52	3,69	0,37	9,60	27,60
5	2,02	3,54	3,70	0,37	9,63	27,03
6	2,08	3,60	3,70	0,34	9,71	27,06
7	2,04	3,58	3,81	0,38	9,81	27,74
8	1,92	3,37	3,58	0,31	9,19	27,21
9	2,00	3,54	3,74	0,38	9,67	27,50
10	2,11	3,65	3,39	0,34	9,48	27,57
11	2,09	3,66	3,64	0,41	9,80	26,92
12	2,02	3,60	3,68	0,38	9,68	26,98
13	1,98	3,53	3,64	0,37	9,51	27,24
14	1,98	3,56	3,62	0,35	9,51	26,52
15	2,02	3,65	3,62	0,34	9,63	27,28
16	2,00	3,57	3,66	0,35	9,72	27,00
17	1,99	3,50	3,72	0,35	9,56	26,89

^a Média em triplicata

Os resultados da Tabela 11 foram plotados no programa *STATISTICA V.9.0*, para a verificação da análise de variância (ANOVA). A Tabela 12 apresenta os resultados para o conteúdo de CST para a casca de eucalipto HGU2. Pode-se observar através dos resultados de

(*p* valor) que as condições das variáveis independentes (etanol, temperatura e tempo) não tiveram efeito significativo ($p < 0,05$), sobre a variável dependente determinada (CST).

Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) para o conteúdo removido de carboidratos solúveis totais (CST) no planejamento fatorial para o HGU2

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F _{calculado}	<i>p</i> valor
Etanol	4	0,163798	0,040949	1,87	0,2543
Temperatura	4	0,127222	0,031806	1,45	0,3416
Tempo	4	0,174986	0,043746	1,99	0,2337

O coeficiente de correlação (R^2) para os resultados de CST foi de 0,73, e o teste F não válido a 95% de confiança. A ANOVA para as variáveis dependentes (glicose, frutose, sacarose e rafinose) isoladamente, também não apresentou efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). A quantidade de extrativo também não apresentou diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos para o CST e extrativos (Tabela 11) foram plotados no programa *STATISTICA 9.0* e analisados por curvas de contorno em função da concentração de etanol (mol/L) e temperatura (°C) (Figura 14).

Figura 14 – Curvas de contorno para a casca de eucalipto HGU2; (a) conteúdo de carboidratos solúveis totais (CST) em % (MS); (b) extrativos totais em % (MS), ambos em função da concentração de etanol (mol/L) e temperatura (°C); tempo fixado em 60min

Embora os resultados não sejam significativos, as curvas de contorno obtidas para a casca de eucalipto (HGU2), mostram que os maiores conteúdos de CST e extrativos (vermelho intenso), foram removidos com altas temperaturas e mínimas concentrações de etanol (abaixo de 9 mol/L). Estes resultados indicam que a remoção dos compostos solúveis principalmente os CST pode ser realizada somente utilizando água em alta temperatura (acima de 70°C).

4.3 Remoção dos CST e extrativos das cascas de eucalipto por água ou etanol

A partir dos resultados obtidos no item 4.2, foram desenvolvidos experimentos utilizando separadamente os solventes: água e etanol. O objetivo foi avaliar o melhor solvente para a remoção dos CST e extrativos das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2).

As condições de extração avaliadas foram: extração aquosa (80°C) e extração etanólica (13,6 mol/L) à 60°C. As Figuras 15 e 16 apresentam a quantidade de carboidratos solúveis (glicose, frutose, sacarose e rafinose) e dos extrativos removidos nos dois tratamentos (água e etanol).

Figura 15 – Conteúdo de carboidratos solúveis e extrativos em % MS, removidos com água (80°C) e etanol (13,6 mol/L) à 60°C para as cascas de eucalipto HGU2 (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância)

Figura 16 – Conteúdo de carboidratos solúveis e extrativos em % MS, removidos com água (80°C) e etanol (13,6 mol/L) à 60°C para as casca de eucalipto EG2 (letras iguais não diferem pelo teste de *Tukey* ao nível de 1% de significância)

Para a casca do HGU2 (Figura 15), houve um aumento significativo ($p < 0.01$) de 5% na remoção dos CST quando o material foi submetido ao tratamento com água quente (80°C). Portanto, a remoção dos CST das cascas do HGU2 somente com água quente foi o método mais eficiente. A casca EG2 apresentou uma redução significativa ($p < 0.01$) de 16% na remoção dos CST no tratamento com água quente (Figura 16). Já as taxas de remoção dos extrativos no tratamento com etanol (13,6 mol/L) foram maiores para os dois clones de eucalipto avaliados (Figura 15 e 16).

Visando o desenvolvimento de uma metodologia acessível em escala industrial para a remoção dos CST das cascas de eucalipto, a utilização da água quente como solvente mostrou-se eficiente do ponto vista ambiental e financeiro. De fato, a extração dos carboidratos solúveis somente com água é mais vantajosa, pois não utiliza nenhum reagente químico que onere o processo.

4.4 Remoção dos CST da casca de eucalipto em amostras de cavacos e serragem

O tamanho da partícula também é um fator importante no processo de remoção dos componentes solúveis ou até mesmo para ação das enzimas na matriz lignocelulósica. Fan et al. (1981) comenta que, técnicas que diminuem o tamanho do material lignocelulósico aumentam a área superficial, aumentando a taxa de hidrólise enzimática. Assim, os resultados obtidos nos

experimentos dependerão do tamanho e forma das partículas do material. Segundo Nebra (1985), o tamanho da partícula obtida depende de dois fatores: material lignocelulósico utilizado e tipo de equipamento usado (moinho ou cavaqueadora).

As cascas de eucalipto quando submetidas ao processo de moagem em moinhos tipo wiley, tornam-se um pó muito fino. Esta característica pode ser em função dos elementos celulares que compõem o tecido casca, uma vez que este tipo de material contém cerca de 35% de elementos fibrosos e 50% de células de parênquima (células pequenas) (ANGYLOSSI-ALFONSO, 1987). Já o bagaço de cana, por exemplo, quando submetido ao processo de moagem, torna-se um pó com partículas maiores, mais fibroso. O bagaço de cana consiste de aproximadamente 60% de fibras (RODRIGUES, 2007).

A Figura 17 mostra o conteúdo de carboidratos solúveis removidos para a casca de eucalipto (HGU2), nas formas de serragens e cavacos foi submetida ao tratamento com água quente (80°C). A remoção dos CST teve um aumento significativo de 14% para as amostras na forma de serragem (Figura 17). A serragem absorve o solvente com mais facilidade, tornando o processo mais eficiente. Conseqüentemente, a taxa de remoção dos CST nos cavacos foi acima de 85%, considerando as amostras de casca moídas.

Figura 17 – Conteúdo de carboidratos solúveis em % MS removidos em amostra de serragem e cavacos, para a casca de eucalipto HGU2 (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância)

Este resultado foi excelente do ponto de vista de gasto energético no preparo do material. Pois nos processos de moagens dos materiais lignocelulósicos ocorrem utilização de equipamentos que consome grandes quantidades de energia onerando o processo (RIVERS;

EMMERT, 1987). Desta maneira, a remoção dos CST das cascas de eucalipto foi conseguida com um preparo mínimo da amostra (cavaqueamento).

4.5 Secagem das cascas de eucalipto e degradação dos CST

No processo de secagem de materiais vegetais ocorrem inúmeras reações bioquímicas que podem alterar a composição química do material coletado (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Portanto, o objetivo deste experimento foi avaliar a taxa de degradação dos carboidratos solúveis nas cascas de eucalipto ao longo de um mês de secagem ao ar livre e temperatura ambiente como descrito o item 3.6.5. Concomitantemente com as análises dos carboidratos, também foi realizado acompanhamento da perda da umidade.

Assumindo-se que a análise no tempo zero (0) as cascas (HGU2 e EG2), tiveram 100% dos CST quantificados, assim, as taxas de degradação em porcentagem dos carboidratos solúveis ao longo dos dias de secagem estão apresentadas na Figura 18a.

A casca do eucalipto após ser retirada da árvore permanece por um período com suas células vivas e com o metabolismo em funcionamento (consumo de açúcares). Logo, como não há mais fonte (folhas), a concentração desses açúcares na casca sofre um decréscimo. A Figura 18a apresenta as curvas de degradação dos carboidratos para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) ao longo de 33 dias de secagem. Observamos uma estabilização somente após o quinto dia (Figura 18a).

Figura 18 – Curva de degradação dos CST (a) e teor de umidade (b) em função do tempo de secagem para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2)

A redução dos CST foi acentuada nos primeiros cinco dias, período onde a perda de umidade também foi alta (Figura 18b). Pode-se afirmar que a estabilização do conteúdo de CST nas cascas de eucalipto ocorreu após 5 dias, muito provavelmente em função do baixo teor de água nestes materiais. Os resultados da figura 18a mostram que após cinco dias de secagem, o conteúdo de CST sofreu uma redução significativa de aproximadamente 50 e 75% para o HGU2 e EG2, respectivamente. Portanto, na determinação dos CST nas cascas de eucalipto, após cinco dias de secagem foram quantificados somente 50% e 25% do total de CST presentes nas cascas HGU2 e EG2, respectivamente.

Analisando separadamente os carboidratos solúveis, as concentrações de sacarose foram as que mais reduziram nas cascas de eucalipto, em média 90% (Figura 19).

Figura 19– Curva de degradação dos carboidratos solúveis em função do tempo de secagem para as cascas de eucalipto HGU2 (a) e EG2 (b)

4.6 Remoção dos CST das cascas de eucalipto utilizando extrator de inox e água quente (80°C)

Para a obtenção de grandes volumes do caldo da casca de eucalipto, utilizou-se o extrator de inox. Este equipamento foi construído conforme descrito no item 3.6.6 (Figura 8).

Na remoção dos CST no extrator, utilizaram-se cavacos das cascas (HGU2 e EG2). Os açúcares solúveis foram extraídos exclusivamente por um processo de lavagem repetitiva das cascas com água quente (80°C). Nesta condição o equipamento trabalha como um difusor em temperatura elevada. Este processo aumenta a permeabilidade da célula, permitindo que os

açúcares passem através das paredes celulares na direção da solução com menor concentração (água) (transferência de massa por diferença de concentração).

Para a determinação da eficiência do extrator ($E\%$), as concentrações dos carboidratos solúveis nas cascas de eucalipto, foram avaliadas inicialmente (C_i), e após o processo de remoção no extrator, concentração final (C_f).

A Tabela 13 apresenta a concentração dos açúcares solúveis nas cascas de eucalipto antes e após a remoção no extrator de inox. Os resultados da Tabela 13 mostram que as eficiências do extrator ($E\%$) para as cascas de eucalipto HGU2 e EG2, foram de 83,3% e 83,7%, respectivamente. Estes dados mostram que o extrator teve alta eficiência no processo de remoção dos CST.

Tabela 13 – Eficiência do extrator na remoção dos carboidratos solúveis para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), valores expressos em % de matéria seca

Carboidratos (%MS)	HGU2			EG2		
	C_i	C_f	$E\%$	C_i	C_f	$E\%$
Glicose	1,71 $\pm$ 0,17	0,63 $\pm$ 0,02	63,08	0,76 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,01	59,46
Frutose	4,54 $\pm$ 0,58	0,87 $\pm$ 0,02	80,80	2,60 $\pm$ 0,15	0,51 $\pm$ 0,02	80,49
Sacarose	2,90 $\pm$ 0,28	0,03 $\pm$ 0,00	99,00	1,81 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,01	99,10
Total	9,15	1,53	83,28	5,17	0,84	83,75

C_i = Concentração inicial dos carboidratos (%MS)

C_f = Concentração final dos carboidratos (%MS) (após extrator de inox)

$E\%$ = Eficiência do extrator na remoção dos carboidratos solúveis

4.7 Quantificação de CST nos caldos de cascas de eucalipto (concentrado)

Os caldos das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) obtidos via extrator de inox foram concentrados aproximadamente 10 vezes por aquecimento. Após o processo de concentração, os caldos de casca tiveram os conteúdos de CST muito próximos dos encontrados nos caldos de cana de açúcar (*Saccharum* ssp.). O caldo de cana foi utilizado como controle para o processo de fermentação. As quantidades de CST presentes nos caldos das cascas de eucalipto, juntamente com o caldo de cana de açúcar estão apresentados na Tabela 14.

Podemos observar na Tabela 14 que os caldos das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) apresentaram concentrações diferentes de açúcares do caldo de cana. Os valores médios para as cascas de eucalipto foram; glicose 38,5%, frutose 54,2% e sacarose 7,6%, enquanto que no caldo de cana a sacarose é o açúcar predominante com quase 99%.

Tabela 14 – Concentração dos carboidratos solúveis dos caldos de casca concentrado e caldo de cana de açúcar (valores expressos em g/L $\pm$ desvio padrão)

	<i>Carboidratos (g/L)</i>			
	Glicose	Frutose	Sacarose	CST
Caldo de cana	0,68 $\pm$ 0,07 (0,5)^a	0,91 $\pm$ 0,15 (0,7)	139,78 $\pm$ 2,86 (98,8)	141,38 $\pm$ 2,82 (100)
Caldo de HGU2	55,31 $\pm$ 2,70 (38,7)	72,54 $\pm$ 2,88 (50,8)	14,88 $\pm$ 1,51 (10,5)	142,74 $\pm$ 6,57 (100)
Caldo de EG2	42,79 $\pm$ 3,86 (38,2)	61,44 $\pm$ 5,72 (57,6)	7,67 $\pm$ 1,01 (4,3)	111,90 $\pm$ 9,46 (100)

^a valores entre parênteses representam a porcentagem de cada carboidrato no caldo

4.8 Fermentação alcoólica dos caldos de casca de eucalipto

Os caldos das cascas de eucalipto (HG2 e EG2), e cana de açúcar foram colocados para fermentar com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem Y-904. Após 24 horas de incubação, o rendimento alcoólico e a viabilidade celular foram determinados. Os rendimentos alcoólicos foram de 91,53%, 80,94% e 87,53%, para o caldo de cana, HGU2 e EG2, respectivamente (Figura 20).

Os resultados obtidos no processo de fermentação para as cascas de eucalipto apresentaram alto rendimento fermentativo, valores muito próximos do alcançado com o caldo de cana de açúcar (Figura 20). Lima e Marcondes (2002), destacam que quando se trabalha com substratos complexos o rendimento alcançado pode não ultrapassar 90%. Além dos açúcares solúveis, os caldos das cascas de eucalipto também apresentaram grandes quantidades de extrativos, indicado por uma coloração escura intensa. Embora os rendimentos alcoólicos das cascas de eucalipto foram superiores a 80%, Ando et al. (1986), verificaram que os extrativos podem inibir significativamente o processo fermentativo.

As viabilidades celulares alcançadas para as cascas de eucalipto foram significativamente ($p < 0,05$) maiores que as do caldo de cana (Figura 20). Lima et al. (2001), apontam que diversos fatores físicos e químicos podem afetar a viabilidade celular das leveduras, influenciando diretamente o rendimento alcoólico. Assim, os bons resultados de rendimento alcoólico e viabilidade celular alcançadas pelas cascas de eucalipto podem ter relação direta com a composição química do extrato (caldo), uma vez as cascas de eucalipto apresentaram altos teores de cinzas (nutrientes) (Tabela 10).

A cinza da casca de eucalipto é composta principalmente por cálcio, magnésio e potássio (MIRANDA, 2000; RAMOS, 2003; FOELKEL, 20010). Lima et al. (2001) comenta que além das necessidades das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo as leveduras precisam de outros nutrientes tais como: enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades menores. Segundo Amorim (2005), as células de levedura, durante o processo de fermentação alcoólica, apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente a multiplicação e o crescimento celular e também a eficiência da transformação do açúcar em álcool.

Figura 20 – Rendimento alcoólico e viabilidade celular dos caldos de casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e cana de açúcar (valores expressos em %) (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância)

4.9 Moagem e prensagem das cascas de eucalipto

Tendo em vista a grande quantidade de água presente nas cascas de eucalipto recém coletadas (aproximadamente 70g/100g de casca fresca) (Figura 18b). Este experimento teve como objetivo extrair o maior volume de água da casca de eucalipto HGU3, através de dois processos físicos: moagem e prensagem.

No processo de moagem, foi utilizada casca na forma de lascas (80 x 20cm). Na passagem das cascas pela moenda, em média, para cada 1 kg (casca fresca), foram coletados 200 mL de caldo. A moagem é um processo estritamente volumétrico e consiste em deslocar o caldo contido na casca por meio das moendas. Este deslocamento foi conseguido fazendo a casca passar entre dois rolos, submetidos à determinada pressão e rotação, sendo o volume gerado considerado como volume de caldo extraído (Figura 9b).

Já para o experimento de prensagem, foi utilizada a casca na forma de cavacos (80 x 30mm) (Figura 9a). Para a cada 1 kg de casca fresca, foram coletados 224 mL de caldo. A pressão utilizada na prensa foi de 250kg/cm^2 , esta força esmaga totalmente a casca extraíndo o caldo.

Os volumes dos caldos extraídos foram; 200mL/Kg e 224mL/Kg de casca fresca (TU>70%) para a moenda e prensa, respectivamente. Portanto, o método que utilizou a prensa para extrair o caldo da casca foi 12% mais eficiente.

O caldo da casca de eucalipto HGU3 extraído via moenda e prensa foram analisados via HPAE-PAD (Figura 21).

Figura 21 – Concentração de açúcares solúveis em g/L do caldo de casca (HGU3), extraídos via moenda e prensa (letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância)

A concentração de CST no caldo da prensa foi de 5,86g/L, enquanto a concentração no caldo da moenda foi de 8,75g/L (Figura 21). Este aumento significativo do conteúdo de CST obtido com a moenda pode ser explicado em parte pelo volume adicional extraído na prensa. Este volume adicional (12%), pode ter diluído o caldo.

4.10 Estimativas da produção de etanol a partir dos açúcares solúveis na casca de eucalipto

Com os resultados obtidos anteriormente tais como; concentração de CST, degradação dos CST e rendimento alcoólico, foi possível calcular a produção média de etanol a partir dos açúcares solúveis presentes nas cascas.

Com base nos resultados da concentração de CST, degradação dos CST e rendimento alcoólico para as cascas de eucalipto apresentados na Tabela 10, Figura 18a e Figura 20, respectivamente. Desta maneira, foram calculadas através da Equação 3.3 as produtividades de etanol por tonelada para as cascas de eucalipto secas.

A Tabela 15 apresenta as estimativas de produção de etanol a partir dos açúcares solúveis presentes nas cascas de eucalipto (HGU2 e EG2).

Tabela 15 – Produtividade de etanol a partir dos açúcares solúveis da casca de eucalipto

Biomassas	CST casca seca (% MS) ^a	CST casca fresca (% MS) ^b	Rendimento alcoólico (%)	Estimativa da produção de etanol (litros por tonelada de matéria seca)
HGU2	9,15 (50%)^c	18,30	80,9	95,86
EG2	5,17 (75%)	20,68	87,5	117,16

^a amostra seca, processada após 5 dias de secagem

^b amostra fresca, processada após a coleta

^c valores entre parênteses representam a perda de CST no processo de secagem

A produção média de etanol para os dois clones foi de 106,5 litros por tonelada de massa seca. A produção média de casca dos clones comerciais é em torno de 15 toneladas por hectare. Com enorme quantidade de resíduos poderiam-ser produzidos aproximadamente 1600 litros de etanol por hectare. O processo de produção deste combustível a partir dos açúcares solúveis é considerado combustível de primeira geração (sem ataque da parede celular). Somando-se a isso, após a remoção dos açúcares solúveis fermentescíveis, ainda sobra uma biomassa sólida, que através dos processos (pré-hidrólise e hidrólise) podem ser convertidas em etanol de segunda geração, aumentando consideravelmente a produção de etanol a partir das cascas de eucalipto (Figura 22).

A figura 22 mostra um esquema do processamento da casca de eucalipto para a produção de etanol de primeira geração.

Figura 22 – Balanço de massa para a extração e fermentação dos carboidratos solúveis da casca de eucalipto

4.11 Conteúdo de CST nas cascas de eucalipto submetidas ao anelamento

O objetivo do anelamento foi o de testar a possibilidade de aumentar a concentração dos açúcares solúveis na casca, interrompendo o transporte de seiva para as raízes. Assim, as árvores de eucalipto foram aneladas e após sete dias foi realizada a coleta para quantificar os carboidratos solúveis totais via HPAE-PAD. A Figura 23 apresenta as quantidades de CST nas amostras controles e aneladas para as cascas de eucalipto (EUR01, EUR02 e EG03). Podemos observar, que as amostras de casca aneladas tiveram maior acúmulo de carboidratos. Os incrementos de carboidratos foram de: 93%, 66% e 70%, para EUR01, EUR02 e EG03, respectivamente (Figura

23). Esta técnica de anelamento pode aumentar ainda mais a quantidade de carboidratos, tendo em vista que a concentração dos carboidratos quase duplicaram e a madeira aparentemente não sofreu nenhum dano após os sete dias de tratamento.

Figura 23 – Concentração de carboidratos solúveis nas cascas de eucalipto após anelamento

4.12 Pré-hidrólise dos materiais lignocelulósicos

Embora a hidrólise (ácida ou enzimática) seja a etapa mais importante da conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis, um bom pré-tratamento pode melhorar significativamente o rendimento do processo (McMILLAN, 1994). Desta maneira, a presença de altas concentrações de lignina e hemiceluloses na matriz lignocelulósica limitam a utilização integral das moléculas de celulose (glicose), sendo necessárias etapas que removam eficientemente estes interferentes. Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas, em muitos casos o conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta (biomassa) para então, submetê-la ao processo de hidrólise enzimática (JORGENSEN et al., 2007). A remoção dos interferentes envolve uma série de processos que tem como objetivo desmembrar o complexo lignina-celulose-hemicelulose isolando da celulose (BRASILEIRO et al., 2001).

Desta maneira, a segunda etapa do presente trabalho foi avaliar o comportamento da casca de eucalipto frente aos reagentes químicos comumente utilizados para os processos de pré-hidrólise. Os pré-tratamentos avaliados foram: ácido sulfúrico (H_2SO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinado com ácido sulfúrico, ácido clorídrico (HCl). Foram realizados também pré-

tratamentos sequenciais de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH). Outras variáveis independentes estudadas durante os processos foram: razão sólido:líquido, tempo e temperatura de reação.

4.12.1 Pré-hidrólise da biomassa com ácido sulfúrico (H₂SO₄)

As amostras de cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) *in natura* (moída e peneirada), juntamente com o bagaço de cana foram submetidas a etapa de pré-hidrólise ácida com avaliação das variáveis; relação sólido/líquido (s/l), concentração de ácido sulfúrico (H₂SO₄), temperatura (°C) e tempo (min). Para o estudo das variáveis foi construído um planejamento fatorial 2⁴ de acordo com Rodrigues e Iemma (2005). Os valores utilizados nos ensaios estão apresentados na Tabela 5 e a configuração experimental completa esta descrita no Anexo A. Os carboidratos removidos das cascas de eucalipto e bagaço de cana foram determinados na fase líquida (hidrolisado) via HPAE-PAD. A Tabela 16 apresenta as quantidades de glicose e xilose, bem como a porcentagem destes carboidratos removidos da biomassa original, para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana. Os Anexos E, F e G apresentam os carboidratos com menores concentrações nos hidrolisados das cascas de HGU2, EG2 e bagaço de cana, respectivamente.

Tabela 16 - Ensaios do planejamento experimental (H_2SO_4) com os respectivos conteúdos de glicose e xilose liberados na fase líquida após a pré-hidrólise para a casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b					
	HGU2		EG2		bagaço	
	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose
1	3,47 (7,6) ^a	0,01 (0,1)	1,47 (3,6)	0,01 (0,1)	0,02 (0,0)	0,04 (0,2)
2	3,55 (7,8)	0,01 (0,1)	1,48 (3,6)	0,01 (0,1)	0,01 (0,0)	0,04 (0,2)
3	3,40 (7,5)	3,80 (36,6)	1,49 (3,6)	2,36 (27,3)	0,04 (0,1)	11,28 (48,2)
4	3,57 (7,9)	4,53 (43,6)	1,48 (3,6)	2,89 (33,5)	0,05 (0,1)	11,94 (51,0)
5	4,56 (10,1)	4,86 (46,8)	2,28 (5,5)	3,91 (45,3)	0,19 (0,4)	12,21 (52,2)
6	5,06 (11,2)	5,48 (52,8)	3,69 (8,9)	6,46 (74,7)	0,21 (0,5)	12,44 (53,2)
7	6,18 (13,6)	7,61 (73,3)	2,35 (5,7)	4,21 (48,7)	0,19 (0,4)	11,80 (50,4)
8	6,82 (15,0)	7,99 (77,0)	4,24 (10,2)	6,93 (80,2)	0,22 (0,5)	12,31 (52,6)
9	3,55 (7,8)	0,02 (0,2)	1,37 (3,3)	0,02 (0,2)	0,02 (0,0)	0,11 (0,5)
10	3,77 (8,3)	0,02 (0,2)	1,41 (3,4)	0,02 (0,3)	0,02 (0,0)	0,14 (0,6)
11	3,90 (8,6)	6,12 (59,0)	1,49 (3,6)	4,93 (57,0)	0,10 (0,2)	14,27 (61,0)
12	4,07 (9,0)	6,76 (65,1)	1,57 (3,8)	5,40 (62,5)	0,11 (0,2)	14,74 (63,0)
13	5,79 (12,8)	6,56 (63,2)	3,43 (8,3)	6,58 (76,2)	0,50 (1,1)	12,65 (54,1)
14	6,08 (13,4)	6,87 (66,2)	3,58 (8,7)	6,74 (78,0)	0,58 (1,3)	12,86 (55,0)
15	6,55 (14,5)	7,32 (70,5)	4,31 (10,4)	6,36 (73,6)	2,53 (5,7)	12,64 (54,0)
16	7,23 (15,9)	7,65 (73,7)	4,82 (11,6)	6,64 (76,9)	2,96 (6,7)	13,03 (55,7)
17	4,49 (9,9)	5,49 (52,9)	1,83 (4,4)	3,00 (34,7)	0,14 (0,3)	12,62 (53,9)
18	4,86 (10,7)	6,35 (61,2)	1,98 (4,8)	3,87 (44,8)	0,17 (0,4)	13,41 (57,3)
19	4,22 (9,3)	0,21 (2,1)	1,73 (4,2)	0,17 (2,0)	0,04 (0,1)	1,94 (8,3)
20	15,72 (34,7)	6,92 (66,7)	15,28 (36,9)	6,10 (70,6)	16,11 (36,4)	12,70 (54,3)
21	3,96 (8,7)	0,00 (0,0)	1,62 (3,9)	0,01 (0,1)	0,01 (0,0)	0,02 (0,1)
22	6,89 (15,2)	8,02 (77,3)	4,16 (10,1)	6,77 (78,4)	2,17 (4,9)	13,35 (57,1)
23	4,16 (9,2)	1,12 (10,8)	1,77 (4,3)	0,57 (6,5)	0,04 (0,1)	6,75 (28,9)
24	5,31 (11,7)	6,97 (67,2)	2,55 (6,2)	5,95 (68,8)	0,31 (0,1)	13,60 (58,1)
25	4,71 (10,4)	6,04 (58,2)	1,99 (4,8)	3,83 (44,4)	1,16 (2,6)	13,07 (55,9)
26	4,05 (8,9)	6,01 (57,9)	1,64 (4,0)	5,01 (58,1)	1,01 (2,3)	10,03 (43)
27	6,53 (14,4)	7,98 (76,9)	3,56 (8,6)	6,77 (78,4)	1,58 (3,6)	13,70 (58,6)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicatas

A Figura 24 apresenta um resumo (ensaios - 1, 7, 15, 20 e 27) do planejamento experimental para a conteúdo de xilose removida das cascas de eucalipto (HGU2 e EG) e bagaço de cana.

Figura 24 – Perfil da remoção da xilose (% MS) nos ensaios avaliados para as cascas de eucalipto e bagaço de cana

Entre os carboidratos encontrados nos hidrolisados, a xilose apresenta maiores concentrações (Tabela 16). Hidrolisados hemicelulósicos com altas concentrações de xilose já foram verificados para várias biomassas lignocelulósicas; cavacos de eucalipto (ALMEIDA et al., 2003; CANETTIERI et al., 2002; CARVALHO et al., 2005), bagaço de cana (FELIPE, 1993; NEUREITER et al., 2002) e palha de arroz (ROBERTO et al., 1994). A obtenção de hidrolisados hemicelulósicos com altas concentrações de xilose se deve pelo fato da xilose ser facilmente hidrolisada em função da sua estrutura amorfa na parede celular (CANETTIERI, 2004).

Podemos observar na Figura 24 que a concentração de xilose removida nos ensaios foi maior para o bagaço de cana do que para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2). Porém, as cascas de eucalipto apresentaram maiores taxas de eficiência na remoção da xilose (Tabela 16). Desta maneira, o pré-tratamento desenvolvido, removeu mais xilose das cascas de eucalipto do que do bagaço. Por exemplo, no ensaio 15 (sol:liq; 1:7, H₂SO₄; 8,33 mol/L, T; 70°C, t; 48min) os valores de xilose liberada foram: 7,32%, 6,36% e 12,64%, para o HGU2, EG2 e bagaço, respectivamente (Figura 24). No entanto, estes valores representam 70,5%, 73,0% e 54,0% da xilose removida do material original, para HGU2, EG2 e bagaço, respectivamente.

Assim, as biomassas residuais (massa que sobrou após o pré-tratamento) para as cascas de eucalipto ficaram com uma característica desejável em etapas de pré-tratamento, ou seja, baixo conteúdo de hemiceluloses. Lohmeier-Voger et al. (1998), comentam que altas concentrações de xilose na biomassa residual produz inibidores para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo.

A Figura 25 apresenta um resumo (ensaios - 1, 7, 15, 20 e 27) do planejamento experimental para a conteúdo de glicose removida das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana. O hidrolisado proveniente do bagaço de cana apresentou baixo conteúdo de glicose comparado com as cascas de eucalipto (Figura 25). Para a interpretação destes resultados, é importante salientar que as cascas utilizadas neste experimento foram as *in natura* (moída e peneirada). Estas cascas contêm altas concentrações de carboidratos solúveis (glicose, frutose e sacarose) (Tabela 10). Portanto, grande parte da glicose removida nos ensaios para as cascas pode ter origem neste grupo de carboidratos e não da parede celular. Como o bagaço não tem CST, as diferenças são mais pronunciadas (Figura 25). Embora, as diferenças diminuam a medida que se utiliza maiores concentrações de ácido sulfúrico, como pode ser observado no ensaio 20 da Figura 25.

Figura 25 – Perfil da remoção da glicose (% MS) nos ensaios avaliados para as cascas de eucalipto e bagaço de cana

A Tabela 17 apresenta os resultados das hexoses e pentose, bem como a razão hexoses/pentoses (H/P), para as cascas HGU2, EG2 e bagaço de cana. Os valores de H/P em todos os ensaios foram maiores para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) em comparação ao

bagaço de cana. Estas diferenças, novamente podem ter sido em função dos altos teores de carboidratos solúveis presentes nas cascas de eucalipto.

Tabela 17 - Ensaios do planejamento experimental (H_2SO_4) com os respectivos conteúdos de hexoses (C6), pentoses (C5) e a razão Hex/Pent para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e para o bagaço (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	HGU2			EG2			bagaço		
	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent ^a	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent
1	7,31	0,90	8,15	3,52	0,85	4,12	0,04	0,97	0,04
2	7,44	1,00	7,43	3,57	0,90	3,95	0,04	1,01	0,04
3	6,78	5,20	1,31	3,55	3,81	0,93	0,16	12,49	0,01
4	7,29	6,05	1,20	3,55	4,38	0,81	0,19	13,32	0,01
5	8,66	6,41	1,35	5,31	5,84	0,91	0,47	13,79	0,03
6	9,63	7,25	1,33	5,93	8,16	0,73	0,51	14,09	0,04
7	8,15	8,95	0,91	5,49	6,20	0,89	0,50	13,59	0,04
8	8,93	9,50	0,94	6,74	8,83	0,76	0,56	14,26	0,04
9	7,53	1,19	6,33	3,31	1,21	2,73	0,07	1,13	0,06
10	8,26	1,40	5,90	3,41	1,32	2,59	0,06	1,54	0,04
11	8,09	7,74	1,05	3,53	6,24	0,57	0,28	15,47	0,02
12	8,57	8,50	1,01	3,71	6,81	0,55	0,30	16,03	0,02
13	10,34	8,32	1,24	6,46	8,54	0,76	0,92	14,60	0,06
14	11,11	8,73	1,27	6,69	8,77	0,76	1,03	14,97	0,07
15	8,08	8,78	0,92	6,19	8,13	0,76	2,95	14,81	0,20
16	8,90	9,32	0,95	6,79	8,52	0,80	3,42	15,42	0,22
17	9,14	7,26	1,26	4,53	4,81	0,94	0,40	14,28	0,03
18	10,16	8,39	1,21	4,94	5,91	0,84	0,48	15,34	0,03
19	9,61	2,15	4,47	4,38	2,05	2,14	0,15	3,54	0,04
20	17,65	8,24	2,14	16,90	7,47	2,26	16,42	14,31	1,15
21	9,06	0,72	12,60	4,19	0,80	5,26	0,03	1,03	0,03
22	8,81	9,99	0,88	6,30	8,84	0,71	2,64	15,88	0,17
23	9,36	3,05	3,06	4,48	2,50	1,79	0,16	8,35	0,02
24	10,35	8,92	1,16	5,86	7,97	0,74	0,68	15,58	0,04
25	9,92	7,98	1,24	4,97	5,85	0,85	0,44	14,88	0,03
26	10,42	8,32	1,25	4,98	5,44	0,92	0,48	14,69	0,03
27	12,09	9,56	1,27	4,88	5,80	0,84	0,68	15,99	0,04

^a razão entre hexoses e pentoses

Os resultados obtidos no planejamento experimental fatorial para a razão H/P foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Através dos resultados (*p* valor), podemos observar que das variáveis independentes estudadas, somente a concentração de H₂SO₄ e a temperatura tiveram efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), e nenhum efeito foi verificado para o bagaço de cana (Tabela 18). A razão H/P para as cascas de eucalipto e bagaço de cana também foram analisados nas curvas de contorno em função da concentração de H₂SO₄ (3,33- 10 M) e temperatura (25-85°C) (Figura 24).

Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para os valores da razão H/P após a pré-hidrólise para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana de açúcar

	Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	<i>p</i> valor	<i>R</i> ²
HGU2	Sol:Liq	5	0,750405	0,150081	0,09	0,9938	0,9180
	H ₂ SO ₄	5	67,727425	13,545485	7,80	0,0001	
	Temperatura	5	176,733614	35,346723	20,34	0,0000	
	Tempo	5	5,015042	1,003008	0,58	0,7169	
E2	Sol:Liq	5	0,090763	0,018153	0,04	0,9990	0,8800
	H ₂ SO ₄	5	12,678534	2,535707	5,69	0,0011	
	Temperatura	5	32,591177	6,518235	14,63	0,0000	
	Tempo	5	2,370215	0,474043	1,06	0,4027	
bagaço	Sol:Liq	5	0,000685	0,000137	0,00	1,0000	0,5970
	H ₂ SO ₄	5	0,499854	0,099971	2,44	0,0612	
	Temperatura	5	0,053149	0,010630	0,26	0,9312	
	Tempo	5	0,014318	0,002864	0,07	0,9962	

Nas curvas de contorno da razão H/P para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), os maiores valores foram alcançados na condição de baixa concentração de ácido sulfúrico e baixa temperatura (Figura 26). Já para o bagaço de cana os maiores valores da H/P ocorreram em condição de altas concentrações de ácido e temperatura (Figura 26).

Figura 26 – Curvas de contorno para a razão H/P em função da concentração de H₂SO₄ (%) e temperatura (°C), para a casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Podemos observar nestes resultados, que as cascas de eucalipto em condições de baixa concentração de ácido sulfúrico liberaram mais carboidratos fermentescíveis (hexoses) que o bagaço de cana. Estas diferenças nos contornos de linhas apresentados na Figura 26 para as cascas de eucalipto e bagaço são provavelmente devidas às cargas adicionais de carboidratos solúveis que as cascas de eucalipto possuem.

4.12.2 Pré-hidrólise da biomassa com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) combinado com ácido sulfúrico (H₂SO₄)

Neste experimento, as cascas de eucalipto *in natura* (HGU2 e EG2), juntamente com o bagaço de cana sofreram o processo de pré-hidrólise com avaliação das seguintes variáveis: ácido sulfúrico (H₂SO₄), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e temperatura (°C). Para o estudo destas variáveis foi construído um planejamento fatorial 2³ de acordo com Rodrigues e Iemma (2005). Os carboidratos foram determinados na fase sólida (biomassa residual) via HPAE-PAD através da hidrólise com H₂SO₄ (12 mol/L).

O ponto de partida para este experimento foi o trabalho desenvolvido por Rabelo et al. (2008). Estes pesquisadores submeteram o bagaço de cana à pré-hidrólise com peróxido de

hidrogênio em meio alcalino. Assim, o objetivo deste experimento foi verificar o comportamento das biomassas (cascas de eucalipto e bagaço de cana) frente ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio combinado com ácido sulfúrico (peróxido de hidrogênio ácido).

Os primeiros dados coletados foram as perdas de massas em função do processo hidrolítico. Sabe-se que nos processos de pré-hidrólise devido a solubilização dos polissacarídeos e outros componentes ocorre a redução da massa da matriz lignocelulósica. A Tabela 19 apresenta o conteúdo de biomassa residual, bem como o conteúdo de lignina insolúvel presente em cada ensaio para os materiais lignocelulósicos.

Tabela 19 - Ensaios do planejamento experimental ($H_2SO_4 + H_2O_2$) com os respectivos conteúdos de biomassa residual (resíduo) após a pré-hidrólise e lignina insolúvel no resíduo para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e para o bagaço (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	HGU2		EG2		bagaço	
	<i>Biomassa Residual^a</i>	<i>Lignina Insolúvel^b</i>	<i>Biomassa Residual</i>	<i>Lignina Insolúvel</i>	<i>Biomassa Residual</i>	<i>Lignina Insolúvel</i>
1	67,19	24,16	63,16	23,90	94,76	29,23
2	58,25	18,39	56,26	18,62	77,50	27,69
3	64,79	23,05	61,37	20,69	93,01	25,21
4	42,61	10,90	42,87	8,21	63,40	24,51
5	61,49	23,36	59,56	22,50	82,61	30,89
6	41,58	12,23	48,39	15,80	63,21	27,66
7	55,82	18,11	51,89	16,35	74,63	28,51
8	33,30	3,11	34,52	4,82	49,51	13,29
9	65,08	22,77	63,86	22,24	92,39	25,35
10	38,47	11,56	33,79	5,99	55,21	16,32
11	63,35	22,01	62,42	23,23	83,01	39,10
12	43,17	10,26	42,56	9,23	65,24	20,44
13	63,93	20,65	61,32	20,91	93,58	28,49
14	55,57	18,10	35,97	7,53	59,96	23,04
15	40,36	9,27	55,91	18,72	75,51	24,69
16	39,12	9,12	54,63	17,96	76,56	25,23
17	41,23	8,32	55,01	19,01	74,89	24,50

^a massa resultante após o processo de pré-hidrólise

^b Lignina determinada por gravimetria após hidrólise da biomassa residual com ácido sulfúrico 72%

A Figura 27 apresenta um resumo (ensaios - 1, 7, 15, 20 e 27) do planejamento experimental para o conteúdo de biomassa residual gerada na pré-hidrólise com peróxido de hidrogênio ácido para as cascas de eucalipto (HGU2 EG2) e bagaço de cana. Podemos observar na Figura 27, que o bagaço de cana apresentou altos valores de biomassa residual em comparação com as cascas de eucalipto. Esta perda substancial de massa pelas cascas de eucalipto, pode ser explicada pelas altas concentrações de compostos solúveis presentes na casca de eucalipto (ex: extrativos). Assim, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio ácido removeu grandes partes destas substâncias e também uma expressiva fração dos componentes estruturais (hemiceluloses e ligninas). Portanto, as cascas de eucalipto por apresentarem maiores concentrações de substâncias solúveis tiveram maiores perdas de massa observadas (Figura 27).

Figura 27 – Perfil da biomassa residual (resíduo em % MS) após a pré-hidrólise com peróxido de hidrogênio ácido para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Um dos objetivos básicos dos processos de pré-hidrólise é produzir uma biomassa residual com características químicas apropriadas para uma adequada etapa de hidrólise (ácida ou enzimática) (McMILLIAN, 1994). Assim, um dos parâmetros desejados é que a biomassa residual tenha baixo conteúdo de lignina. A Figura 28 apresenta um resumo da quantidade de lignina insolúvel presente nas cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e no bagaço de cana após o processo pré-hidrolítico com peróxido de hidrogênio ácido.

Podemos observar na Figura 28, que após o processo pré-hidrolítico com peróxido de hidrogênio ácido, a biomassa residual do bagaço apresentou maiores concentrações de lignina insolúvel do que as cascas de eucalipto. O peróxido de hidrogênio é frequentemente utilizado como forte agente oxidante na indústria de celulose e papel, com objetivo de branquear a polpa celulósica, removendo frações de lignina residual. Assim, pelos resultados obtidos, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio ácido, além de remover grande parte dos compostos solúveis, ainda removeu uma fração da lignina insolúvel presentes na cascas de eucalipto (Figura 28).

Figura 28 – Perfil da lignina insolúvel (% MS) do resíduo proveniente da pré-hidrólise com peróxido de hidrogênio ácido para as cascas de eucalipto (*Ehgu* e *Eg*) e bagaço de cana

Os carboidratos presentes nas biomassas residuais para as cascas de eucalipto e bagaço foram determinados por hidrólise ácida (H_2SO_4 - 12 mol/L) seguido de injeção do cromatógrafo (HPAE-PAD). A Tabela 20 apresenta o conteúdo de glicose e xilose presente na biomassa residual após o pré-tratamento para as cascas de eucalipto e bagaço de cana. O Anexo H apresenta outros carboidratos determinados (arabinose e galactose) para o HGU2 e EG2 e bagaço.

Tabela 20 - Ensaios do planejamento experimental ($H_2SO_4 + H_2O_2$) com os respectivos conteúdos dos carboidratos (glicose e xilose) presentes no resíduo sólido após a pré-hidrólise das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos % (MS) ^a					
	HGU2		EG2		bagaço	
	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose
1	43,4	11,3	48,1	9,4	42,3	21,5
2	47,5	10,7	52,2	8,9	54,4	13,7
3	43,2	11,5	47,5	9,8	45,6	22,0
4	66,8	4,2	72,9	3,7	62,9	6,9
5	45,3	10,5	49,8	9,1	49,1	16,0
6	70,5	2,9	64,7	2,4	62,5	5,2
7	52,9	9,4	56,5	7,8	56,1	11,7
8	76,6	1,8	80,7	1,7	74,8	2,7
9	43,6	10,7	51,4	9,3	40,3	21,5
10	72,8	2,0	89,3	1,1	68,1	4,2
11	36,6	9,5	52,0	8,5	38,6	14,0
12	64,8	4,6	73,3	4,5	60,5	8,5
13	42,9	11,7	53,7	10,2	43,1	21,6
14	46,8	9,4	80,3	3,1	60,4	5,1
15	67,7	3,4	58,2	7,9	50,0	13,4
16	66,8	3,4	60,3	8,1	51,1	12,9
17	65,0	3,2	59,2	7,8	50,1	12,3

^a média em triplicata

Com os dados de carboidratos, foram calculados os valores para a razão H/P. A Tabela apresenta os valores de hexoses e pentoses, bem como a razão H/P para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana. A Figura 29 apresenta um resumo dos ensaios do planejamento experimental com os valores da razão H/P para as cascas de eucalipto e bagaço de cana. As biomassas residuais das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) apresentaram em média maiores valores para a razão H/P se comparado com bagaço de cana. Estes resultados podem ser explicados pelo baixo conteúdo de pentoses na parede celular das casca de eucalipto, principalmente xilose (Tabela 10).

Tabela 21 – Ensaios do planejamento experimental ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) com os respectivos conteúdos de hexoses (C6), pentoses (C5) e a razão H/P presentes na biomassa residual após a pré-hidrólise para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e para o bagaço (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	HGU2			EG2			bagaço		
	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent ^a	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent	Hexoses (C6)	Pentoses (C5)	Hex/Pent
1	44,5	11,8	3,8	49,3	9,9	5,0	42,7	22,4	1,9
2	48,2	10,8	4,4	53,0	9,1	5,9	54,5	13,9	3,9
3	44,1	11,9	3,7	48,6	10,2	4,8	45,9	22,7	2,0
4	67,2	4,3	15,7	73,3	3,8	19,4	63,0	7,0	8,9
5	45,9	10,6	4,3	50,5	9,3	5,4	49,2	16,4	3,0
6	70,5	3,0	23,5	64,8	2,5	26,1	62,5	5,3	11,8
7	53,4	9,9	5,4	57,1	7,9	7,2	56,2	11,9	4,7
8	76,6	1,9	40,3	80,8	1,8	45,9	74,8	2,8	27,1
9	44,3	11,0	4,0	52,6	9,9	5,3	40,5	22,2	1,8
10	72,9	2,1	34,9	89,4	1,2	72,5	68,1	4,3	15,8
11	37,1	9,7	3,8	52,9	8,7	6,1	38,7	14,3	2,7
12	65,0	4,7	13,9	73,6	4,6	16,0	60,6	8,7	7,0
13	43,9	12,1	3,6	54,8	10,5	5,2	43,3	22,4	1,9
14	47,3	9,5	5,0	80,4	3,2	25,1	60,4	5,2	11,6
15	67,8	3,5	19,3	58,8	8,0	7,3	51,2	13,2	3,9
16	66,9	3,6	18,9	60,4	8,3	7,3	51,2	13,2	3,9
17	65,0	3,5	18,8	60,0	8,0	7,5	50,2	12,5	4,0

^a razão entre o conteúdo de hexoses e pentoses

As cascas de eucalipto apresentaram maiores valores de H/P nas biomassas residuais (Tabela 21 e Figura 29). Estes valores podem ser explicados por dois fatores, pelos baixos teores que as cascas apresentam de xilose, e também pela ação mais eficiente do combinado de ácido e peróxido na parede celular. Sabe-se que os pré-tratamentos ácidos removem mais facilmente as hemiceluloses (xilose) (FENGEL; WEGENER, 1989). E no caso das cascas de eucalipto, esta alta remoção pode ser pelo fato deste tecido ser composto de quase 60% de células de parênquima (ANGYLOSSI-ALFONSO, 1987). Geralmente a parede celular das células parênquimáticas são finas e pouco lignificadas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Desta maneira, a pré-

hidrólise desenvolvida com peróxido de hidrogênio ácido para as cascas de eucalipto propiciaram uma biomassa residual com características adequadas para uma hidrólise (ácida ou enzimática), pois o resíduo sólido apresentava mais unidades de glicose por unidade de xilose (Figura 29).

Figura 29 - Perfil da razão H/P do resíduo proveniente da pré-hidrólise com peróxido de hidrogênio ácido para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Os resultados obtidos no planejamento experimental para a razão H/P para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), juntamente com o bagaço de cana foram avaliados na análise de variância (ANOVA) (Tabela 22).

Tabela 22 – Análise de variância (ANOVA) para os valores da razão H/P no resíduo sólido após a pré-hidrólise para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana de açúcar

	Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	p valor	R ²
HGU2	H ₂ SO ₄	4	1345,175856	336,293964	20,32	0,0000	0,9461
	H ₂ O ₂	4	379,339043	94,834761	5,73	0,0047	
	Temperatura	4	635,283472	158,820868	9,60	0,0004	
EG2	H ₂ SO ₄	4	4036,285373	1009,071343	14,36	0,0000	0,9085
	H ₂ O ₂	4	333,630396	83,407599	1,19	0,3542	
	Temperatura	4	776,469322	194,117330	2,76	0,0640	
bagaço	H ₂ SO ₄	4	440,469263	110,117316	27,67	0,0000	0,9606
	H ₂ O ₂	4	123,407031	30,851758	7,75	0,0011	
	Temperatura	4	250,730442	62,682610	15,75	0,0000	

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que as variáveis peróxido de hidrogênio e temperatura não tiveram efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade para a casca EG2 (Tabela 22). Embora, a casca de eucalipto (EG2) tenha apresentado boa correlação linear (R^2), resultados obtidos acima de 0,9 (Tabela 22).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para os resultados da razão H/P para as biomassas avaliadas (Figura 30). Desta maneira, pode se observar na Figura 30 que os altos valores da razão H/P para o HGU2, EG2 e bagaço de cana, somente foram alcançados submetendo os materiais a elevadas concentrações de reagentes (ácido e peróxido). Embora, a casca HGU2 tenha apresentado altos valores da razão H/P em condições de menor concentração de reagente utilizado, o planejamento não foi adequado, pois as maiores razões H/P não foram alcançadas (Figura 30). Assim, os pontos máximos de H/P estão acima dos avaliados neste trabalho.

Figura 30 - Metodologia de superfície de resposta H/P (MSR) para a casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana em função da concentração de ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio (temperatura 50°C)

Com os resultados obtidos no planejamento experimental, foram calculadas as quantidades de carboidratos fermentescíveis (hexoses) na fase sólida para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2), juntamente com o bagaço de cana. Os resultados foram avaliados na análise de variância (ANOVA) (Tabela 23).

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) para os valores de carboidratos fermentescíveis no resíduo sólido após a pré-hidrólise para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana de açúcar

	Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	p valor	R ²
HGU2	H ₂ SO ₄	4	1230,437326	307,609331	7,40	0,0014	0,9461
	H ₂ O ₂	4	738,329008	184,582252	4,44	0,0133	
	Temperatura	4	660,482217	165,120554	3,97	0,0201	
EG2	H ₂ SO ₄	4	1401,827665	350,456916	8,82	0,0006	0,9085
	H ₂ O ₂	4	562,550131	140,637533	3,54	0,0299	
	Temperatura	4	407,698861	101,924715	2,56	0,0784	
bagaço	H ₂ SO ₄	4	905,811349	226,452837	18,69	0,0000	0,9606
	H ₂ O ₂	4	350,907149	87,726787	7,24	0,0016	
	Temperatura	4	341,421066	85,355266	7,04	0,0018	

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que somente a variável temperatura não teve efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade para a casca EG2 (Tabela 23). A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para os valores de carboidratos fermentescíveis para as biomassas avaliadas (Figura 31). Desta maneira, pode se observar na Figura 31 que os altos valores de carboidratos fermentescíveis para o HGU2, EG2 e bagaço de cana, somente foram alcançados submetendo os materiais a elevadas concentrações de reagentes (ácido e peróxido). Embora, casca HGU2 apresente uma MRS com pontos de máxima concentração de fermentescíveis próximas do planejamento adotado. Porém, igualmente a MSR da razão H/P, o planejamento também não foi adequado.

Figura 31 - Metodologia de superfície de resposta para os carboidratos fermentescíveis (MSR) para a casca de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana em função da concentração de ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio (temperatura 50°C)

4.12.3 Pré-hidrólise da biomassa com ácido clorídrico (HCl)

Neste experimento as cascas de eucalipto livres de extrativos (HGU2 e EG2), juntamente com o bagaço de cana sofreram o processo de pré-hidrólise com avaliação das seguintes variáveis independentes; ácido clorídrico (HCl), temperatura e tempo. O perfil do planejamento experimental está descrito na Tabela 7 de acordo com Rodrigues e Iemma (2005). Após o pré-tratamento, os carboidratos foram determinados na fase líquida (hidrolisado) e também na fase sólida (biomassa residual). A composição química da biomassa residual foi determinada através da hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L) via HPAE-PAD.

Tabela 24 - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de biomassa residual após a pré-hidrólise e lignina insolúvel da biomassa residual para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Biomassa Residual ^a (% MS)			Lignina Insolúvel ^b (% MS)		
	HGU2	EG2	bagaço	HGU2	EG2	bagaço
1	81,05 ^c	63,55		18,95	36,45	
2	72,44	57,00		27,56	43,00	
3	72,53	57,73		27,47	42,27	
4	68,53	54,02		31,47	45,98	
5	75,24	62,18	79,82	24,76	37,82	32,36
6	67,33	56,77	68,51	32,67	43,23	35,89
7	67,00	57,36		33,00	42,64	
8	64,48	53,97		35,52	46,03	
9	76,67	63,65	76,63	23,33	36,35	31,39
10	59,19	47,72		40,81	52,28	
11	70,44	57,44		29,56	42,56	
12	64,72	52,59	65,76	35,28	47,41	36,81
13	67,83	55,73		32,17	44,27	
14	64,96	55,19	67,33	35,04	44,81	36,06
15	65,51	53,99		34,49	46,01	
16	64,63	53,73		35,37	46,27	
17	65,46	54,40		34,54	45,60	

^a massa resultante após o processo de pré-hidrólise

^b lignina determinada por gravimetria após a hidrólise da biomassa residual com ácido sulfúrico 72%

^c média em triplicata

A Tabela 24 apresenta a biomassa residual bem como a lignina insolúvel presente em cada ensaio para os materiais lignocelulósicos. Para o bagaço de cana foram realizados somente 5 ensaios (ensaios 5, 6, 9, 12 e 14).

A Figura 32 apresenta um resumo (ensaios - 5, 6, 9, 12 e 14) do planejamento experimental para o conteúdo de biomassa residual gerada na pré-hidrólise com ácido clorídrico para as cascas de eucalipto (HGU2 EG2) e bagaço de cana.

Podemos observar na Figura 32, que o bagaço de cana apresentou maiores valores de biomassa residual em comparação com a casca EG2. As perdas de massa que ocorrem neste experimento são exclusivamente por remoção de componentes da parede celular. Uma vez que, os materiais usados neste experimento estavam livres de compostos solúveis (ex: extrativos e carboidratos solúveis).

Figura 32 - Perfil da biomassa residual (resíduo em % MS) após a pré-hidrólise com ácido clorídrico para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

4.12.3.1 Determinação dos carboidratos da fase líquida (hidrolisado)

Os principais carboidratos foram determinados na fase líquida (hidrolisado) e estão apresentados na Tabela 25. Os Anexos J, K e L apresentam os conteúdos removidos dos carboidratos de menor concentração para as cascas de eucalipto HGU2, EG2 e bagaço de cana, respectivamente.

Tabela 25 - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase líquida (hidrolisado), após pré-hidrólise das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b					
	HGU2		EG2		bagaço	
	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose
1	0,58 (1,4) ^a	0,97 (9,3)	0,28 (0,4) ^a	0,75 (8,6)		
2	1,72 (4,1)	11,05 (100)	0,64 (1,6)	7,41 (85,8)		
3	1,57 (3,7)	9,42 (90,7)	0,60 (1,5)	5,97 (69,1)		
4	2,49 (5,9)	12,89 (100)	1,21 (3,1)	8,77 (100)		
5	0,82 (2,0)	3,18 (30,6)	0,33 (0,8)	1,60 (18,6)	0,12 (0,3)	1,50 (18,6)
6	1,94 (4,6)	11,72 (100)	0,74 (1,9)	8,09 (93,7)	0,66 (1,5)	24,90 (100)
7	1,86 (4,4)	10,39 (100)	0,71 (1,8)	7,30 (84,5)		
8	2,74 (6,5)	11,86 (100)	1,37 (3,5)	8,57 (99,1)		
9	0,67 (1,6)	1,43 (13,8)	0,27 (0,7)	0,72 (8,4)	0,08 (0,2)	7,43 (31,8)
10	11,12 (26,5)	7,93 (76,4)	8,23 (20,8)	6,17 (71,4)		
11	1,27 (3,0)	8,70 (83,8)	0,55 (1,4)	6,77 (78,4)		
12	2,96 (7,1)	11,86 (100)	1,45 (3,7)	7,96 (92,1)	1,82 (4,1)	23,00 (98,3)
13	1,93 (4,6)	11,67 (100)	0,71 (1,8)	8,00 (92,6)		
14	2,27 (5,4)	12,04 (100)	0,99 (2,5)	9,03 (100)	1,19 (2,7)	25,02 (100)
15	2,14 (5,1)	12,31 (100)	0,84 (2,1)	8,47 (98,1)		
16	2,22 (5,3)	12,54 (100)	0,85 (2,2)	8,62 (99,8)		
17	2,18 (5,2)	12,29 (100)	0,88 (2,2)	8,96 (100)		

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicatas

A Figura 33 apresenta um resumo do planejamento fatorial (ensaios - 5, 6, 9, 12 e 14) para a porcentagem de remoção da glicose para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana. A casca HGU2 apresentou maiores porcentagens de remoção da glicose em relação a casca EG2 e ao bagaço (Figura 33). Por exemplo, no ensaio número 12, o HGU2 teve aproximadamente 7% da glicose removida, enquanto que a casca EG2 e o bagaço de cana tiveram uma remoção ao redor de 4%.

Desta maneira, a parede celular do HGU2 sofreu maior ação do ácido clorídrico que a casca EG2 e o bagaço de cana. A glicose determinada nesta análise foi exclusivamente da degradação da parede celular, uma vez que os materiais utilizados neste experimento estavam livres de quaisquer componentes solúveis.

Figura 33 – Conteúdo de glicose removida após pré-tratamento com ácido clorídrico (HCl)

4.12.3.2 Determinação dos carboidratos da fase sólida (biomassa residual)

A composição química da biomassa residual foi determinada através da hidrólise ácida (H_2SO_4 12 mol/L) via HPAE-PAD. A Tabela 27 apresenta a concentração dos principais carboidratos da fase sólida para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana. Os Anexos M, N e O apresentam os conteúdos dos carboidratos de menores concentrações para as cascas de eucalipto HGU2, EG2 e bagaço de cana, respectivamente.

Após a etapa de pré-hidrólise com ácido clorídrico as biomassas residuais das cascas de eucalipto apresentaram maiores proporções de glicose (açúcar fermentescível) por unidade de xilose (Tabela 28). A quantidade de glicose que ficou na biomassa foi avaliada na análise de variância (ANOVA) (Tabela 26).

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) para os valores de glicose no resíduo sólido após a pré-hidrólise para as cascas de eucalipto HGU2 e EG2

	Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	p valor	R ²
HGU2	HCl	4	72,105273	18,026318	0,27	0,8954	
	Temperatura	4	196,646891	49,161723	0,73	0,5872	0,9461
	Tempo	4	128,882139	32,220535	0,48	0,7531	
EG2	HCl	4	476,523124	119,130781	3,70	0,0258	
	Temperatura	4	1696,155910	424,038977	13,16	0,0001	0,9085
	Tempo	4	1496,387350	374,096837	11,61	0,0001	

Os resultados de glicose tiveram efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade somente para a casca HGU2 (Tabela 26). A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para os valores de glicose para as duas cascas de eucalipto (Figura 34).

Figura 34 – Curvas de contorno do conteúdo de glicose para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) função da concentração de ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio (temperatura 50°C)

O planejamento realizado com ácido clorídrico não foi satisfatório, pois as máximas concentrações de glicose na biomassa residual estão fora da faixa analisada.

Embora, tenha sido realizado somente alguns ensaios para o bagaço, podemos observar que este material apresentou maiores quantidades glicose que as cascas de eucalipto. Porém a razão glicose/xilose foi maior para as cascas de eucalipto (Tabela 27). A Tabela 28 apresenta a razão glicose xilose para as cascas de eucalipto e bagaço de cana.

Tabela 27 - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase sólida (biomassa residual), após pré-hidrólise das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos (%MS) ^a					
	HGU2		EG2		bagaço	
	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>
1	47,11	5,70	57,43	5,32		
2	54,25	1,27	62,44	1,17		
3	53,61	2,22	59,26	1,89		
4	59,64	0,56	28,52	0,48		
5	50,84	3,99	26,93	3,86	60,94	6,17
6	64,03	0,88	30,07	0,86	63,38	1,41
7	65,52	1,70	63,11	1,52		
8	59,13	0,41	64,64	0,39		
9	43,23	5,44	55,99	5,20	58,86	9,21
10	39,18	0,10	39,12	0,11		
11	45,04	1,78	41,10	1,39		
12	52,46	0,37	47,46	0,31	65,92	0,63
13	48,56	1,06	49,63	1,02		
14	50,16	0,56	49,48	0,50	66,81	0,72
15	47,93	0,78	47,30	0,75		
16	48,95	0,69	48,90	0,74		
17	49,93	0,74	47,15	0,74		

^a valores médios em triplicata

Tabela 28 - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos de glicose, xilose e a razão Gli/Xil na biomassa residual após pré-hidrólise das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos (%MS) ^a								
	HGU2			EG2			bagaço		
	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>	<i>Gli/Xil</i>	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>	<i>Gli/Xil</i>	<i>Glicose</i>	<i>Xilose</i>	<i>Gli/Xil</i>
5	50,84	3,99	12,8	26,93	3,86	7,0	60,94	6,17	9,9
6	64,03	0,88	72,8	30,07	0,86	34,9	63,38	1,41	45,0
9	43,23	5,44	8,0	55,99	5,20	10,8	58,86	9,21	6,4
12	52,46	0,37	142,0	47,46	0,31	154,1	65,92	0,63	104,6
14	50,16	0,56	89,7	49,48	0,50	98,9	66,81	0,72	92,8

^a valores médios em triplicata

4.12.4 Determinação dos carboidratos nas biomassas pré-tratas com HCl e NaOH

Esta etapa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a eficiência da hidrólise enzimática nas biomassas (cascas de eucalipto e bagaço de cana) pré-tratadas. Foram desenvolvidos 3 tipos de pré-tratamentos sequenciais (I, II e III) juntamente com pré-tratamento controle, para as cascas de eucaliptos (HGU2 e EG2) e também do bagaço de cana-de-açúcar, como descrito no item 3.10.4 (Figura 10).

A presença de altas concentrações de lignina e hemiceluloses na matriz lignocelulósica limitam a utilização integral das moléculas de glicose pelas enzimas. Assim, a fim de garantir uma maior eficiência no processo de hidrólise, torna-se necessária a remoção prévia da lignina e hemiceluloses presentes no substrato (biomassa lignocelulósica). O processo de remoção das hemiceluloses da biomassa geralmente envolve o tratamento com ácidos minerais (LIAO et al., 2006; CARA et al., 2008). E para a remoção das ligninas são utilizados pré-tratamentos de base alcalina (CARRILHO et al., 2005). Este último processo possibilita a remoção de grande parte da lignina presente na matriz lignocelulósica, principalmente por meio das reações de clivagem das ligações químicas pelos ânions hidróxidos que quebram a macromolécula de lignina em fragmentos menores, tornando-as solúveis nos meios aquoso e alcalino (McMILLAN, 1994; BAPTISTA et al., 2008). Entretanto, sabe-se que no processo de hidrólise, a degradação da lignina forma vários compostos de natureza fenólica com alto poder de inibição dos processos de fermentação alcoólica (PALMQVIST et al., 2000).

Após a etapa de pré-tratamento, as biomassas pré-tratadas (controle, I, II e III) tiveram a composição química determinada. Desta maneira, foram quantificados os componentes químicos estruturais das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e do bagaço de cana (Tabela 29).

Tabela 29 - Composição química das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana, após as diferentes etapas de pré-tratamento

Pré-tratamentos	Material Lignocelulósico	Componentes químicos (% MS)					
		Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Carboidratos Totais	Lignina Insolúvel*
controle	HGU2	0,84	1,27	42,14	8,40	53,02	22,96
	EG2	0,88	1,38	40,39	6,62	49,67	22,36
	bagaço	1,18	0,31	41,22	21,57	64,40	23,18
I	HGU2	0,02	0,09	50,44	1,97	52,61	31,47
	EG2	0,02	0,11	50,28	1,86	52,30	29,40
	bagaço	0,33	0,08	50,51	4,49	55,52	33,88
II	HGU2	0,05	0,10	76,08	1,27	77,63	14,55
	EG2	0,03	0,16	75,10	0,95	76,27	16,32
	bagaço	0,10	0,03	77,77	1,43	79,46	24,29
III	HGU2	0,25	0,54	50,64	7,53	59,01	13,75
	EG2	0,34	0,86	50,21	6,02	58,44	16,91
	bagaço	0,98	0,18	55,31	11,29	67,83	18,73

*Lignina Insolúvel = massa residual após hidrólise com ácido sulfúrico

De acordo com os resultados apresentados, a lavagem da biomassa *in natura* (original) com água quente (controle), não causou nenhuma alteração significativa na sua composição química. Na sequência, o pré-tratamento (I) foi desenvolvido para remover as hemiceluloses das matrizes lignocelulósicas. Como pode ser observado na Tabela 29, após este pré-tratamento as concentrações de xilose foram reduzidas em cerca de 70%.

O pré-tratamento (II) foi o tratamento sequencial que deixou a biomassa com maior porcentagem de glicose, ao remover grande parte da lignina e hemiceluloses. Os valores médios de glicose em porcentagem por matéria seca (MS) para as cascas HGU2, EG2 e bagaço, foram: 76,08%, 75,10% e 77,77%, respectivamente (Tabela 29). Neste mesmo pré-tratamento (II),

podemos observar que o hidróxido de sódio (NaOH) ainda removeu uma pequena parcela de hemiceluloses.

Para finalizar, o pré-tratamento (III) foi desenvolvido para remover somente a lignina e assim avaliar sua real influência na etapa de hidrólise enzimática. Podemos observar na Tabela 29, que este pré-tratamento removeu uma significativa fração das hemicelulose, principalmente para o bagaço de cana.

Portanto, para se obter bons resultados no processo de hidrólise enzimática da biomassa, é necessário desenvolver um pré-tratamento adequado. Desta maneira, a etapa de pré-hidrólise ideal, é aquela em que ocorre a menor remoção da glicose da parede celular, em contrapartida, deve ser também a etapa a qual se remove a maior quantidade de matéria não-celulósica/interferentes; hemiceluloses e lignina.

4.13 Hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas

Após a caracterização da composição química de cada biomassa pré-tratada (HGU2, EG2 e bagaço), foi realizado o processo de hidrólise enzimática nas condições descritas no item 3.11.

Tabela 30 – Quantificação dos carboidratos liberados na hidrólise enzimática das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Pré-tratamentos	Material Lignocelulósico	Carboidratos (% MS)			Biomassa Residual *
		Glicose	Xilose	Carboidratos Totais	
controle	HGU2	0,96	0,07	1,03	91,88
	EG2	1,00	0,10	1,09	89,58
	bagaço	2,89	0,44	3,33	92,03
I	HGU2	2,59	0,21	2,80	91,21
	EG2	2,94	0,23	3,17	89,82
	bagaço	8,60	0,79	9,39	85,11
II	HGU2	29,02	0,49	29,51	68,17
	EG2	27,86	0,44	28,30	68,97
	bagaço	38,57	0,52	39,09	53,87
III	HGU2	15,01	2,77	17,77	62,55
	EG2	14,07	2,54	16,61	62,96
	bagaço	22,99	3,75	26,74	45,63

* Biomassa residual = massa residual após a hidrólise enzimática

Os hidrolisados enzimáticos das cascas de eucalipto e bagaço de cana foram analisado via HPAE-PAD quanto ao teor de carboidratos (Tabela 30).

O cálculo da eficiência da hidrólise enzimática foi obtido através da Equação 3.4. Esta equação leva em consideração o conteúdo de glicose hidrolisada (Tabela 30), bem como o teor de glicose na biomassa pré-tratadas (Tabela 29).

A Tabela 31 apresenta as eficiências das hidrólises enzimáticas para as cascas de eucalipto e bagaço de cana nos pré-tratamento II e III. Podemos observar na Figura 30, que os pré-tratamentos II e III foram os que apresentaram as maiores taxas de eficiência enzimática.

Os pré-tratamentos, controle e I, foram as biomassas que sofreram menos a ação das enzimas, com baixa eficiência enzimática (Figura 30). Já, os pré-tratamentos II e III tiveram as suas composições químicas significativamente alteradas, sendo alcançados valores de eficiência enzimática próximos dos relatados na literatura. Santos e Gouveia (2009) conseguiram 40% de eficiência hidrolítica para o bagaço de cana deslignificado com hidróxido de sódio.

Tabela 31 - Conteúdo de glicose inicial, hidrolisada (enzimáticamente) e eficiência da hidrólise para as cascas de eucalipto e bagaço de cana nos pré-tratamentos seqüências II e III

Pré-tratamentos	Material Lignocelulósico	Glicose (% MS)		
		Inicial	Hidrolisada	% eficiência hidrolítica
II	HGU2	76,08	29,02	38,14
	EG2	75,10	27,86	37,10
	bagaço	77,77	38,57	49,59
III	HGU2	50,64	15,01	29,64
	EG2	50,21	14,07	28,02
	bagaço	55,31	22,99	41,57

A Figura 35 apresenta os resultados de todos os pré-tratamentos. Os pré-tratamentos I e controle apresentaram baixa eficiência enzimática, pois a estrutura lignocelulósica destas biomassas não foi modificada a ponto de melhorar o acesso da enzima a celulose (Figura 30).

Figura 35 – Eficiência da hidrólise enzimática nas biomassas pré-tratadas para as cascas de eucalipto e bagaço de cana

Para verificar o processo de hidrólise enzimática em função do tempo de incubação, foram comparadas as hidrólises dos carboidratos (glicose e xilose) nos períodos de 24 e 48 horas para as cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (Figura 36). Neste experimento foi utilizada a biomassa do pré-tratamento (III). Podemos observar que após 48 horas de incubação o conteúdo de glicose no hidrolisado enzimático aumentou 60% e 78% para as cascas de eucalipto (média do HGU2 e EG2) e bagaço de cana, respectivamente. Enquanto o conteúdo de xilose após 48 horas aumentou 42% e 62% para as cascas de eucalipto e bagaço de cana, respectivamente (Figura 36).

A eficiência da hidrólise enzimática após 48 horas de incubação aumentou 55% e 70% para as cascas de eucalipto e bagaço de cana, respectivamente (Figura 36d).

A hidrólise da biomassa, ou seja, sua digestibilidade pelo complexo enzimático, é profundamente afetado em função de componentes químicos (lignina e hemicelulose) presentes na matriz lignocelulósica (ESTEGHLALIAN et al, 2001). Como já mencionado o pré-tratamento II foi o que apresentou os melhores resultados no processo de hidrólise enzimática, uma vez que a biomassa deste pré-tratamento contém baixos teores de hemiceluloses e lignina.

Figura 36 – Carboidratos liberados no processo enzimático em diferentes tempos de incubação, para as cascas de eucalipto HGU2 (a), EG2 (b) e bagaço de cana (c); eficiência hidrolítica para as cascas de eucalipto e bagaço (d)

Inúmeros resultados reportados na literatura têm mostrado que a digestibilidade da celulose aumenta com a remoção da lignina (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; DRAUDE et al., 2001; GHARPURAY et al., 1983; THOMPSON; CHEN, 1992). O principal papel inibitório foi atribuído à adsorção inespecífica da enzima (OOSHIMA et al., 1990; SEWALT et al., 1997).

Assim, a eficiência da hidrólise também foi analisada em função do interferente (hemicelulose ou lignina) presente na biomassa pré-tratada. Podemos observar na Figura 37 que a eficiência da hidrólise variou significativamente em função da presença dos interferentes e não em função do conteúdo de glicose na biomassa.

Figura 37 – Porcentagem de glicose, eficiência da hidrólise enzimática (E) e conteúdo de lignina nas biomassas de bagaço de cana e casca de eucalipto pré-tratadas (I e III)

O pré-tratamento (III), a qual foi removido grande parte da lignina com NaOH teve altas taxas de eficiência enzimática se comparado com o pré-tratamento (I), onde as hemiceluloses foram removidas com HCl (Figura 37). Portanto, a eficiência da hidrólise enzimática aumentou significativamente do pré-tratamento I para o III, tanto para as cascas de eucalipto (média de HGU2 e EG2), quanto para o bagaço de cana. Desta maneira, os resultados da eficiência enzimática foram determinados em função da concentração de lignina nas biomassas pré-tratadas. Lu e colaboradores (2002) afirmam que, a lignina além de ser uma barreira física para as enzimas (celulases), apresenta estruturas fenólicas, às quais as enzimas podem se ligar irreversivelmente, o que influencia diretamente na eficiência hidrolítica. Assim, neste trabalho, os pré-tratamentos II e III, ou seja, os que utilizaram meio ácido e/ou alcalino sequencialmente, apresentaram bons resultados para hidrólise enzimática se comparados aos pré-tratamentos I e controle.

4.13.1 Planejamento fatorial para otimizar a hidrólise enzimática da casca de eucalipto

Em todos os pré-tratamentos desenvolvidos os valores de eficiência hidrolítica foram superiores para as amostras de bagaço de cana em comparação com as amostras de casca de eucalipto. Vale ressaltar que os parâmetros (temperatura e pH) desenvolvidos para a hidrólise enzimática até este momento foram conduzidos em função do bagaço de cana. Assim, não há dados na literatura sobre hidrólise enzimática otimizada para as cascas de eucalipto.

Assim, neste planejamento experimental a biomassa pré-tratada (III) da casca de eucalipto (HGU2) foi submetida à hidrólise enzimática, para verificar as seguintes variáveis; temperatura (42,95 a 57,05°C) e pH (4,35 a 6,04). Os carboidratos removidos na hidrólise enzimática foram determinados na fase líquida (hidrolisado) via HPAE-PAD. A Tabela 32 apresenta todos os ensaios com as respectivas concentrações dos carboidratos liberados na hidrólise enzimática.

Tabela 32 - Ensaios do planejamento experimental com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase líquida (hidrolisado), após a hidrólise enzimática da casca de eucalipto (HGU2) (valores expressos em % MS)

Ensaios	Carboidratos % MS		
	Glicose	Xilose	Total
<i>1</i>	16,92	1,61	18,53
<i>2</i>	20,11	2,46	22,57
<i>3</i>	16,77	1,56	18,32
<i>4</i>	9,56	1,44	11,00
<i>5</i>	16,13	1,59	17,72
<i>6</i>	9,77	1,83	11,60
<i>7</i>	21,00	2,46	23,47
<i>8</i>	14,23	1,44	15,67
<i>9</i>	18,18	2,00	20,18
<i>10</i>	18,80	2,33	21,13
<i>11</i>	17,02	2,31	19,33

Os resultados de glicose liberada na hidrólise enzimática para a casca de eucalipto (HGU2) foram analisados por (ANOVA) (Tabela 33). O resultados para a hidólise enzimática foram significativos a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) (Tabela 33).

Tabela 33 – ANOVA para a liberação de glicose no planejamento fatorial para a casca de euacripto (HGU2)

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado	p valor	R²
Temperatura	3	80,250710	26,750237	23,99	0,0001	0,9606
pH	3	78,442216	26,147405	23,45	0,0001	

O coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,96$) e o teste de F para a glicose liberada foi válido a 95% de confiabilidade. Os dados experimentais ajustados pela Equação 4.1 demonstram que as variáveis estudadas afetaram a resposta (Tabela 34).

Desta forma, o planejamento fatorial possibilitou a obtenção de um modelo quadrático para a liberação de glicose em função da temperatura e pH para a casca de eucalipto (HGU2). O modelo codificado otimizado (Equação 4.1) para a liberação da glicose foi obtido pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 30 e 31).

(4.1)

$$Gli = -412,5071 + 13,749T + 40,7351pH - 0,0955T^2 - 0,8663T.pH$$

Onde:

Gli = Concentração de glicose em (%) de biomassa seca;

T = Temperatura (°C);

pH = pH da solução tampão (solução hidrolítica).

Tabela 34 – Coeficientes de regressão para a resposta de glicose no planejamento fatorial para a casca de eucalipto (HGU2)

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p valor	Limite de coeficiente -95%	Limite de coeficiente +95%
Média	-412,50716	77,70417	-5,30869	0,00317	-612,25208	-212,76223
Temp (L)	13,74969	2,00674	6,85177	0,00101	8,59121	18,90818
Temp (Q)	-0,09570	0,01784	-5,36358	0,00303	-0,14157	-0,04984
pH (L)	40,73517	15,63094	2,60606	0,04790	0,55458	80,91577
pH (Q)	-0,15889	1,24147	-0,12798	0,90315	-3,35019	3,03242
Temp x pH	-0,86633	0,17600	-4,92244	0,00439	-1,31875	-0,41392

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que tanto a temperatura, quanto o pH tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a liberação da glicose (Tabela 33).

A análise da superfície de resposta e as curvas de contorno geradas (Figura 38) indicam faixas de temperatura (50-54 °C) e pH (4,2 -4,4) para um ponto máximo de liberação de glicose de 23,3 % (MS).

Figura 38 – Superfície de resposta (a); e contorno de linhas (b), para a liberação de glicose da casca eucalipto (HGU2)

A curva de contorno apresentada na Figura 38b, juntamente com a Equação 4.1, podem ser usadas para definir melhor a região da produção máxima de glicose. Embora os Figura 33 mostre que o planejamento ainda não foi o ideal, pois a faixa de máxima liberação da glicose se encontra em pH abaixo de 4,0 com temperaturas em torno de 52 °C. Este modelo ainda precisa ser validado com as condições citadas acima.

4.14 Estimativas da produção de etanol a partir das cascas de eucalipto

Com os dados da quantidade de glicose na biomassa residual e eficiência hidrolítica, foram realizadas as estimativas para a produção de etanol celulósico a partir das cascas de eucalipto (Figura 39). Considerando que a produção média de casca é em torno de 15 toneladas por hectare, e que 25% (3,75 toneladas açúcares e extrativos) desta massa será utilizada para produzir etanol de primeira geração, sobrarão então 11,3 toneladas de cascas para a produção de etanol celulósico. Assim, a produção média de etanol para os dois clones foi de 94 litros por tonelada de resíduo seco. Portanto, poderiam-ser produzidos aproximadamente 1062 litros de etanol celulósico por hectare. Somando-se com o etanol de primeira geração descrito no 4.10, o total de etanol produzido pode chegar a 2662 litros por hectare. Vale ressaltar que, com todos os avanços tecnológicos, atualmente a produção de etanol a partir das culturas de milho e cana giram em torno de 3500 e 6000 litros de etanol por hectare. Estas estimativas ainda não levam

em consideração alguns tratos silviculturais, como o anelamento, que resultou em aumento de quase 100% na quantidade de carboidratos solúveis.

Figura 39 – Balanço de massa para a produção de etanol celulósico a partir de casca de eucalipto

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química da casca de eucalipto apresentou altas taxas de carboidratos potencialmente fermentescíveis. O conteúdo de pentoses foi praticamente a metade do encontrado no bagaço de cana-de-açúcar. O conteúdo de açúcares solúveis variou entre 6 e 10% em peso seco. Estes açúcares estão prontamente disponíveis para a fermentação uma vez que os extratos aquosos não apresentaram inibição frente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A produção de etanol a partir dos açúcares solúveis presentes na casca de eucalipto pode se tornar viável, pois os altos incrementos de massa que o eucalipto possui ($41 \text{ m}^3/\text{ha/ano}$), faz com que esta cultura gere milhões de toneladas de resíduos anualmente. Desta forma ao final do ciclo da madeira em média 7 anos, são produzidos 15 toneladas por hectare de casca de eucalipto com altas concentrações de açúcares solúveis. Tratamentos silviculturais, como o anelamento pode aumentar significativamente as concentrações de açúcares.

Já para os resultados obtidos na avaliação das cascas de eucalipto frente aos pré-tratamentos químicos, estes merecem novos estudos de planejamento fatorial. No geral, as biomassas residuais das cascas de eucalipto provenientes dos pré-tratamentos apresentaram maiores razões de hexoses/pentoses em relação bagaço de cana. Estes dados representam mais unidade de glicose por unidade de xilose para as cascas de eucalipto. Um dos alvos deste trabalho foi o estudo da influência dos reagentes químicos durante o pré-tratamento da casca de eucalipto, visando aumentar a digestibilidade da celulose. O objetivo foi determinar os valores mínimos de reagentes que levam ao maior rendimento na produção de açúcares fermentescíveis na hidrólise.

Foi evidente a necessidade de se conhecer totalmente as características da biomassa antes, durante e após a etapa de pré-tratamento e de hidrólise enzimática, com o objetivo de determinar a variação dos diferentes componentes da biomassa e tentar entender o mecanismo de ação das celulasas para as cascas de eucalipto.

Desta maneira, a utilização da biomassa florestal para a geração de energia é um dos exemplos para a adoção de um modelo energético sustentável para o país, o qual priorize a diversificação das fontes com o máximo de preservação ambiental.

REFERÊNCIAS

AIE- Agência Internacional de Energia. **Perspectivas em Tecnologias Energética, Cenários e estratégias até 2050**. AIE, 2010. 22p.

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, nº 26, p.52-55, mai-jun, 2002.

ALMEIDA, S.J.B.; CANILHA, L.; CANETTIERI, E.V.; FELIPE, M.G.A.; SOLENZAL, A.I.N. Use of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the bioconversion of xylose into xylitol in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Berlin, v.78, p 975-948, 2003.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 70/72, p. 89-98, 1998.

AMORIN, H.V. Fermentação Alcoólica: **Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, São Paulo. Fermentec, 2005, 448p.

ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAIS, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Fermentation Technology**, Osaka, v.64, p. 567-570, 1986.

ANDRADE, A.M. Influência da casca de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex. Maiden no rendimento e qualidade do carvão vegetal. 1989. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 1989.

ANGYALOSSY-ALFONSO, V. Caracterização anatômica do lenho e da casca das principais espécies de *Eucalyptus* cultivadas no Brasil. **Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo**, São Paulo, 188, p.239, 1987.

APPEZZATO, B.G.; GUERREIRO, M.S.C. **Anatomia vegetal**. Viçosa:UFV, 2003. 234p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. Disponível em: www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas. Acesso em: 01 jun. 2010.

ASTM E 1690-01. **Standard practice for determination of ethanol extractives in biomass**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

ASTM E 1721-01. **Standard test method for acid insoluble residue in biomass**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

ASTM E 1755-01. **Standard test method for ash in biomass**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

ASTM E 1756-01. **Standard test method for determination of total solids in biomass.**

Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

ASTM E 1758-01 **Standard test method for determination of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography.** Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

ASTM E 1757-01. **Standard practice for preparation of biomass for compositional analysis.**

Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2001. 1v.

AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **Journal Environmental of Science and Health**, New York; 24, n.4, p. 421–433, 1989.

AWANO, T.; TAKABE, K.; FUJITA, M. Xylan and lignin deposition on the secondary wall of *fagus crenata* fibers. In: MOROHOSHI, N.; KOMAMINE, A. (Ed.). **Molecular breeding of woody plants.** Arnstadt: Elsevier Science, 2001. p. 137-142.

BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PRIESS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants.** New York: Academic Press, 1988. p. 297-371.

BADGER, P.C. Ethanol from cellulose: a general review. In: Janick J, Whipkey A, editors. **Trends in new crops and new uses.** Alexandria, VA: ASHS Press; p. 17–21, 2002.

BAPTISTA, C.; ROBERT, D.; DUARTE, A.P.; Relationship between lignin structure and delignification degree in *Pinus pinaster* kraft pulps. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 2349-2356, 2008.

BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p. 5-38, mar, 2007.

BELLOTE, A.F.J.; SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P.; OLIVEIRA, G.D. **Extração e exportação de nutrientes pelo *Eucalyptus grandis* W.Hill ex. Maiden, em função da idade.** Piracicaba: ESALQ/USP, (IPEF, 20), p. 1-23, 1980.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v.72, p.51-56, 1992.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.

BOLWELL, P.G. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. **International Review of Cytology**, New York, v. 146, p. 261-324, 1993.

BOUDET, A.M. Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. In: ROSE, J. (Ed.). **In the plant cell wall**. Oxford: Blackwell, 2003. p. 155-182.

BRASILEIRO, L.B.; COLODETTE, J.L.; PILO-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n. 6, p. 819-829, 2001.

BRETT, C.; WALDRON, K.W. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. Hyman, London: Unwin, 1990. p. 75-111.

BROWNING, B.L. The composition and Chemistry reactions of wood. In: **The Chemistry of Wood**. Malabar: John Wiley, 1963. p. 58 – 101.

BURGER, L.M.; RICHTER, H.G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 154p.

CAMPOS, C.H.O.; GRAÇA, R.L. Análise do Aproveitamento econômico do Resíduo Florestal. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n.13, p.35-45, 1986.

CANETTIERI, E.V., SILVA, J.A.B., FELIPE, M.G.A. Application of Factorial Design to the study of xylitol production from Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.94, n.2, p. 159-168, 2001.

CANETTIERI, E.V., SILVA, J.A.B., FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.3, p. 323-331, 2002.

CANETTIERI, E.V. **Obtenção dos parâmetros e estudos cinéticos da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. 2004. 146p. Tese de (Doutorado recursos florestais) - . Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho" Guaratinguetá, 2004.

CANETTIERI, E.V.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO, J.A.J.; SILVA, J.A.B. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, New York, v.98, p. 422-428, 2007.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A., FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n.44, p.48-54, 2010.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, New York, n. 99, p. 1869-1876. 2008.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

CARRILHO, F.; LIS, M.J.; COLOM, X.; VALLDEPERAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**, London, n.40, p. 3360-3364, 2005.

CARROLL, A; SOMERVILLE, C. Cellulosic Biofuel. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, vol.60, p.165-182. 2009.

CARVALHO, C.B.A.; SILVA, C.S.; SBRISSIA, F.A.; FAGUNDES, L.J.; CARNEVALLI, A.R.; PINTO, M.F.L.; PEDREIRA, S.G.C. Carboidratos não estruturais e acúmulo de forragem em pastagem de *Cynodon* spp. sob lotação contínua. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, n.4, v.58, p667-674, 2001.

CARVALHO, G.B.M.; GINORIS, Y.P.; SILVA, C.C.; CÂNDIDO, E.J.; CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA, S.J.B. Estudo do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. **Revista Analytica**, São Paulo, n.48, p.54-57, 2005.

CARVALHO, G.B.M.; GINORIS, Y.P.; CÂNDIDO, E.J.; ALMEIDA, S.J.B. Avaliação preliminar do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para fins biotecnológicos. **Revista Analytica**, São Paulo, n.17, p.33-37, 2005b.

CHANDEL, A.K.; CHAN, E.S.; RUSDRAVARAM, R.; NARASU, M.L.;RAO, L.V.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Nairobi v. 2, p.14-32, 2007.

CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 86, p. 5-37, 2000.

CHEN, C.L.; **Lignins. Occurrence in wood tissue, isolations reactions and structure.** In:LEWIS M, GOLDSTEIN I.S. (Ed.). Wood structure and composition. New York:Marcel Dekker, p. 183-261, 1991.

CONSECANA - CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Manual de instrução**, 4 ed. Piracicaba: CONSECANA. 2003. 115p.

CORDEIRO, G.C.; TOLEDO-FILHO, R.D.; FAIRBAIN, E.M.R. Caracterização de cinza do bagaço de cana-de-açúcar para emprego como pozolana em materiais cimentícios. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.1, p. 82-86, 2009.

COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. Beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 17, p. 259-289, 1993.

DALE, B.E.; HENK, L.L.; SHIANG, M. Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. **Developments in Industrial Microbiology**, Edinburgh, v.26, p. 223–233, 1984.

D'ALMEIDA, M.L.O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e Papel- Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**. 2.ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1998.v.1.

DAVIN, L.B., LEWIS, N.G. Lignin primary structures and dirigent sites. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v.16, p.407-415, 2005.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R., NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisia*. **Enzyme Microbiology Technology**, Guildford, v.19, p. 220-225.

DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DHUGGA, K.S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 488-493, 2001.

DOE - U.S. DEPARTMENT OF ENERGY (U.S.-DOE) Disponível em: www.eere.energy.gov/biomass. Acesso em: 10 maio 2010.

DRAUDE, K.M.; DRAUDE, C.B.; KURNIAWA, N. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, New York, v.79, p. 113–120, 2001.

DUFF, S.J.B., MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, New York, v.55, p.1–33, 1996.

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

EFFLAND, M.J. **Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp**. Atlanta, v. 6, n. 10, p. 143-144, 1977.

EMONS, A.M.C.; SCHEL, J.H.N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, New York, v. 4, p. 22-26, 2002.

EMONS, A.M.C.; MULDER, M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 35-40, 2000.

ENGLEHARDT, J. Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrates Europea**, Amsterdam, v. 12, p. 5-14, 1995.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F.A. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrate with cellobiohydrolase I (Cel 7A) and endoglucanase I (Cel 7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cliford, v. 101, p. 41-60, 2002.

ESTEGHLALIAN, A., HASHIMOTO, A.G., FENSKE, J.J., PENNER, M.H. Modeling and optimization of the dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresource Technology**, New York, v. 59, n. 2/3, p.129-136, 1997.

ESTEGHLALIAN, A.R.; BILODEAU, M.; MANSFIELD, S.D.; SADDLER, J.N. Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes? **Biotechnology Progress**, New York, v.17, p.1049-1054, 2001.

FAN, L.T.; LEE, Y.H.; BEARDMORE, D.H. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Bioengineer.* v.23, p.419-424, 1981.

FARDIM, P.; DURÁN, N. Wood and pulp carbohydrate analysis using HPLC and eletrochemical detection. **Chemistry Preprint Archive**, Zurich, v. 7, p. 158-163, 2001

FELIPE, M.G.A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, São Paulo, v.36, p. 103-114, 1993.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry ultrastructure reactions**. Berlín: Walter de Gruyter, 1989. 610 p.

FERRARI, R. **A Energia do bagaço de cana**. São Paulo:Revista Politécnica;Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2002.p. 92.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; OTONI, W.C.; JOSHI, C.P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.19 n.1, p.1-13, 2007.

FRAZER, F.R; MCCASKEY, T.A. Wood hydrolysate treatmentsfor improved fermentation of wood sugar to 2,3 butanedio. **Biomass**, Berlin, v. 18, p. 31-42, 1989.

FOELKEL, C. Casca da árvore do eucalipto. **Eucalyptus Online Book and Newsletter**. Disponível em: <http://www.eucalyptus.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2010.

FRANKLIN, G.L. Permanent preparations of macerated wood fibers. **Tropical Woods**, New Haven, v.49, p. 21-22, 1937.

FRY, S.C. **The growing plant cell wall**: chemical and metabolic analysis. London: Longman Scientific and Technical, 1988. 246 p.

GEORGE, J.R.; OBERMANN, D.J.; WOLF, D.D. Seazonal trends for nonstructural carbohydrates in stem bases of defoliated switchgrass. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1282-1287, 1989.

GHARPURAY, A.; LEE, Y.H.; FAN, L.T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Bioengineer**, New York, v.25, pp. 157–172C, 1983.

GIA-LUEN, G.; WEI-HSI, C.; WEN-HENG, C.; LEE-CHUNG, M.; WEN-SONG, H. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, New York, n.99, p 6046-6053, 2008.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 8, p. 904-915, 1994.

GOLDSCHMIDT, O. Ultraviolet Spectra. In: K. SARKANEN, K.; LUDWING, C.H., eds. **Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions**. New York, John Wiley; Sons, 1971. cap. 6, p. 241-298.

GOLDSTEIN, I.S. **Organics chemicals from biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981, 310p

GOULD, J.M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p. 46–52, 1984.

GOULD, J.M. Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, p. 893–896, 1985a.

GOULD, J.M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, Clifton, v.27, p. 225–231, 1985b.

GOULD, J.M.; FREER, S.N. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H₂O₂. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.628–631, 1984.

GOUVEIA, R.E.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, Madison, v.45, p.820–831, 2005.

GRUPPEN, H.; HOFFMAN, R.A.; KORMELINK, F.J.M.; VORAGEN, A.G.J.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Characterization by ¹H NMR spectroscopy of enzymatically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 233, p. 45-64, 1992.

HARKIN, J.M.; ROWE, J.W. **Bark and its possible uses**. In Cooperation with the University of Wisconsin. Research Note. Madison,: U.S. Department of Agriculture, forest Service, 1971. 56p.

HATFIELD, R.D.; RALPH, J.; GRABBER, J.H. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 403-407, 1999.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary-cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M.; DELMER, D. P. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interaction *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 83, p. 384-389, 1987.

HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose: I. Macromolecular organization. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 75, n. 3, p. 596-604, 1984.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, Washington, v. 315, p. 804-807, 2007.

HOLTZAPPLE, M.T. Hemicellulose. In: MACRAE R, ROBINSON R K, SADLER MJ, (Ed.). **Encyclopedia of Food Science, Food Technology And Nutrition**, London, v. 2. p.2324-2334, 1993.

HOLTZAPPLE, M.T.; HUMPHREY, A.E. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p. 670-676, 1984

HOLTZAPPLE, M.T.; HUMPHREY, A.E.;TAYLOR, J.D. Energy requirement for the size reduction of poplar and aspen wood. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 33, p. 207–210, 1989.

HOLTZAPPLE, M.T.;LUNDEEN, J.E., STURGIS, R. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 5–21, 1992.

HOLTZAPPLE, M.T.; UN, J.H., ASHOK, G.; PATIBANDLA, S.L., DALE, B.E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 28/29, p. 59–74, 1991.

HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Willey, 1995. 464 p

HUSCH, B., MILLER, C.I., BEERS, T.W. **Forest mensuration**. 2nd ed. New York:The Ronald Press, 1972. 410p

HSU, T.A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology Chemical Technology**, Oxford, v.10, n.5, p. 315–319, 1980.

IBGE – FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico brasileiro**. Rio de Janeiro: Diretoria de Pesquisas, Departamento de Agropecuária, Pesquisa Produção Vegetal e da Silvicultura, 2009.

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

KAPPOR, M.; NAIR, L.M.; KUHAD, R.C. Cost effective xylanases production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, n.38, p. 88-97, 2008

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, New York, v. 30, p. 247-253, 2006.

KHUAD, R.C.;SINGH., A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, Palo Alto,v.13, p.151-172, 1993.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M.T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis corn stover. **Bioresource Technology**, New York, v.96, p.1994-2006, 2005.

KLEMM, D.;HEUBLEIN, B.;FINK, H.P.;BOHN, A. Cellulose: fascinationg biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte chemie international**, Weinheim, v. 44, p.3358-3393, 2005.

LADEIRA, B.C. **Crescimento, produção de biomassa e eficiência nutricional de *Eucalyptus spp.*, sob três espaçamento, em uma sequência de idades**. Viçosa, 1999. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J.O.; OLIVEIRA, K.F. ; SOUZA, C.S. ; MORAIS, M.R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Heidelberg. v.83, p. 627–637, 2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, J.M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, New York, v.81, p.33-44, 2002.

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

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes presents in wood and chemical pulps. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 6, p. 3467-3473, 2005.

LAWOKO, M.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Characterization of lignin carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L) isolated with two methods. **Holzforschung**, Berlin, v. 60, p. 156-161, 2006.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**., Amsterdam, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEWANDOWSKI, I.; CLIFTON-BROWN, J.C.; SCURLOCK, J.M.O.; HUISMAN, W. Miscanthus: European experience with a novel energy crop. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, p. 209-227, 2000.

LIAO, W.; LIU, Y.; LIU, C.; WEN, Z.; CHEN, S. Acid hydrolysis of fibers from dairy manure. **Bioresource Technology**, New York, n 97, p. 1687-1695, 2006.

LIMA, L.R.; MARCONDEZ, A.A. Álcool carburante: Uma estratégia brasileira. Curitiba, (ed.) UFPR, 2002, 248p.

LIMA, U.A.; BASSO, C.; AMORIN, H.V. Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Biotechnologia Industrial**, São Paulo, v.3 p. 1-43, 2001.

LLOYED, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, 1967-1977, 2005.

LOHMEIER-VOGER, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.20, p. 75-81, 1998.

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

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steamexploded softwood residues. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v.98-100, p.641-654, 2002.

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

MACEDO, C.I. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, São Paulo, n. 21, v. 59, p.157-165, 2007.

MACKIE, K.L.; BROWNELL, H.H.; WEST, K.L.; SADDLER, J.N. Effect of sulfur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, New York, v.5, n.3, p. 405-425, 1985.

MAES, C.; DELCOUR, J.A Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. **Jounal of Cereal Science**, London, v.34, p. 29-35, 2001.

MANZANO, R.P.; FUKUSHIMA, R.S.; GOMES, J.D.F. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p. 1196-1204, jul./ago 2000.

MATSUSHITA, Y.; YAMAUCHI, K.; TAKABE, K.; AWANO, T.; YOSHINAGA, A.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; ASADA, T.; FURUJYO, A.; FUKUSHIMA, K. Enzymatic saccharification of Eucalyptus bark using hydrothermal pretreatment with carbon dioxide. **Bioresource Technoloy**, New York, v.101, p. 4936-4939, 2010.

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

McCANN, M.C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wal. In: LLOYD, C.W. (Ed.). **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. San Diego: Academic Press, 1991.p. 109-129.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocelluloses biomass. In:BAKER, H.:OVERENDRP, J.O.(Ed.) **Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium; 1994. p. 292–324

McNEIL, M.; DARVILL, A.G.; FRY, S.C. ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLEROWICZ, E.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 239-274, 2001.

MENEZES, T.J.B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, P.141-178, 1980.

MES-HARTREE, M., DALE, B.E., CRAIG, W.K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Palo Alto, v. 29, p. 462–468, 1988.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Plano Nacional de Energia 2030** / Ministério de Minas e Energia ; colaboração Empresa de Pesquisa Energética .Brasília: MME : EPE, 2007. p. 324.

MIRANDA, G.M.; SILVA, M.L.; MACHADO, C.C.; LEITE, H.G. Contribuição da casca na composição do custo de transporte da madeira de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.2, p.145-148, 2002.

MOHAN, D.; PITTMAN, C.U.; STEELE, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy and Fuels**, Washington, v.20, p. 848-889, 2006.

MOISIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y. ; HOLTZAPPLE, M. Features of promizing technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, New York, n.96, p 673-686, 2005.

MORJANOFF, P.J., GRAY, P.P. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.29, p. 733–741, 1987.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 93, p. 1-10, 2004.

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

NIGAM, P., SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry**, New York, v. 30, p. 117-124, 1995.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, New York, v. 76, p. 1-8, 2001.

OHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO₂ impregnated corn stover for fuel ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, n.124, p. 1055-1067, 2005.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996.1v.

OMACHI, I.H.; RODRIGUES, L.G.; STOLF, M.; CANNAVAL, R.; SOBREIRO, R. Produção de biomassa florestal para exportação: O caso da Amcel. **Revista Biomassa e Energia**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 29-36, jan./mar, 2004,

O'NEILL, M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE, J.K.C. (Ed.). **The plant cell wall**. Oxford: Blackwell, 2003. p. 1-54.

OOSHIMA, H.; BURNS, D.S.; CONVERSE, A.O. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignacious residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. **Biotechnology and Bioengineering**, London, v.36, p.446-452, 1990.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 106p. Dissertação (Mestrado em

Sucroalcooleiro) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

PAIVA, J.E.; MALDONADE, I.R.; SCAMPARINI, A.R.P. Xylose production from sugarcane bagasse by surface response methodology. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.13, n.1, p. 75-80, 2009.

PALMQVIST E.; HAHN-HÅGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. New York, v.74, p.25-33, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, New York, n.74, p.69-80, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol - Part 3 : Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, New York, v.66, p. 25- 40, 1998.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Quantitative chemical and ^{13}C NMR analysis of Eucalyptus grandis lignin. Proceeding of the Third Symposium on the Chemistry of lignin and other wood components. Belo Horizonte: **Química Nova**, São Paulo, p.150-154, 1993.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 127, p. 1513-1523, 2001.

QUIRINO, W. F. **Utilização energética de resíduos vegetais**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Brasília: IBAMA, Laboratório de Produtos Florestais – LPF, 2002. 31 p.

RABELO, S.C.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. Comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v.144, p. 87-100, 2008.

RAGAUSKAS, A.J., NAGY, M., KIM, D.H., ECKERT, C.A., HALLETT, J.P., LIOTTA, C.L. From wood to fuel: Integrating and pulp production. **Industrial Biotechnology**, New Rochelle, v. 2, p.55-65 2006.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001. 791 p.

RESHAMWALA, S., SHAWKY, B.T., DALE, B.E. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.51/52, p.43–55, 1995.

RITTER, S.K. Lignocellulose: A complex biomaterial. **Chemical and Engineering News**. Washington, v.86, n.49, p. 10-15, dec.2008.

RIVERS, DB.; EMMERT, G.H. Lignocellulose pretreatment: A comparison of wet and dry ball attrition. **Biotechnology Letters**, Kew, n.9, p 365-368, 1987.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.M.A.; FELIPE, M.G.A.; SATO, S.; CASTRO, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.16, p. 1211-1216, 1994.

RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: São Paulo, 2005, 326p

RODRIGUES, A.F. **Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana**. 2007. 140p Tese Doutorado (Faculdade de Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 61, p. 143-153, 2004.

RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA, S.J.B., VITOLO, M., GÓMEZ, P.V. The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and Non-Volatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolyzate Treated With Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001

ROLAND, J.C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, Siena, v. 24, n. 3, p. 335-345, 1992

ROWELL, R.M.; PETTERSEN, R.; HAN, J.S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M.A. Cell In: ROGER, M. ROWELL (Ed.). **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York: Ed. Taylor and Francis Group, 2005. cap. 3: Wall Chemistry. p. 234-248.

SANTOS, J.R.A.; GOUVEIA, E.R. Produção de bioetanol de bagaço de cana de açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.11 p. 27-33, 2009.

SARKANEN, S. Template polymerization in lignin biosynthesis. In: LEWIS, N.G.; SARKANEN, S. (Ed.). **Lignin and lignan biosynthesis**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium, 1998. p. 194-208.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, São Paulo, vol.24, n. 2, 2001.

SEIXAS, F.; BAUCH, S.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Balanço energético e econômico de duas alternativas de descascamento de madeira de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.67, p.37-43, 2005

SELVENDRAN, R.R. The chemistry of plant cell walls. In: BIRCH, G.G.; PARKER, K.J. (Ed.). **Dietary fiber**. London; New York: Applied Sciences, 1983. p. 95-147.

SEWALT, V.J.H.; GLASSER, W.G.; BEAUCHEMIN, K.A. Lignin impact on fiber degradation. 3. Reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Washington, v.45, p.1823-1828, 1997.

SILVA, S.S.; FELIPE, M. G.A.; ALMEIDA, S.J.B.; PRATA, A.M.R. Acid hydrolysis of *Eucalyptus grandis* chips for microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, London, v.33, p. 63-67, 1998.

SILVA, S.S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts. - A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70-72, p. 1-9, 1998.

SILVA, C.J.; ROBERTO, I.C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.4, p. 248-52, 2001.

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial pentose utilization. **Current applications in Biotechnology. Progress in Industrial Microbiology**, New York, v. 33, p. 123-145, 1995

SJOSTROM, E. **Wood chemistry. Fundamentals and applications**. 2nd. ed, New York: Academic press, 1993. p. 109 - 133.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of Total Solids in Biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005. p.1-6.

SOUZA, Z.J. **Geração de energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: Entraves estruturais e custos de transação**. 2003. 278. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção)- Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

SRICHUWONG, A.; FUJIWARA, M.; WANG, X.; SEYAMA, T.; SHIROMA, R.; ARAKANA, M.; MUKOJIMA, N.; TOKUYASU, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and Bioenergy**, London, v. 33, p. 890-898, 2009.

STEINER, C.; HERRERA, J.; BERGAMIN, N.; MALTZ R. **Resíduos Sólidos ou bens de Produção?** Novas Tecnologias na Indústria de Celulose e Papel. 1990. p. 2. (Norma Técnica, 375).

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, New York, n.83, p.1–11, 2002.

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15, p. 339-364.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T222 om-88**: acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1998. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T264 om-88**: preparation wood for chemical analysis. Atlanta, 1999. 1v.

TENGERDY, R.P.; NARGY, J.G. Increasing the feed value of forestry waste by ammonia freeze explosion treatment. **Biological Wastes**, London, v. 25, p.149–153, 1988.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K. HE. L.F.; TAKABE, K. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 247-270.

TEYMOURI, F.; LAUREANO-PEREZ, L.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. Optmization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, New York, n.96, p. 2014-2018, 2005.

The Columbia Encyclopedia, 6th ed. . 2008. **Encyclopedia.com**. (acesso em: 13 abr.. 2010).

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

TURTON, R.; BAILIER, R.C.; WHITING, W.B.; SHAUWITZ, J.A. **Analysis, Synthesis and design of chemical processes**. New Jersey, Prentice Hall, 1998. 987p.

UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). **Ranking de Produção de Cana, Açúcar e Álcool – Região Centro-Sul – Safra 2006/2007**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/referencia>> acesso em: 12 Nov.2007

VIALJAMAE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.84, p. 254-257, 2003.

VIEIRA, A.C. **Gaseificação de briquetes de casca de eucalipto**. 2005. 83p. Dissertação de (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

VILLAR-COCIÑA, E.; VALENCIA-MORALES, E.; SANCHES, R.M.I. An Evalution of different kinetics models for determining the kinetic coefficients in sugar cane-straw – ash/lime system. **Advances in Cement Research**, v.18, p. 17-26, 2006.

VILLAVICENCIO, E.J. Celulose de bagaço Alvejado: Qualidade Comercial. **O Papel**, São Paulo, p.33-40, fev.1974.

VLASENKO, E.Y., DING, H., LABAVITCH, J.M., SHOEMAKER, S.P. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. **Bioresource Technology**, New York, v. 59, p. 109–119, 1997.

XU, F.; SUN, J.X.; LIU, C.F.; SUN, R.C. Comparative study of alkali and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polyssacharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrates Research**, Amsterdam, n.341, p. 253-261, 2006.

WEBER, O. **Decomposição da casca de *Eucalyptus* em condições de laboratório e em sistemas de medas**. 1987. 57p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 1987.

WHITNEY, S.E.C.; GOTHARD, M.G.E.; MITCHELL, J.T.; GIDLEY, M.J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, p. 657-663, 1999.

WHITNEY, S.E.C.; BRIGHAM, J.E.; DARKE, A.H.; GRAND-REID, J.S.; GIDLEY, M.J. *In vitro* assembly of cellulose/xyloglucan networks: ultrastructural and molecular aspects. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 491-504, 1995.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, New York, n.96, p. 2026-2032, 2005.

YADAV, K.R.; SHARMA, R.K.; KOTHARI, R.M. Bioconversion of eucalyptus bark waste into soil conditioner. **Bioresource Technology**, New York, v.81 p. 163-165, 2002.

YANASE, H.; YAMAMOTO, K.; SATO, D., OKAMOTO, K. Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus*-glucosidase gene. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.118, p. 35–43, 2005.

ZOETTL, H.W. Possibilidades de utilização da casca de essências florestais para o melhoramento do solo. **Floresta**, Curitiba, v.11, n.2, p. 45-51, 1980.

ANEXOS

ANEXO A – Configuração experimental do DCCR 2⁴ para avaliação da pré-hidrólise com ácido sulfúrico para os materiais lignocelulósicos; cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Ensaio	sol:liq	H ₂ SO ₄ (M)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	1:7	5	40	24
2	1:13	5	40	24
3	1:7	8,33	40	24
4	1:13	8,33	40	24
5	1:7	5	70	24
6	1:13	5	70	24
7	1:7	8,33	70	24
8	1:13	8,33	70	24
9	1:7	5	40	48
10	1:13	5	40	48
11	1:7	8,33	40	48
12	1:13	8,33	40	48
13	1:7	5	70	48
14	1:13	5	70	48
15	1:7	8,33	70	48
16	1:13	8,33	70	48
17	1:4	6,66	55	36
18	1:16	6,66	55	36
19	1:10	3,33	55	36
20	1:10	10	55	36
21	1:10	6,66	25	36
22	1:10	6,66	85	36
23	1:10	6,66	55	48
24	1:10	6,66	55	60
25	1:10	6,66	55	36
26	1:10	6,66	55	36
27	1:10	6,66	55	36

ANEXO B - Configuração experimental do planejamento experimental 2³ completo para avaliação dos materiais lignocelulósicos; cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana

Ensaio	$H_2SO_4(M)$	$H_2O_2 (M)$	<i>Temperatura (° C)</i>
1	2	1,73	40
2	4,66	1,73	40
3	2	5,21	40
4	4,66	5,21	40
5	2	1,73	60
6	4,66	1,73	60
7	2	5,21	60
8	4,66	5,21	60
9	1	3,47	50
10	5,66	3,47	50
11	3,33	0,65	50
12	3,33	6,51	50
13	3,33	3,47	33
14	3,33	3,47	67
15	3,33	3,47	50
16	3,33	3,47	50
17	3,33	3,47	50

Ensaio	<i>HCl (M)</i>	<i>Temperatura (° C)</i>	<i>Tempo(min)</i>
<i>1</i>	<i>5</i>	<i>53</i>	<i>30</i>
<i>2</i>	<i>8,8</i>	<i>53</i>	<i>30</i>
<i>3</i>	<i>5</i>	<i>67</i>	<i>30</i>
<i>4</i>	<i>8,8</i>	<i>67</i>	<i>30</i>
<i>5</i>	<i>5</i>	<i>53</i>	<i>50</i>
<i>6</i>	<i>8,8</i>	<i>53</i>	<i>50</i>
<i>7</i>	<i>5</i>	<i>67</i>	<i>50</i>
<i>8</i>	<i>8,8</i>	<i>67</i>	<i>50</i>
<i>9</i>	<i>3,6</i>	<i>60</i>	<i>40</i>
<i>10</i>	<i>10</i>	<i>60</i>	<i>40</i>
<i>11</i>	<i>7</i>	<i>48</i>	<i>40</i>
<i>12</i>	<i>7</i>	<i>72</i>	<i>40</i>
<i>13</i>	<i>7</i>	<i>60</i>	<i>23</i>
<i>14</i>	<i>7</i>	<i>60</i>	<i>57</i>
<i>15</i>	<i>7</i>	<i>60</i>	<i>40</i>
<i>16</i>	<i>7</i>	<i>60</i>	<i>40</i>
<i>17</i>	<i>7</i>	<i>60</i>	<i>40</i>

Ensaio	Temperatura (°C)	pH
1	45	4,6
2	55	4,6
3	45	5,8
4	55	5,8
5	42,95	5,2
6	57,05	5,2
7	50	4,35
8	50	6,04
9	50	5,2
10	50	5,2
11	50	5,2

ANEXO E - Ensaio do planejamento experimental (H₂SO₄) com os respectivos conteúdos de carboidratos liberados na fase líquida após a pré-hidrólise para a casca de eucalipto (HGU2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b			
	Fucose	Arabinose	Galactose	Frutose
1	0,03 (26,7)	0,89 (80,0)	0,06 (6,3)	3,76 (58,1)
2	0,03 (28,5)	0,99 (89,3)	0,06 (6,5)	3,80 (58,8)
3	0,06 (63,9)	1,40 (100)	0,38 (38,9)	2,94 (45,6)
4	0,07 (67,6)	1,52 (100)	0,45 (45,6)	3,21 (49,7)
5	0,06 (60,5)	1,55 (100)	0,73 (74,1)	3,31 (51,2)
6	0,07 (68,8)	1,76 (100)	0,87 (88,4)	3,64 (56,4)
7	0,18 (100)	1,34 (100)	1,12 (100)	0,66 (10,2)
8	0,24 (100)	1,51 (100)	1,27 (100)	0,59 (9,1)
9	0,04 (36,0)	1,17 (100)	0,07 (7,7)	3,87 (59,9)
10	0,04 (40,5)	1,38 (100)	0,09 (9,1)	4,36 (67,5)
11	0,07 (67,2)	1,62 (100)	0,60 (60,1)	3,53 (54,7)
12	0,07 (71,2)	1,74 (100)	0,63 (64,7)	3,79 (58,6)
13	0,08 (84,3)	1,76 (100)	1,35 (100)	3,12 (48,3)
14	0,12 (100)	1,86 (100)	1,45 (100)	3,45 (53,4)
15	0,09 (85,1)	1,46 (100)	1,24 (100)	0,21 (3,2)
16	0,10 (97,2)	1,67 (100)	1,44 (100)	0,13 (2,1)
17	0,07 (72,8)	1,77 (100)	0,74 (75,6)	3,83 (59,1)
18	0,08 (80,8)	2,03 (100)	0,89 (90,6)	4,34 (67,2)
19	0,08 (75,5)	1,93 (100)	0,23 (23,4)	5,09 (78,8)
20	0,18 (100)	1,32 (100)	1,02 (100)	0,73 (11,3)
21	0,01 (12,9)	0,72 (64,5)	0,05 (4,8)	5,05 (78,1)
22	0,12 (100)	1,97 (100)	1,64 (100)	0,16 (2,5)
23	0,08 (76,8)	1,94 (100)	0,32 (32,9)	4,80 (74,3)
24	0,08 (79,0)	1,95 (100)	1,22 (100)	3,74 (58,0)
25	0,08 (77,4)	1,95 (100)	0,83 (84,5)	4,31 (66,7)
26	0,02 (19,4)	1,12 (100)	1,05 (100)	5,39 (83,5)
27	0,41 (100)	1,98 (100)	1,69 (100)	4,46 (69,0)

^a números entre parênteses representam a percentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO F – Ensaios do planejamento experimental (H₂SO₄) com os respectivos conteúdos de carboidratos liberados na fase líquida após a pré-hidrólise para a casca de eucalipto (EG2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b			
	Fucose	Arabinose	Galactose	Frutose
1	0,03 (22,9)	0,85 (74,2)	0,06 (4,6)	1,96 (75,5)
2	0,03 (24,3)	0,90 (78,7)	0,06 (4,9)	2,00 (76,9)
3	0,07 (57,5)	1,45 (100)	0,34 (28,8)	1,65 (63,5)
4	0,07 (57,9)	1,49 (100)	0,38 (31,7)	1,62 (62,3)
5	0,08 (69,4)	1,92 (100)	1,02 (86,1)	1,93 (74,1)
6	0,13 (105,0)	1,70 (100)	1,66 (100)	0,45 (17,3)
7	0,09 (72,1)	1,99 (100)	1,13 (95,0)	1,93 (74,1)
8	0,18 (151,4)	1,89 (100)	1,89 (100)	0,43 (16,6)
9	0,04 (33,2)	1,19 (100)	0,08 (6,5)	1,83 (70,2)
10	0,04 (36,4)	1,29 (100)	0,08 (6,9)	1,88 (72,1)
11	0,06 (52,3)	1,31 (100)	0,54 (45,6)	1,43 (55,1)
12	0,07 (54,8)	1,41 (100)	0,61 (51,6)	1,46 (56,2)
13	0,14 (100)	1,96 (100)	2,01 (100)	0,87 (33,6)
14	0,18 (100)	2,03 (100)	2,11 (100)	0,83 (31,8)
15	0,08 (64,2)	1,77 (100)	1,71 (100)	0,09 (3,4)
16	0,08 (69,5)	1,88 (100)	1,85 (100)	0,04 (1,6)
17	0,08 (66,6)	1,81 (100)	0,61 (51,7)	2,00 (76,9)
18	0,09 (75,5)	2,03 (100)	0,70 (58,9)	2,16 (83,2)
19	0,08 (66,7)	1,88 (100)	0,24 (20,2)	2,33 (89,5)
20	0,09 (77,2)	1,37 (100)	1,22 (100)	0,31 (12,1)
21	0,02 (13,8)	0,79 (69,4)	0,05 (4,0)	2,50 (96,3)
22	0,09 (71,1)	2,06 (100)	2,00 (100)	0,05 (1,9)
23	0,09 (71,6)	1,94 (100)	0,30 (25,0)	2,32 (89,3)
24	0,09 (74,7)	2,02 (100)	1,40 (100)	1,81 (69,7)
25	0,09 (74,5)	2,02 (100)	1,71 (100)	2,18 (83,8)
26	0,02 (19,1)	2,14 (100)	1,05 (88,3)	2,47 (95,1)
27	0,23 (100)	2,02 (100)	2,00 (100)	2,62 (100)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO G – Ensaio do planejamento experimental (H₂SO₄) com os respectivos conteúdos de carboidratos liberados na fase líquida após pré-hidrólise para o bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b		
	Fucose	Arabinose	Galactose
1	0,01 (6,0)	0,93 (75,8)	0,02 (6,5)
2	0,01 (5,8)	0,96 (79,1)	0,02 (6,4)
3	0,01 (12,9)	1,21 (98,9)	0,11 (34,3)
4	0,02 (18,9)	1,38 (100)	0,12 (38,9)
5	0,02 (20,6)	1,58 (100)	0,26 (83,7)
6	0,02 (21,0)	1,65 (100)	0,28 (88,7)
7	0,02 (21,2)	1,79 (100)	0,28 (91,7)
8	0,02 (24,8)	1,95 (100)	0,32 (100)
9	0,01 (9,4)	1,02 (83,6)	0,04 (11,5)
10	0,01 (10,2)	1,40 (100)	0,04 (11,6)
11	0,01 (12,6)	1,21 (99,0)	0,16 (53,0)
12	0,02 (15,6)	1,29 (100)	0,18 (58,3)
13	0,02 (21,6)	1,95 (100)	0,39 (100)
14	0,02 (24,7)	2,12 (100)	0,43 (100)
15	0,03 (25,7)	2,17 (100)	0,39 (100)
16	0,03 (27,2)	2,39 (100)	0,44 (100)
17	0,02 (20,0)	1,66 (100)	0,24 (78,0)
18	0,02 (23,7)	1,93 (100)	0,28 (91,5)
19	0,02 (17,3)	1,60 (100)	0,09 (29,5)
20	0,03 (32,7)	1,61 (100)	0,28 (89,7)
21	0,00 (3,1)	1,01 (82,5)	0,01 (4,3)
22	0,03 (27,8)	2,53 (100)	0,44 (142,6)
23	0,02 (18,5)	1,59 (100)	0,10 (32,9)
24	0,02 (23,7)	1,98 (100)	0,35 (111,4)
25	0,02 (21,8)	1,81 (100)	0,26 (85,1)
26	0,02 (25,0)	1,16 (94,9)	0,15 (48,9)
27	0,03 (28,6)	2,29 (100)	0,47 (100)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO H - Ensaios do planejamento experimental ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) com os respectivos conteúdos dos carboidratos (arabinose e galactose) presentes no resíduo sólido após a pré-hidrólise das cascas de eucalipto (HGU2 e EG2) e bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos % (MS) ^a					
	HGU2		EG2		bagaço	
	Arabinose	Galactose	Arabinose	Galactose	Arabinose	Galactose
1	0,52	1,05	0,54	1,18	0,94	0,31
2	0,14	0,65	0,18	0,84	0,24	0,15
3	0,35	0,90	0,39	1,08	0,73	0,26
4	0,11	0,36	0,12	0,38	0,14	0,08
5	0,12	0,61	0,21	0,76	0,46	0,16
6	0,07	0,03	0,09	0,08	0,08	0,02
7	0,47	0,46	0,15	0,60	0,25	0,08
8	0,09	0,02	0,11	0,05	0,10	0,04
9	0,30	0,69	0,52	1,18	0,72	0,22
10	0,10	0,07	0,13	0,06	0,08	0,04
11	0,16	0,56	0,19	0,84	0,33	0,12
12	0,08	0,22	0,13	0,32	0,13	0,05
13	0,38	1,03	0,34	1,14	0,76	0,29
14	0,13	0,52	0,10	0,05	0,08	0,03
15	0,10	0,10	0,15	0,65	0,28	0,15
16	0,11	0,09	0,17	0,75	0,27	0,13
17	0,10	0,10	0,16	0,68	0,23	0,12

^a média e triplicatas

ANEXO J - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase líquida (hidrolisado), após pré-hidrólise da casca de eucalipto (HGU2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b			
	Fucose	Arabinose	Galactose	Ramnose
1	0,09 (90,0)	1,31 (100)	0,25 (25,8)	0,15 (43,8)
2	0,09 (90,0)	1,29 (100)	0,84 (85,3)	0,27 (79,1)
3	0,09 (90,0)	1,34 (100)	0,79 (80,7)	0,25 (74,7)
4	0,09 (90,0)	1,24 (100)	1,10 (100)	0,33 (97,0)
5	0,09 (90,0)	1,25 (100)	0,37 (38,7)	0,19 (55,7)
6	0,09 (90,0)	1,21 (100)	0,97 (98,6)	0,26 (77,3)
7	0,09 (90,0)	1,23 (100)	0,93 (95,1)	0,26 (75,2)
8	0,09 (90,0)	1,14 (100)	1,03 (100)	0,37 (100)
9	0,09 (90,0)	1,24 (100)	0,29 (29,4)	0,17 (50,8)
10	0,07 (72,6)	0,97 (87,1)	0,88 (89,7)	0,33 (97,4)
11	0,09 (90,0)	1,23 (100)	0,56 (57,6)	0,21 (61,2)
12	0,09 (90,0)	1,16 (100)	1,04 (100)	0,40 (100)
13	0,10 (98,7)	1,29 (100)	0,92 (94,0)	0,24 (72,0)
14	0,09 (90,0)	1,18 (100)	1,03 (100)	0,30 (87,3)
15	0,09 (90,0)	1,21 (100)	1,02 (100)	0,27 (80,5)
16	0,09 (90,0)	1,22 (100)	1,01 (100)	0,28 (82,0)
17	0,09 (90,0)	1,21 (100)	1,02 (100)	0,27 (80,9)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO K - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase líquida (hidrolisado), após pré-hidrólise da casca de eucalipto (EG2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b			
	Fucose	Arabinose	Galactose	Ramnose
1	0,09 (75,2)	1,09 (95,5)	0,25 (20,9)	0,13 (38,6)
2	0,10 (84,6)	1,11 (97,0)	0,83 (69,8)	0,23 (66,5)
3	0,09 (75,1)	1,11 (97,7)	0,82 (69,3)	0,22 (65,7)
4	0,10 (80,0)	1,09 (95,7)	1,11 (93,7)	0,32 (93,7)
5	0,10 (80,8)	1,10 (96,8)	0,36 (29,8)	0,15 (44,0)
6	0,09 (76,5)	1,10 (96,2)	0,95 (80,2)	0,26 (75,8)
7	0,09 (78,4)	1,11 (97,3)	0,99 (83,5)	0,25 (72,8)
8	0,09 (78,0)	1,05 (92,5)	1,10 (92,9)	0,37 (100)
9	0,09 (75,7)	1,08 (94,4)	0,27 (22,5)	0,13 (37,7)
10	0,09 (72,2)	0,99 (87,0)	1,02 (85,7)	0,35 (100)
11	0,09 (74,6)	1,12 (98,0)	0,68 (57,4)	0,21 (62,0)
12	0,09 (77,3)	1,02 (89,5)	1,05 (88,6)	0,39 (100)
13	0,09 (75,1)	1,07 (94,2)	0,91 (76,7)	0,23 (66,4)
14	0,09 (77,3)	1,08 (94,4)	1,07 (89,8)	0,27 (80,1)
15	0,09 (74,7)	1,05 (92,3)	1,01 (84,7)	0,25 (73,2)
16	0,09 (74,8)	1,06 (92,6)	1,00 (84,1)	0,23 (67,4)
17	0,09 (77,5)	1,09 (96,0)	1,04 (87,7)	0,24 (70,3)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO L - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase líquida (hidrolisado), após pré-hidrólise do bagaço de cana (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaio	Carboidratos % MS ^b			
	Fucose	Arabinose	Galactose	Ramnose
5	0,02 (24,2)	1,09 (89,5)	0,14 (44,7)	0,02 (21,7)
6	0,03 (26,9)	1,21 (99,5)	0,30 (96,1)	0,05 (49,7)
9	0,02 (21,0)	1,02 (83,4)	0,11 (34,5)	0,03 (26,7)
12	0,03 (29,2)	1,44 (100)	0,33 (100)	0,09 (87,7)
14	0,03 (26,6)	1,35 (100)	0,33 (100)	0,07 (68,7)

^a números entre parênteses representam a porcentagem dos carboidratos removidos da amostra original

^b valores médios em triplicata

ANEXO M- Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase sólida (biomassa residual), após pré-hidrólise da casca de eucalipto (HGU2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos (%MS) ^a			
	<i>Fucose</i>	<i>Ramnose</i>	<i>Arabinose</i>	<i>Galactose</i>
1	0,06	0,09	0,03	0,25
2	0,07	0,03	0,03	0,03
3	0,05	0,04	0,03	0,06
4	0,09	0,06	0,04	0,02
5	0,07	0,07	0,02	0,17
6	0,19	0,07	0,03	0,04
7	0,14	0,03	0,05	0,02
8	0,08	0,05	0,05	0,03
9	0,05	0,10	0,04	0,25
10	0,04	0,05	0,02	0,01
11	0,05	0,04	0,05	0,05
12	0,07	0,04	0,04	0,03
13	0,06	0,07	0,03	0,01
14	0,09	0,01	0,03	0,01
15	0,04	0,01	0,03	0,01
16	0,04	0,03	0,05	0,02
17	0,05	0,02	0,04	0,02

^a valores médios em triplicata

ANEXO N - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase sólida (massa residual), após pré-hidrólise da casca de eucalipto (EG2) (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos (%MS) ^a			
	<i>Fucose</i>	<i>Ramnose</i>	<i>Arabinose</i>	<i>Galactose</i>
1	0,06	0,17	0,06	0,34
2	0,04	0,04	0,03	0,07
3	0,04	0,10	0,03	0,07
4	0,03	0,05	0,01	0,02
5	0,03	0,10	0,04	0,21
6	0,03	0,03	0,05	0,03
7	0,07	0,07	0,01	0,04
8	0,06	0,01	0,03	0,00
9	0,04	0,13	0,04	0,27
10	0,04	0,11	0,03	0,01
11	0,04	0,05	0,03	0,05
12	0,04	0,02	0,02	0,01
13	0,09	0,03	0,03	0,02
14	0,02	0,03	0,02	0,01
15	0,05	0,05	0,03	0,03
16	0,03	0,02	0,02	0,03
17	0,04	0,06	0,04	0,02

^a valores médios em triplicata

ANEXO O - Ensaios do planejamento experimental (HCl) com os respectivos conteúdos de carboidratos na fase sólida (massa residual), após pré-hidrólise do bagaço de cana de açúcar (valores expressos em % de matéria seca)

Ensaios	Carboidratos (%MS) ^a		
	<i>Fucose</i>	<i>Arabinose</i>	<i>Galactose</i>
5	0,10	0,35	0,07
6	0,10	0,35	0,08
9	0,10	0,36	0,11
12	0,09	0,16	0,08
14	0,08	0,18	0,09

^a valores médios em triplicata