UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de Lorena

JOÃO EVANDRO BRANDÃO TAVARES

Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com sulfito na composição, digestibilidade enzimática e fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Lorena

2015

JOÃO EVANDRO BRANDÃO TAVARES

Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com sulfito na composição, digestibilidade enzimática e fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Conversão de Biomassa.

Orientador:

Prof. Doutor Flávio Teixeira da Silva

Verão Original

Lorena

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tavares, João Evandro Brandão

Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com sulfito na composição, digestibilidade enzimática e fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar pré tratado / João Evandro Brandão Tavares; orientador Flávio Teixeira da Silva - Versão Original. - Lorena, 2015.
153 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Flávio Teixeira da Silva

1. Biocombustíveis. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Bioetanol. 4. Hidrólise enzimática. 5. Fermentação. I. Título. II. Silva, Flávio Teixeira da, orient.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, pela constante presença na minha vida, pela força que me fez chegar até aqui, mesmo que por caminhos nem sempre fáceis.

À minha família, especialmente, à minha filha Tatiana e à minha esposa Fátima, por terem estado sempre do meu lado mesmo à distância. Aos meus pais que sempre acreditaram na minha capacidade e sempre me apoiaram incondicionalmente. Aos meus irmãos, pelo constante incentivo moral.

Ao meu orientador, Professor Doutor Flávio Teixeira Da Silva, pela confiança, pela amizade e pela oportunidade de realizar este projeto.

Ao PEC-PG/CAPES, pela concessão da bolsa de estudo sem a qual seria impossível a realização deste Doutorado.

Aos estimados Professores, Doutor André Luís Ferraz, Doutora Teresa Paiva e Doutora Adriane Milagres, pela disponibilização dos seus laboratórios e pelo impecável apoio que me deram durante toda a realização deste projeto.

Aos técnicos, Cléber, Lucinha, José Moreira e José “Cobrinha”, pela disposição em ajudar, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

A todos os companheiros do Laboratório de Química de Materiais Lignocelulósicos (LQML), pelos bons momentos e, principalmente, pelos mais difíceis de ultrapassar, em especial, Juliana Furlani, Marta Sousa, Davi, Erlon, Claudinei, Lucas, Kélen, Paula e Rossana. A todos os alunos de Iniciação Científica (IC) que passaram pelo LQML durante a minha estada, destacando-se os meus IC's, o Iuri, a Isabela, a Mariana, a Carolina e o Kotchenko, que me acompanharam e auxiliaram muito.

A todos os meus colegas e amigos da EEL-USP, em particular, o Juan, o Thales, o Omar, o o Felipe, o Victor, o Celso, o Rafael, o Túlio, o Cláudio, o Bruno Guedes, o Flávio Ferraz a Fernanda, a Isabela, a Mayara, enfim a todos, pelo companheirismo, amizade e camaradagem.

RESUMO

TAVARES, J.E.B. **Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com sulfito na composição, digestibilidade enzimática e fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**. 2015. 153p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Atualmente, o aquecimento global, a deterioração ambiental, a eminente escassez das limitadas reservas de combustíveis fósseis e a forte demanda e dependência da matriz energética mundial face a esses combustíveis constituem sérias ameaças à sustentabilidade do desenvolvimento mundial, o que se têm revertido a favor de um crescente interesse por fontes alternativas de energia renováveis, dentre os quais a biomassa lignocelulósica se destaca como uma das mais promissoras. Neste contexto, a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar pela via enzimática e bioquímica se apresenta como uma das mais oportunas alternativas para a produção integrada e sustentável de biocombustível visando otimização de recursos, redução de resíduos e minimização de impactos ambientais nefastos. Todavia, o desenvolvimento de um pré-tratamento eficaz, a par da produção de enzimas hidrolíticas, constitui a chave para a viabilização da produção de etanol a partir de lignocelulósicos. Assim sendo, o propósito deste trabalho foi determinar os efeitos produzidos pelo pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito sobre a composição química do bagaço de cana e correlacionar esses valores com a eficiência da sacarificação enzimática e fermentabilidade do hidrolisado obtido desse bagaço. Após caracterização química inicial, o bagaço *in natura* foi pré-tratado com sulfito neutro e alcalino e verificou-se que a celulose foi recuperada quase que integralmente nas frações sólidas da reação. Por seu turno, as xilanas obtiveram solubilizações máximas de 72,0% e 35,4% enquanto a deslignificação máxima foi de 43,5% e 76,7%, para as reações catalisadas com sulfito neutro e sulfito alcalino respectivamente. Verificou-se maior efetividade do sulfito alcalino no enriquecimento de carboidratos no bagaço pré-tratado bem como uma maior deslignificação, pelo que, foi escolhido para as etapas seguintes do projeto. A partir de um planejamento fatorial 3^3 , foram obtidos substratos pré-tratados que levaram aos máximos de sacarificação enzimática de 79,91% e 70,69% para celulose e xilanas, respectivamente, utilizando 10 UPF de celulasas e 10 UCB de β -glucosidase. Pela análise do rendimento global de glucanas foi definida a condição ótima para o pré-tratamento empregando 10% (m/m) de sulfito alcalino a 150°C, por 30 min, o que foi corroborada pela análise estatística. Hidrolisados enzimáticos de bagaços pré-tratados em condições otimizadas foram fermentados a etanol com eficiência de, praticamente, 100% pela *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e 80,41% pela *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773. Para as duas leveduras, os parâmetros fermentativos do hidrolisado foram em tudo semelhantes aos verificados para os meios semissintéticos contendo glicose e xilose puras. Conclui-se assim, que o pré-tratamento adotado neste trabalho apresentou grande potencialidade em gerar substratos com alta digestibilidade enzimática e hidrolisados tão fermentáveis quanto meios semissintéticos.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Bagaço de cana-de-açúcar; Bioetanol; Hidrólise enzimática; Fermentação.

ABSTRACT

TAVARES, J.E.B. **Effects of sulfite pretreatment on composition, enzymatic digestibility and fermentability of pretreated sugarcane bagasse.** 2015. 153p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Currently, global warming, environmental degradation, imminent shortage of limited fossil fuel reserves and an intense demand and dependence of global energy on these fuels constitute serious threats to the sustainability of world development, which have led to a growing interest in alternative sources of renewable energy, among which lignocellulosic biomass stands out as one of the most promising. In this context, the production of ethanol from sugarcane bagasse by enzymatic and biochemical routes appears as the most promising alternative for integrated and sustainable production of biofuel aiming resource optimization, waste reduction and mitigation of adverse environmental impacts. However, the development of an effective pretreatment, as well as the production of hydrolytic enzymes, is the key to enabling the production of ethanol from lignocellulosics. Therefore, the purpose of this study was to determine the effects of hydrothermal pretreatment catalyzed by sulfite on the chemical composition of sugarcane bagasse and establish a correlation of these values with the efficiency of enzymatic saccharification and fermentability of these bagasse hydrolyzate. After the initial chemical characterization, the bagasse was pretreated with neutral and alkaline sulfite and was found that cellulose was almost fully recovered in the solid fraction of the reaction. In turn, xylan obtained its maximum solubilization of 72.0% and 35.4% while the maximum delignification was 43.5% and 76.7%, for the reactions catalyzed by neutral and alkaline sulfite, respectively. The alkaline sulfite was found more effective for carbohydrates enrichment in the pretreated bagasse and led to a greater delignification, therefore, it was chosen for the following stages of the project. From a 3³ full factorial experiments were obtained pretreated substrates which led to maximum enzymatic saccharification of 79.91% and 70.69% for cellulose and xylans, respectively, using 10 FPU cellulases and 10 CBU β -glucosidase. By analysis of the glucans overall yield the optimal condition for the pretreatment has been defined as 10% (w/w) alkaline sulfide at 150°C for 30 min, which was confirmed by statistical analysis. Enzymatic hydrolysates of bagasse pretreated in optimized conditions were fermented into ethanol with efficiency of virtually 100% by *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 and 80.41% by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773. For both yeasts, the hydrolyzate fermentation parameters were at all similar to those seen for the semisynthetic media containing pure glucose and xylose. Therefore, we concluded that the pre-treatment used in this work showed great potential to generate substrates with high enzymatic digestibility and hydrolysates as fermentable as semisynthetic media.

Keywords: Biofuels; Sugarcane bagasse; Ethanol; Enzymatic hydrolysis; Fermentation.

Lista de Figuras

Figura 1: Evolução do consumo de energia primária mundial e a diversificação das fontes desde a revolução industrial.....	20
Figura 2: A - Estimativas das reservas recuperáveis de combustíveis fósseis avaliadas por agências internacionais e corporações energéticas (USGS - United States Geological Survey; EIA - Environmental impact assessment; BP - British Petroleum; BGR - Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe; WEC - World Energy Council; IEA - International Energy Agency). B – Projeções da produção de combustíveis fósseis calculadas para cenários intermediários. Bb-ep = bilhões de barris de equivalente de petróleo; Gb-ep = giga barris de equivalente de petróleo.....	22
Figura 3: Variação da temperatura média global.....	25
Figura 4: Estrutura química de uma cadeia linear de celulose com as unidades de glucose unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e a unidade repetitiva sendo a β -celobiose.....	30
Figura 5: 1 - Álcoois hidroxicinâmicos precursores da lignina. Os principais precursores são o álcool trans- <i>p</i> -coumarílico (A), o álcool coniferílico (B) e o álcool trans-sinapílico (C). Os precursores que podem existir em menores proporções são o coniferaldeído (D), o álcool acetilconiferaldeído (E) e o ácido ferúlico (F). 2 – Principais tipos de ligações entre as unidades estruturais da lignina.....	33
Figura 6: Produção de cana-de-açúcar no mundo.....	35
Figura 7: Esquema da desestruturação da fibra lignocelulósica depois de passar por um pré-tratamento.....	38
Figura 8: Possíveis vias de hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar.....	51
Figura 9: Curva de aquecimento do reator de Nióbio.....	61
Figura 10: Esboço do rendimento do bagaço pré-tratado, da fração solubilizada e da fração solubilizada recuperada, relativos aos pré-tratamentos com sulfito neutro (10%).	80
Figura 11: Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas nos pré-tratamentos com sulfito neutro.	81
Figura 12: Variação da composição química das frações solubilizadas através do pré-tratamento com sulfito neutro nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.	83
Figura 13: Variação da composição química (A) e balanço de massa dos componentes estruturais (B) dos bagaços pré-tratados com sulfito neutro nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.....	84
Figura 14: Esboço do rendimento do bagaço pré-tratado, da fração solubilizada e da fração solubilizada recuperada, relativos aos pré-tratamentos com sulfito alcalino nas concentrações de 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C).	94
Figura 15: Percentual da fração solubilizada, nos pré-tratamentos com sulfito alcalino (SA) a 10%, 7,5% e 5%, perdida para compostos não identificados.	95
Figura 16: Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através dos pré-tratamentos com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C).	97
Figura 17: Balanço de massa dos componentes estruturais dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.....	99
Figura 18: Esboço gráfico da cinética de conversão enzimática da celulose dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diversas condições. Legendas correspondem a temperatura(°C)/tempo(min).....	106

Figura 19: Esboço gráfico da cinética de conversão enzimática das xilanas dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diversas condições. Legendas correspondem a temperatura(°C)/tempo(min).....	107
Figura 20: Velocidade de liberação de açúcares nas primeiras 8 horas de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados nas diversas condições. Glu e Xyl equivalem a glucose e xilose, respectivamente; SA – Sulfito Alcalino.	108
Figura 21: Rendimentos de sacarificação da celulose (A) e xilanas (B) após 72h de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados.....	109
Figura 22: Concentração de açúcares fermentescíveis obtidos pela hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados. Os gráficos A, B e C mostram as concentrações de glicose, xilose e a soma de glicose e xilose, respectivamente.....	111
Figura 23: Correlação dos rendimentos de sacarificação das glucanas e xilanas com a deslignificação (A) e retirada de xilanas (B) verificadas na etapa de pré-tratamento.	113
Figura 24: Rendimento global de recuperação das glucanas (A) e xilanas (B) após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.	114
Figura 25: Representação da deslignificação, retirada de xilanas, rendimento da hidrólise e rendimento global de glucanas em função dos índices de severidade Log Ro (A e B), Log Ro' (Ce D) e Log So (E e F).....	117
Figura 26: Gráficos de Pareto representando a estimativa dos efeitos principais e das interações sobre as variáveis resposta retirada de xilanas (A) e deslignificação (B), ao nível de 95 % de confiança.	121
Figura 27: Valores observados versus valores preditos para a retirada de xilanas (A) e a deslignificação (B), durante a etapa de pré-tratamento com sulfito alcalino.....	123
Figura 28: Curvas de nível dos modelos propostos que representam a retirada de xilanas (A, B e C) e a deslignificação (D, E e F) após o pré-tratamento com sulfito alcalino nas diversas condições do planejamento.....	124
Figura 29: Gráficos de Pareto representando a estimativa dos efeitos principais e das interações sobre as variáveis resposta hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B), ao nível de 95 % de confiança.	126
Figura 30: Valores observados versus valores preditos para a hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B).	128
Figura 31: Superfícies de Resposta descritas pelos modelos que representam a hidrólise enzimática (A, B e C) e o rendimento global (D) em função das diferentes condições do planejamento.	130
Figura 32: Perfil de fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado na condição otimizada (A) e meio controle (B), pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2. Gli – glicose; Xil – xilose; Glice – glicerol.	132
Figura 33: Perfil de fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado na condição otimizada (A) e meio controle (B), pela <i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> CBS 5773. Gli – glicose; Xil – xilose; Glice – glicerol.....	135

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais tipos de polissacarídeos presentes nas hemiceluloses.....	32
Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três principais processos de hidrólise.	47
Tabela 3: Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respectivos valores de conversão.....	60
Tabela 4: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> utilizado no presente trabalho.	75
Tabela 5: Teores percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar.	75
Tabela 6: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito neutro (10%) e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.	77
Tabela 7: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito neutro. n.a. = não analisado.	79
Tabela 8: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 10% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.	86
Tabela 9: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 7,5% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.	87
Tabela 10: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 5% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.	88
Tabela 11: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 10%. n.a. = não analisado.	90
Tabela 12: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 7,5%. n.a. = não analisado.	91
Tabela 13: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 5%. n.a. = não analisado.....	92
Tabela 14: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 10% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.	102
Tabela 15: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 7,5% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.	103
Tabela 16: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 5% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.	104
Tabela 17: Representação das condições de pré-tratamento com sulfito alcalino acompanhadas das severidades e das respostas mais relevantes no contexto de produção de etanol lignocelulósico. %Sulf – percentagem de sulfito alcalino, T(°C) – temperatura da reação, t (min) – tempo do pré-tratamento, Log Ro – fator de severidade, Log Ro' – severidade combinada, Log So – severidade catalítica, Ret Xil – retirada de xilanas, Deslig – deslignificação, Hidr Enz – rendimento da hidrólise da celulose, Rend Gl – rendimento global de recuperação das glucanas.	116

Tabela 18: Intervalo de valores estudados no planejamento 3 ³ referente ao pré-tratamento com sulfito alcalino.....	118
Tabela 19: Matriz de planejamento com os resultados das variáveis resposta: retirada de xilanas (Ret Xil), deslignificação (Deslig), hidrólise enzimática (Hid Enz) e rendimento global (Rend Glob).	119
Tabela 20: Coeficientes de regressão para a retirada de xilanas durante a etapa de pré-tratamento, considerando a 95% de confiança.....	120
Tabela 21: Coeficientes de regressão para a deslignificação durante a etapa de pré-tratamento, considerando a 95% de confiança.....	120
Tabela 22: Análise de variância dos efeitos significativos dos parâmetros avaliados sobre as respostas retirada de xilanas (A) e deslignificação (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática.	122
Tabela 23: Análise de variância de regressão para os modelos preditores da retirada de xilanas (A) e da deslignificação (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática; Fcalc – valor F calculado; Ftab – valor F tabelado.	123
Tabela 24: Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática da celulose (A) e rendimento global de glucanas (B), considerando 95% de confiança.	126
Tabela 25: Análise de variância dos efeitos dos parâmetros admitidos nos modelos preditores das respostas hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática.	127
Tabela 26: Erros relativos dos valores preditos pelos modelos em relação aos valores observados para as respostas hidrólise enzimática e rendimento global. S – Sulfito; T – Temperatura; t – tempo; Obs – valores observados; Pred – valores preditos; Er Rel – erros relativos.....	128
Tabela 27: Análise de variância de regressão para os modelos preditores da hidrólise enzimática (A) e do rendimento global (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática; Fcalc – valor F calculado; Ftab – valor F tabelado.	129
Tabela 28: Composição química do bagaço pré-tratado e do hidrolisado enzimático, obtidos a partir de pré-tratamentos na condição otimizada (SA 10%, 150°C, 30 min).	131
Tabela 29: Parâmetros após 4 horas de fermentação do hidrolisado e do meio controle pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2. ΔS – Gli → consumo de glicose; ΔS – Xil → consumo de xilose; Etanol Máx. → concentração máxima de etanol; $Y_{Et/S}$ → rendimento em etanol; Y_{Et} → Eficiência de conversão de açúcares em etanol; Q_p → produtividade volumétrica; $Y_{X/S}$ → rendimento em biomassa; $Y_{G/S}$ → rendimento em glicerol.	133
Tabela 30: Parâmetros após 8 horas de fermentação do hidrolisado e do meio controle pela levedura <i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> CBS 5773. ΔS – Gli → consumo de glicose; ΔS – Xil → consumo de xilose; Etanol Máx. → concentração máxima de etanol; $Y_{Et/S}$ → rendimento em etanol; Y_{Et} → Eficiência de conversão de açúcares em etanol; Q_p → produtividade volumétrica; $Y_{X/S}$ → rendimento em biomassa; $Y_{G/S}$ → rendimento em glicerol.	136

Sumário

1.	Introdução	15
2.	Revisão bibliográfica	19
2.1	Os combustíveis fósseis no sistema energético global	19
2.2	Esgotamento das reservas de combustíveis fósseis	21
2.3	Emissões nocivas, degradação ambiental e alterações climáticas	24
2.4	Energias alternativas renováveis.....	26
2.5	Biomassa como fonte de bioenergia	28
2.6	Composição da biomassa lignocelulósica.....	29
2.6.1	Celulose	30
2.6.2	Hemiceluloses	31
2.6.3	Lignina	32
2.7	Bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para bioetanol	34
2.8	Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos – Bagaço de cana-de-açúcar 37	
2.8.1	Pré-tratamento.....	37
2.8.1.1	Explosão a vapor.....	39
2.8.1.2	Pré-tratamento hidrotérmico - Hidrotermólise	41
2.8.1.3	Pré-tratamento com ácido diluído - Pré-hidrólise ácida	42
2.8.1.4	Pré-tratamento em meio alcalino	43
2.8.1.5	Pré-tratamento com sulfito.....	44
2.8.1.6	Impactos do pré-tratamento com sulfito	45
2.8.2	Hidrólise e sacarificação da biomassa lignocelulósica	46
2.8.2.1	Hidrólise enzimática da celulose	48
2.8.2.2	Hidrólise enzimática das hemiceluloses	50
2.8.3	Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático	50
3.	Objetivos.....	55
4.	Metodologia.....	56
4.1	Preparação da matéria-prima usada no estudo.....	56
4.2	Caracterização química do Bagaço <i>in natura</i> e do Bagaço pré-tratado.....	56
4.2.1	Determinação da massa seca.....	56
4.2.2	Determinação dos extrativos.....	57
4.2.3	Hidrólise com ácido concentrado (H ₂ SO ₄ 72%).....	57
4.2.4	Determinação da lignina solúvel.....	58

4.2.5	Determinação de lignina Klason insolúvel em meio ácido.....	59
4.2.6	Determinação do teor de cinzas totais.....	59
4.2.7	Determinação de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois.....	60
4.3	Reações de pré-tratamento	61
4.3.1	Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito	61
4.3.2	Cálculo da severidade dos pré-tratamentos.....	62
4.3.3	Cálculos de rendimento dos pré-tratamentos	63
4.3.4	Análise da fração líquida do pré-tratamento	64
4.4	Hidrólise enzimática	65
4.4.1	Determinação da atividade celulásica total (UFP).....	65
4.4.2	Determinação da atividade celobiásica total (UCB).....	66
4.4.3	Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.....	67
4.5	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático	68
4.5.1	Manutenção e reativação das leveduras	69
4.5.2	Propagação e preparação do inóculo.....	70
4.5.3	Determinação da viabilidade celular.....	70
4.5.4	Determinação do peso seco e da concentração de biomassa de leveduras	71
4.5.5	Ensaio de fermentação.....	71
4.5.6	Preparação e análise das amostras	72
4.5.7	Determinação dos parâmetros fermentativos.....	72
4.5.8	Análise Estatística	72
5.	Resultados e discussão	74
5.1	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	74
5.2	Efeito do pré-tratamento com sulfito na composição do bagaço pré-tratado	76
5.2.1	Pré-tratamento com sulfito neutro.....	76
5.2.1.1	Rendimentos	80
5.2.1.2	Solubilização dos componentes estruturais.....	81
5.2.1.3	Composição química da fração solubilizada.....	82
5.2.1.4	Composição química do bagaço pré-tratado.....	83
5.2.2	Pré-tratamento com Sulfito Alcalino	85
5.2.2.1	Rendimentos	93
5.2.2.2	Solubilização dos componentes estruturais.....	95
5.2.2.3	Composição química da fração solubilizada.....	98
5.2.2.4	Composição química do bagaço pré-tratado	98
5.3	Efeito do pré-tratamento com sulfito na digestibilidade do bagaço pré-tratado	100

5.3.1	Cinética de hidrólise	101
5.3.2	Rendimento de sacarificação e concentração de açúcares fermentescíveis.....	109
5.3.3	Correlação da deslignificação e retirada de xilanas com os rendimentos de hidrólise 112	
5.4	Rendimentos globais.....	113
5.5	Correlação da severidade do pré-tratamento com as respostas mais relevantes do processo	115
5.6	Análise estatística	118
5.6.1	Determinação dos efeitos principais e dos modelos para a predição da retirada de xilanas e da deslignificação	119
5.6.2	Determinação dos efeitos principais e dos modelos para a predição da hidrólise enzimática e do rendimento global	125
5.7	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático.....	131
6.	Conclusões	138
	Referencias.....	140

1. Introdução

Desde a revolução industrial, os combustíveis fósseis têm sido a força motriz por detrás do mundo industrializado e do crescimento econômico. A utilização de energia de origem fóssil cresceu de níveis insignificantes no início do século XIX, para uma produção anual de mais de doze bilhões de toneladas de equivalentes de petróleo em 2011, sendo que esses combustíveis representam atualmente cerca de 80% de toda energia primária mundial (IEA, 2011; BP, 2012). Dada a predominância atual desses combustíveis é de se prever que continuarão a ser a “espinha dorsal” na matriz energética mundial, pelo menos a curto e médio prazo (ECOFYS, 2012; HÖÖK *et al.*, 2012; HÖÖK; TANG, 2013).

Todavia, desde o início da segunda metade do século XX que, com o crescimento populacional mundial à escala geométrica e consequente crescimento acelerado da demanda energética, se constatou que é insustentável continuar a assegurar o desenvolvimento econômico mundial na dependência dos combustíveis fósseis como pilares da matriz energética (REVELLE *et al.*, 1965; BRYSON, 1974; BACH, 1980).

Tal tomada de consciência se deveu, por um lado, ao facto de as fontes de combustíveis fósseis serem limitadas, finitas, tenderem a escassear num futuro não muito distante e o abastecimento estar vulnerável aos conflitos e instabilidades nas principais regiões produtoras acarretando altas nos preços e subsequente insegurança energética nos países dependentes (HOEL; KVEMDOKK, 1996; DEMIRBAS, 2007a; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; CHIARI; ZECCA, 2011; HÖÖK; TANG, 2013); Por outro lado, essa consciencialização foi impulsionada pela crescente preocupação com aumento da concentração atmosférica de gases poluentes e com efeito de estufa, resultantes do uso intensivo de combustíveis fósseis, o que está relacionado com consequências nefastas sobre o ambiente, incluindo as alterações climáticas, a perda da biodiversidade, a poluição atmosférica, entre outros (AMIN, 2009; MOHAI *et al.*, 2010; GIVENS; JORGENSEN, 2011).

Com os sucessivos alertas da comunidade científica mundial através da apresentação de indicadores gravíssimos de deterioração ambiental provocadas pelas emissões resultantes do crescente consumo de combustíveis fósseis, nasceu o movimento em prol do desenvolvimento sustentável que culminou numa proposta conciliadora estabelecendo a necessidade de uma sinergia dinâmica entre o crescimento econômico e a proteção do meio ambiente (LEFF, 1998). Assim, as questões de segurança no suprimento energético a longo prazo, a manutenção da competitividade económica e as mudanças

climáticas no meio ambiente causadas pelas emissões nocivas têm-se revertido em estímulos cada vez maiores para o desenvolvimento de fontes alternativas de energias renováveis, através da exploração de formas de se obter energia e combustíveis de maneira limpa e sustentável.

Ao longo dos últimos trinta a quarenta anos, as fontes de energias renováveis foram deixando de ser uma mera alternativa para os choques do petróleo, como foram inicialmente concebidas, para se tornarem uma opção verdadeiramente estratégica na sustentabilidade do suprimento energético à economia mundial em constante demanda por crescimento (PANWAR *et al.*, 2011). Essas fontes de energias renováveis têm-se tornado comercialmente competitivas e estão a fazer progressos relativamente rápidos na matriz energética mundial (KRALOVA; SJÖBLOM, 2010). A nível global, em média, o fornecimento de energias renováveis aumentou 2% ao ano entre 1990 e 2010 (IEA, 2009, 2012a), o que é um pouco maior do que a taxa de crescimento da energia primária mundial (1,9%) nesse período. Segundo as projeções de Conselho Europeu de Energia Renovável (2006), em 2040 aproximadamente metade da energia primária mundial virá de fontes renováveis. De acordo com Yuksel e Kaygusuz (2011), a fração correspondentes às energias renováveis na energia primária mundial foi de cerca de 18% em 2007, não obstante, segundo os relatórios de 2011 da Agencia Internacional de Energia (IEA, sigla em Inglês) e do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, sigla em Inglês) essa fração pode ser menor, sendo que, pelo menos, 10,2% provém da biomassa e resíduos, 2,3% é gerada pelas hidroelétricas e 0,8% é obtida do conjunto das energias eólica (0,2%), solar (0,1%), geotérmica e outras fontes renováveis (IEA, 2011; IPCC-SRREN, 2011). Apesar das energias solar fotovoltaica e eólica representarem uma pequeníssima fração da energia primária mundial, e, juntas, consistirem em apenas cerca de 3% da fração relativa às energias renováveis, constituem o setor energético que registou as mais elevadas taxas de crescimento anual de 1990-2010, com 44,3% e 25,1%, respectivamente (IEA, 2012a).

A biomassa, devido ao seu uso não comercial generalizado em países não industrializados, principalmente no aquecimento residencial e na cozinha, é de longe a maior fonte de energia renovável representando cerca de 80% da oferta global de energias renováveis. No entanto, esse uso, através da combustão tradicional, é muito ineficiente, pelo que, só se aproveita cerca de 20% da energia que se poderia obter por meios de conversão modernos, mais eficientes e com tecnologias já disponíveis (GUPTA *et al.*, 2010; YUKSEL; KAYGUSUZ, 2011). Entretanto, além da combustão direta, uma grande

variedade de combustíveis pode ser produzida a partir da biomassa, incluindo principalmente combustíveis líquidos, como o etanol, o metanol, o biodiesel e o diesel *Fischer-Tropsch*, e combustíveis gasosos, tais como o hidrogénio e o metano (KRALOVA; SJÖBLOM, 2010).

Perante o atual cenário energético mundial, os combustíveis derivados da biomassa, ou simplesmente os biocombustíveis, se posicionam como uma das mais promissoras fontes de energia alternativa, dado os benefícios resultantes do seu uso, o que inclui a sustentabilidade na produção, a redução da dependência face aos combustíveis fósseis e das emissões nocivas, o desenvolvimento rural e a segurança no abastecimento (SUN; CHENG, 2002; HAMELINCK *et al.*, 2005; DEMIRBAS, 2007b; NIGAM; SINGH, 2011; HASSAN; KALAM, 2013).

Os primeiros biocombustíveis obtidos de plantas e cultivares terrestres já são uma realidade e de entre eles se destacam o bioetanol, obtido de biomassas sacaríneas e amiláceas, o biodiesel, obtido a partir de diversos óleos vegetais e gordura animal, e o biogás, obtido por meio de tratamento anaeróbio de diversos tipos de biomassa e resíduos (NAIK *et al.*, 2010). Contudo, os biocombustíveis de primeira geração, além de não atingirem os limites da demanda (LIMAYEM; RICKE, 2012), continuam a despertar ceticismo, por causa dos possíveis impactos sobre a biodiversidade, derivados do alargamento da área cultivada através do desmatamento, devido também à incerteza na eficiência e no balanço das emissões e, sobretudo, devido à competição com a produção de alimentos o que acarreta volatilidade dos preços e insegurança no abastecimento de bens alimentares (ESCOBAR *et al.*, 2009). Estes constrangimentos à generalização da primeira geração de biocombustíveis desencadearam intensa pesquisa no sentido do desenvolvimento de alternativas mais eficientes baseadas em tecnologias renováveis capazes de um aproveitamento integral da biomassa. Assim, a biomassa lignocelulósica, obtida como matéria-prima barata, abundante, que não compete com a produção e abastecimento alimentar, e, muitas vezes, considerada apenas resíduo, se irrompe como a mais promissora matéria-prima para produção de biocombustíveis, ou seja, os biocombustíveis de segunda geração (SIMPSON-HOLLEY *et al.*, 2007; GOMEZ *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2010; NIGAM; SINGH, 2011).

Embora uma grande diversidade de biocombustíveis possa ser obtida a partir de processos de conversão, bioquímicos ou termoquímicos, os mais apontados exemplos de biocombustíveis de segunda geração são o etanol celulósico e o diesel *Fischer-Tropsch*, detentores de real potencial para, a curto ou médio prazo, atender a demanda e substituir

uma considerável fração dos principais combustíveis líquidos de origem fóssil, a gasolina e o diesel, que em conjunto constituem mais de 40% de toda a energia consumida mundialmente (GOYAL *et al.*, 2008; XUAN *et al.*, 2009; IEA, 2011, 2012b).

Conforme a revisão de Damartzis e Zabaniotou (2011), a conversão termoquímica de biomassa em biocombustíveis é de facto uma alternativa promissora que já conta com algumas tecnologias bem estabelecidas como é o caso da pirólise, da gaseificação e da síntese *Fischer-Tropsch*, contudo, a complexidade e interações entre as várias etapas de processamento exponenciam as dificuldades na compreensão exata do processo, pelo que, atualmente ainda está em andamento estudos visando a otimização e melhoramento da eficiência da conversão, até este momento apenas à escala laboratorial e piloto (DAMARTZIS; ZABANIOTOU, 2011).

Os processos bioquímicos/biológicos de conversão de biomassa lignocelulósica, caracterizados pelo baixo consumo de energia, estão entre as mais promissoras alternativas para a produção de biocombustíveis de forma ambientalmente sustentável (KÜÇÜK; DEMIRBAS, 1997). Dentre esses processos, mais se evidencia o que envolve a fermentação alcoólica para a produção de bioetanol dada a atenção que esse combustível desperta, pelo seu potencial para substituir a gasolina e pelo seu peso no mercado energético. Não obstante os inúmeros benefícios, o desenvolvimento de um processo eficiente para a conversão biológica de matéria-prima lignocelulósica a etanol se depara com obstáculos tanto de ordem tecnológica como também económica (DEMIRBAS, 2007b; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Esse processo, antes de tudo, envolve a “desconstrução” da estrutura recalcitrante da parede celular da biomassa lignocelulósica a fim de se poder hidrolisar os polissacarídeos em seus açúcares monoméricos que então poderão ser convertidos a etanol através da fermentação. Assim sendo, essa etapa de pré-tratamento prévia à hidrólise, a par da produção de enzimas hidrolíticas, é tida como crucial e a chave para a viabilização da produção de etanol lignocelulósico (MOSIER *et al.*, 2005b). Inúmeros estudos têm sido levados a cabo, principalmente na última década, e diversas abordagens de pré-tratamento foram investigadas em uma grande variedade de matérias-primas lignocelulósicas, da escala laboratorial para escala piloto e de demonstração, mas ainda longe da escala comercial (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; KUMAR *et al.*, 2009; GALBE; ZACCHI, 2012). Atualmente, além dos esforços para viabilizar o aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico (GÍRIO *et al.*, 2010), a larga maioria das pesquisas envolvendo etanol lignocelulósico está focada em identificar, avaliar, desenvolver e demonstrar abordagens

promissoras de pré-tratamentos que promovam a digestibilidade da biomassa tratada e a fermentabilidade do hidrolisado celulósico, isso, no sentido de viabilizar economicamente os custos de produção do etanol como biocombustível (SILVA, 2012).

2. Revisão bibliográfica

2.1 Os combustíveis fósseis no sistema energético global

A história da energia e a das civilizações são indissociáveis. A existência humana tem sido dominada pela velha necessidade de energia. Toda a atividade humana implica a conversão da energia, e alterações nas fontes básicas e no modo de utilização dessas fontes constituem a dimensão base da evolução das sociedades e das civilizações (SMIL, 2004).

Antes da era moderna, o homem dependia, quase que exclusivamente, da energia da biomassa, da energia dos seus próprios músculos ou de músculos de animais domesticados e, em alguns casos, da energia da água corrente ou do vento, para executar as mais diversas atividades relacionadas com a sobrevivência, com a obtenção de alimentos, com o aquecimento, com o deslocamento, com a construção de ferramentas e abrigo, etc. (WILLIAMS, 2006).

Com o início da era moderna, marcada pela introdução da máquina a vapor nas minas de carvão no século XVIII, a indústria existente que dependia quase inteiramente da energia da água corrente e que era limitada pela inflexibilidade geográfica foi sendo suplantada. Daí em diante, as relações sinérgicas entre a mineração do carvão, a indústria de ferro e a máquina a vapor levaram a avanços na tecnologia, tal que a partir de 1840 os motores a vapor começaram a substituir definitivamente os sistemas movidos a água corrente, até então dominantes nas indústrias (HINDLE; LUBAR, 1986).

Desta forma, os motores a vapor estabeleceram o início da ligação entre os combustíveis fósseis, a industrialização e a melhoria do padrão de vida das sociedades industrializadas. E o crescimento acelerado no consumo de energia, impulsionado pela demanda por mais serviços que essa energia podia prover, conduziu, desde a revolução industrial, a várias transições energéticas e tecnológicas. Essas transições não foram meras substituições de um combustível por outro mas sim a diversificação das fontes de combustíveis, acompanhada pela diversificação de tecnologias apropriadas para fornecer os serviços (RÜHL *et al.*, 2012). A Figura 1 ilustra essas principais transições energéticas e tecnológicas.

Figura 1: Evolução do consumo de energia primária mundial e a diversificação das fontes desde a revolução industrial.

Por conseguinte, a industrialização no século XIX foi dominada pelo carvão, alimentando o motor a vapor, os sistemas ferroviários e a rede elétrica, substituindo as tradicionais fontes de energia não fósseis, não só devido à oferta aparentemente inesgotável e à fácil exploração perto da superfície mas também porque podia ser usado na sua forma natural sem necessidade de muito aprimoramento tecnológico (BACH, 1980).

Na primeira metade do século XX, registou-se o surgimento gradual de petróleo, inicialmente empregue como querosene na iluminação, mas, em seguida, impulsionado como combustível líquido pela introdução do motor de combustão interna e pela sua versatilidade como combustível empregue em veículos automóveis, navios, aviões, na geração de eletricidade, entre outras (NAKICENOVIC *et al.*, 1998; GRUBLER *et al.*, 2012).

Embora o carvão tenha continuado a ser o combustível dominante durante a primeira metade do século XX, principalmente na geração de eletricidade, após a segunda guerra mundial surgiu a “era do petróleo” e da diversificação energética, período caracterizado por um aumento vertiginoso na demanda por energia primária, assim como também uma crescente diversificação das fontes e das tecnologias de uso final dessa energia (GRUBLER, 2008). Depois de 1960, o petróleo atingiu a posição dominante entre as fontes de energia disponíveis, todavia, com a queda e interrupções no fornecimento do petróleo na década de 1970, deu-se a expansão na produção e consumo do gás natural,

implantou-se as estações comerciais de produção de energia nuclear e iniciou-se a exploração de outras fontes de energias renováveis, além das hidrelétricas, visando principalmente a geração de eletricidade (GRUBLER *et al.*, 2012).

Atualmente, consome-se no mundo todo cerca doze bilhões de toneladas de equivalentes de petróleo por ano e cerca de 80% de toda essa energia primária é derivada de combustíveis fósseis convencionais, sendo o petróleo 32,8%, o carvão 27,2% e o gás natural 20,9%. A seguir aos combustíveis fósseis aparecem a biomassa e resíduos combustíveis (10,2%), a energia nuclear (5,8%) e as hidrelétricas (2,3%), como os maiores contribuintes para o sistema energético global (IEA, 2011). Apenas cerca de 0,8% da energia primária global é derivada das novas fontes alternativas de energia renováveis, como a geotérmica, a eólica, a solar fotovoltaica, entre outras (IPCC-SRREN, 2011).

Ao longo dos últimos dois séculos, os combustíveis fósseis curaram as privações na qualidade de vida das sociedades industrializadas e alimentaram um estrondoso crescimento econômico mundial, contudo, esse remédio nunca tinha sido testado e agora revela-se entorpecente mantendo essas mesmas sociedades na sua dependência. Na verdade, a demanda desenfreada e esse intenso consumo de combustíveis fósseis estão na base de dois dos maiores desafios com que a humanidade se depara na atualidade: por um lado, a incerteza acerca da suficiência de recursos energéticos para alimentar a industrialização e o crescimento econômico contínuo; e, por outro lado, as sérias preocupações com as consequências sobre o ambiente, sobre a biodiversidade e sobre a saúde humana, oriundas das emissões resultantes da queima dos combustíveis fósseis.

2.2 Esgotamento das reservas de combustíveis fósseis

Os combustíveis fósseis, nomeadamente, o carvão, o petróleo e o gás natural, desempenharam, desempenham e hão de continuar a desempenhar, pelo menos nas próximas duas décadas, um papel preponderante no mercado energético que abastece o desenvolvimento econômico mundial (SHAFIEE; TOPAL, 2009; ECOFYS, 2012; IEA, 2012a; HÖÖK; TANG, 2013). No entanto, é inequívoco que essa energia provida pelos combustíveis fósseis não pode ser encarada como um insumo ilimitado para o desenvolvimento econômico e muito menos persistir desligada da realidade física e logística das reservas disponíveis, por outras palavras, os depósitos de combustíveis fósseis são limitados física e economicamente, tornando-os recursos naturais finitos e não-renováveis à escala temporal humana.

Dentre as conhecidas reservas mundiais de combustíveis fósseis, o carvão representa 65% e o restante 35% consiste em petróleo e gás natural. Outrossim, enquanto a abundância e a localização das reservas de petróleo e gás estejam limitadas a regiões ocasionalmente instáveis, como o Médio Oriente, o carvão, além de mais abundante, se encontra amplamente distribuído por mais de 70 países em várias regiões do globo (SHAFIEE; TOPAL, 2009), embora cerca de 90% das ocorrências geológicas conhecidas estejam concentradas em apenas seis desses países (HÖÖK; TANG, 2013). Estas duas razões geológicas apontam o potencial do carvão para se tornar o combustível fóssil dominante nas próximas décadas.

A Figura 2 ilustra dados, divulgados por várias agências nacionais e internacionais e corporações da área da energia, reunidos no trabalho publicado por Chiari e Zecca (2011), em que se apresentam as diferentes estimativas das reservas viáveis para cada combustível fóssil em que essas reservas viáveis representam a soma do consumo acumulado até 2009 e as reservas comprovadas, não usadas, de combustíveis fósseis conhecidas atualmente.

Figura 2: A - Estimativas das reservas recuperáveis de combustíveis fósseis avaliadas por agências internacionais e corporações energéticas (USGS - United States Geological Survey; EIA - Environmental impact assessment; BP - British Petroleum; BGR - Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe; WEC - World Energy Council; IEA - International Energy Agency). B - Projeções da produção de combustíveis fósseis calculadas para cenários intermediários. Bb-ep = bilhões de barris de equivalente de petróleo; Gb-ep = giga barris de equivalente de petróleo.

Fonte: CHIARI; ZECCA, 2011 e MAGGIO; CACCIOLA, 2012.

Apesar da promessa da IEA (2010) de que não haverá pico do petróleo antes de 2035, pelos dados apresentados na Figura 2A, cerca de metade das reservas conhecidas de

petróleo já foi explorada e consumida, pelo que, há indícios de que o pico máximo já foi atingido ou será eminente. E esta suposição é reforçada pelas estimativas apresentadas no trabalho de Maggio e Cacciola (2012), em que, usando uma variante do modelo de Hubbert, concluíram que grande parte da produção mundial de petróleo deverá atingir o seu pico entre 2009 e 2021, variando do cenário pessimista para o otimista respectivamente, e, segundo eles, estas estimativas se encaixam muito bem com os dados históricos relativos ao petróleo. Similarmente, estes autores efetuaram estimativas para o gás natural e obtiveram a ocorrência do pico de produção para o cenário pessimista por volta de 2024, enquanto para o cenário otimista o pico ocorre num platô de produção que vai de 2037 a 2055. Quando os autores aplicaram para o carvão o mesmo modelo, obtiveram estimativas para a ocorrência do pico de produção entre 2042 e 2062 variando do cenário pessimista para otimista, respectivamente. Conforme discutido pelos autores, essas estimativas para o pico de produção dos combustíveis fósseis são semelhantes a várias outras obtidas por diversos autores (MAGGIO; CACCIOLA, 2012; CHAPMAN, 2013). A Figura 2B apresenta a comparação das estimativas de produção dos três combustíveis fósseis calculadas assumindo cenários intermediários entre o pessimista e o otimista para as reservas comprovadas e, com base nessas estimativas, os autores concluíram que todos os combustíveis fósseis deverão atingir picos de produção dentro ou não muito longe da primeira metade do século XXI.

Na atualidade, apesar da emergência e expansão de vários recursos energéticos alternativos, as projeções da comunidade científica internacional apontam para o crescimento da demanda e do consumo de combustíveis fósseis mesmo perante os notáveis alertas acerca do seu esgotamento progressivo (SRES, 2000; IPCC, 2007; BP, 2012, EIA, 2012). O facto é que, por serem recursos naturais finitos, em algum momento esses combustíveis vão mesmo atingir um pico de produção e, em seguida, o declínio é inevitável do ponto de vista geológico. De acordo com o trabalho de Shafiee e Topal (2009), ao ritmo de produção e consumo atuais, as reservas mundiais conhecidas de carvão, petróleo e gás natural só serão suficientes para mais 107, 35, e 37 anos, respectivamente. Embora existam projeções mais otimistas que estendem a longevidade dessas reservas de combustíveis fósseis, há um consenso entre a comunidade científica de que o petróleo e o gás natural deverão se esgotar no decorrer do século XXI. Perante isso, fica claro que se não acontecer uma mudança estrutural importante no fornecimento de energia global, num futuro não muito distante, as reservas de combustíveis fósseis serão tão curtas e insuficientes que continuar na dependência deles será impossível.

2.3 Emissões nocivas, degradação ambiental e alterações climáticas

Torna-se cada vez mais óbvio que a dependência dos combustíveis fósseis está a agravar os problemas que o mundo moderno vai ter que enfrentar. Um dos principais problemas, como já foi visto, agrega o estoque limitado e não renovável, o aumento acelerado da demanda e a escassez eminente. Contudo, na atualidade, o mais badalado problema com os combustíveis fósseis está relacionado com os impactos ambientais que eles acarretam, sendo que, desses impactos se destacam o aquecimento global e alterações climáticas, a poluição (do ar, da água e da terra) e os efeitos adversos sobre a saúde e sobre a biodiversidade.

A extração, o transporte e o armazenamento do petróleo, do carvão e do gás natural, o descarte de resíduos e os derrames são grandes causas de poluição, todavia, os maiores danos ambientais são causados pelo uso final dos combustíveis fósseis nos processos de aquecimento, na produção de eletricidade e na geração de força motriz das instalações industriais e dos transportes (VEZIROGLU; SAHIN, 2008). Como coproduto desse uso final ocorre a emissão de diversos gases [CO_x , SO_x , NO_x e hidrocarbonetos voláteis (HCv)] e compostos poluentes (fuligem, cinzas, alcatrão e outros compostos orgânicos) com efeitos catastróficos na saúde humana, nos animais, nas florestas, na visibilidade, nos edifícios, etc. Para alguns desses coprodutos, os ditos regulados, que causam efeitos a curto prazo (NO_x , CO, HCv e as micropartículas), já existem legislações ambientais que estabelecem limites, contudo, para outros como o formaldeído, aldeído, benzeno, tolueno, xileno, metano, SO_2 e CO_2 , que não causam efeito imediato na saúde humana, não existe legislação amplamente aceita ou, quando ela existe, é muito variável e incipiente (GAFFNEY; MARLEY, 2009).

Desde a década de 1990 que as Nações Unidas reconheceram a problemática do aquecimento global como um dos principais desafios para a civilização humana e considerou a queima de combustíveis fósseis como tendo contribuído substancialmente para tal (UN, 1992). Na verdade, os gases com efeito de estufa, ou seja, aqueles que levam ao aquecimento da superfície da Terra através da absorção e retenção da radiação infravermelha na atmosfera, são os principais responsáveis por esse aquecimento. Dentre eles se destacam os três principais, o dióxido de carbono (CO_2), o metano (CH_4) e o óxido nitroso (N_2O), que estão associados principalmente a atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis e o uso da terra, mormente para a prática agrícola. Os

combustíveis fósseis são considerados responsáveis por mais de 75% das emissões de CO_2 , que é o principal gás com efeito de estufa, e a restante parcela é atribuída ao uso da terra, sobretudo desmatamento (SNYDER *et al.*, 2009). Já os aumentos da concentração de CH_4 e N_2O são devidos principalmente à agricultura e pecuária (IPCC, 2007).

As evidências inequívocas apresentadas no relatório do IPCC (2007), e em diversos outros trabalhos científicos, mostram que a concentração atmosférica global de CO_2 aumentou de um valor pré-industrial de cerca de 280 ppm para 379 ppm em 2005 e, segundo NASA-GISS (2013), esse valor atingiu 396 ppm em 2013; Por seu turno, a concentração de CH_4 na atmosfera global aumentou de um valor pré-industrial de cerca de 715 ppb para 1732 ppb no início da década de 1990 e para 1774 ppb em 2005; Já o N_2O teve a sua concentração atmosférica global aumentada de um valor pré-industrial de cerca de 270 ppb para 319 ppb em 2005. As concentrações atuais desses três gases na atmosfera ultrapassam em muito a faixa natural dos últimos 650.000 anos, conforme determinado com base em testemunhos de gelo (IPCC, 2007).

Esses aumentos nos níveis dos gases com efeito de estufa são considerados como a mais provável causa do aumento da temperatura média da superfície global observado pelos cientistas ao longo do século XX (Figura 3), sendo que os últimos 20 anos foram os mais quentes desde que a temperatura começou a ser registrada sistematicamente usando termômetro, em 1860.

Figura 3: Variação da temperatura média global.

Fonte: NASA-GISS, 2013.

Esse aquecimento global inequívoco tem sido fortemente associado a diversas evidências alarmantes como é o caso da diminuição do gelo das calotas polares e dos glaciares, que juntamente com o aquecimento dos oceanos, tem contribuído para a elevação do nível médio do mar de 0,17 m observada durante o século XX (NASA-GISS,

2013). Ao passo que a elevação do nível do mar pode contribuir para a contaminação de reservas de água doce do litoral e aumentar o risco de inundações catastróficas, o aquecimento da atmosfera favorece a propagação de pragas e doenças antes limitadas a regiões tropicais (VIJAYAVENKATARAMAN *et al.*, 2012). Além disso, vem sendo observadas numerosas mudanças no clima, na quantidade de precipitação, na salinidade dos oceanos, nos padrões de vento e na frequência de eventos climáticos extremos, como longas secas, precipitação intensa, fortes ondas de calor e violentos ciclones tropicais, que também tem sido associados ao aquecimento global (IPCC, 2007).

Esses acontecimentos associados ao aquecimento global constituem uma ameaça crescente ao desenvolvimento econômico, à segurança e saúde humana, à produção de alimentos, ao ambiente e biodiversidade, entre outros. Portanto é urgente encarar o desafio de eliminar, ou ao menos atenuar, as causas do problema, ou seja, faz-se necessária uma solução holística que abranja simultaneamente a estagnação ou diminuição das emissões nocivas para a atmosfera e a criação de uma alternativa nítida para a mudança na matriz energética mundial.

2.4 Energias alternativas renováveis

O desenvolvimento e produção de energia a partir de fontes alternativas aos combustíveis fósseis convencionais tornou-se um dos principais objetivos globais, antes de tudo, por razões ambientais e para limitação das emissões com efeito de estufa, depois, para assegurar a sustentabilidade no fornecimento energético a longo prazo.

A energia nuclear, embora represente atualmente cerca de 6% da energia primária mundial e não contribuir de forma significativa para o aumento de gases com efeito de estufa, não é tida como uma alternativa sustentável, por um lado, porque depende do urânio que é um recurso finito, por outro lado, por envolver múltiplas ameaças ao homem e ao meio ambiente, que inclui os impactos ambientais da mineração, processamento e transporte de urânio, o risco da proliferação de armas nucleares, o insolúvel problema do lixo nuclear e a ameaça constante de acidentes graves ocasionando riscos altíssimos para a humanidade (CEER, 2006; IEA, 2011, 2012b).

Frente às problemáticas energética e ambiental e perante o imperativo do desenvolvimento sustentável, apenas as fontes renováveis de energia se apresentam como real alternativa para o futuro energético, uma vez que, são tecnicamente acessíveis a todos

e abundantes o suficiente para fornecer muito mais energia do que a quantidade consumida mundialmente hoje – e para sempre. As fontes renováveis de energia incluem biomassa, hidrelétricas, vento (eólica), solar fotovoltaica, solar térmica, geotérmica e oceânica (ondas e marés). Dessas fontes, todas produzem pouco ou nenhum gás com efeito estufa e contam com fontes naturais virtualmente inesgotáveis (IPCC-SRREN, 2011; IEA, 2012; KONUR, 2012).

Afortunadamente, décadas de progresso tecnológico associado às energias renováveis fizeram com que algumas dessas fontes de energia deixassem de ser apenas um sonho para o futuro para se tornarem em uma opção do presente, real, madura e que pode ser explorada em larga escala. Algumas dessas tecnologias já são competitivas e, se persistir os aumentos contínuos dos custos dos combustíveis fósseis, espera-se que fiquem ainda mais competitivas, atraindo cada vez mais investimentos, tanto em pesquisa e desenvolvimento como também para exploração comercial. Nomeadamente, a energia hidroelétrica, que constitui a mais bem-sucedida das fontes de energia renováveis, já fornece cerca de 20% da eletricidade global (PANWAR *et al.*, 2011) e, ao contrário de algumas outras energias renováveis, já é economicamente viável; As promissoras energias solar fotovoltaica e eólica, com as suas taxas de crescimento anual de 44,3% e 25,1%, respectivamente, nos últimos 20 anos (IEA, 2012a), têm vindo a conquistar um nicho cada vez maior. Apesar do alto custo de investimento inicial e da sua dependência em relação a fatores climáticos, estão se tornando competitivas e consolidando as suas posições entre as energias renováveis como componente indispensável da matriz energética global, sendo que, geralmente, são as que menos impactos provocam sobre o meio ambiente (GWEC, 2011); A energia geotérmica possui grande potencial tanto na geração de eletricidade como também no aquecimento e está em franco crescimento, sendo que já é utilizada em mais de 78 países e a capacidade instalada total vem aumentando cerca de 11,4% ao ano desde 2005, o que tem contribuído para a economia de cerca de 38 milhões de toneladas de equivalente de petróleo por ano, evitando a emissão de milhões de toneladas de CO₂ para a atmosfera (LUND *et al.*, 2011). A energia marinha (das ondas e das marés) é um dos setores menos desenvolvidos das energias renováveis e ainda constitui uma indústria nos seus primeiros estágios de surgimento, dado os desafios e limitações tecnológicas. No entanto, essa falta de estrutura também significa oportunidades para o futuro, uma vez que o seu potencial é praticamente inesgotável para geração de energia, principalmente eletricidade, de forma limpa e livre de emissões (BEDARD, 2007; ROURKE *et al.*, 2010).

2.5 Biomassa como fonte de bioenergia

Biomassa, como fonte de energia renovável, consiste em todo o material biológico obtido de organismos vivos ou organismos que viveram recentemente, referindo-se na maioria dos casos a plantas ou derivados de plantas. Bioenergia refere-se a toda energia renovável que se pode obter a partir da biomassa. Essa bioenergia pode ser obtida diretamente através da combustão ou indiretamente através da conversão da biomassa em outros produtos energéticos, como é o caso dos biocombustíveis.

A biomassa vegetal representa uma esmagadora maioria das matérias-primas consideradas para a produção de bioenergia, assim, o potencial máximo de sua produção pode ser utilizado para estimar o potencial de produção de bioenergia, no sentido de discernir a sua sustentabilidade futura. Conforme o trabalho de Küçük e Demirbas (1997), anualmente, a fotossíntese produz, em forma de biomassa, 5 a 8 vezes mais energia do que o homem consome de todas as fontes. Nesta ótica e de acordo com as estimativas apresentadas no relatório da IEA (2009), a capacidade teórica de produção de bioenergia é de cerca de 90 *TeraWatt* (TW) por ano, no entanto, o potencial técnico viável para uma produção sustentável é da ordem de 8 a 13 TW por ano, o que é cerca de 3 vezes a capacidade mundial de geração de eletricidade.

A biomassa é a mais comum e a mais amplamente utilizada forma de energia renovável, representando cerca 80% de toda energia renovável consumida mundialmente, sobretudo nos países em desenvolvimento (YUKSEL; KAYGUSUZ, 2011). Atualmente, estima-se que a biomassa possa constituir de 9 a 13% de toda energia primária mundial (LONG *et al.*, 2013), sendo que essa fração tende a aumentar significativamente em virtude do aumento da demanda global de biocombustíveis. De facto, de acordo com diversas estimativas (BERNDES *et al.*, 2003; LONG *et al.*, 2013), a biomassa possui o potencial para se tornar uma das maiores fontes de energia global no decorrer do século XXI e assim ser um importante contribuinte para a sustentabilidade energética e para o desenvolvimento sustentável tanto em países industrializados como também nos países em desenvolvimento.

A categorização das fontes de biomassa é principalmente baseada nos seus propósitos, ou seja, no uso que se lhes quer dar. De acordo com a definição dada pela Comissão Europeia, várias categorias de biomassa podem ser consideradas e, nesta linha de ideias, entende-se como biomassa passível de ser empregue na produção de bioenergia, produtos, subprodutos e resíduos florestais e da agricultura, bem como também, os

resíduos industriais biodegradáveis e os resíduos sólidos municipais (EC, 2004). Contudo, nem todas as categorias de biomassa com potencial teórico para a produção de bioenergia pode, de facto, ser empregue para esse fim de maneira sustentável, dado a controvérsia e a pressão que fomentariam à segurança alimentar, ou seja, tão imprescindível quanto a produção de bioenergia é a produção e segurança alimentar (WU *et al.*, 2012; ERB *et al.*, 2012). Assim, é clara a necessidade de se estabelecer, desde já, um equilíbrio entre a expansão do setor da bioenergia e os outros itens que também dependem do uso da terra, tais como produção de alimentos, proteção da biodiversidade e a conservação do solo e da natureza.

Com o intuito de minimizar os constrangimentos em relação à produção e segurança alimentar, atenuar a expansão de culturas energéticas por meio do desflorestamento e ao mesmo tempo contribuir para a segurança energética através do aumento da produção de bioenergia, tem-se vindo a avaliar o potencial de utilização mais eficiente de toda a biomassa não utilizada para fins alimentares, sobretudo a biomassa lignocelulósica, que constitui o mais abundante e atrativo recurso residual que pode ser usado como matéria-prima para a produção de energia renovável, principalmente os biocombustíveis. Nesta ótica, a biomassa passível de ser aplicada na produção de bioenergia consiste em três categorias principais: biomassa lenhosa, que engloba os resíduos de madeira e resíduos florestais; biomassa não-lenhosa, que abrange principalmente resíduos das principais culturas agrícolas, nomeadamente, palhas (milho, trigo, arroz, cevada, etc.) e bagaços (cana-de-açúcar e sorgo sacarino); e resíduos orgânicos, que inclui tanto os resíduos da criação de animais como também os resíduos dos esgotos municipais (SIMS *et al.*, 2010; LONG *et al.*, 2013).

2.6 Composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica constitui-se maioritariamente por três componentes: a celulose (30-50%), as hemiceluloses (15-35%) e a lignina (10-20%) (PETTERSEN, 1984; FENGEL; WEGENER, 1989). A celulose e as hemiceluloses representam aproximadamente 70% dessa biomassa e estão intimamente associadas à lignina através de ligações covalentes e pontes de hidrogénio que tornam a estrutura da biomassa lignocelulósica altamente robusta e resistente. Uma pequena fração dessa biomassa é constituída por extrativos (como gomas, ceras, amido, alcalóides, resinas, óleos essenciais

e outros constituintes citoplasmáticos) e cinzas (como sílica, carbonatos e oxalatos) (BALAT, 2011). Embora esta composição seja qualitativamente semelhante para qualquer biomassa lignocelulósica (com exceção apenas de algumas espécies aquáticas), do ponto de vista quantitativo, a composição química e estrutural é função da influência genética e ambiental e respectivas interações (LEE *et al.*, 2007).

2.6.1 Celulose

Celulose, o principal componente estrutural das paredes das células vegetais, é um homopolissacarídeo constituído por longas cadeias lineares de unidades monoméricas de D-glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A unidade estrutural repetitiva é a β -celobiose que é um dímero em que os monómeros de glucose estão orientados 180° um em relação ao outro (Figura 4). Graças às extensas pontes de hidrogénio (intra- e inter-moleculares) unindo os seus numerosos grupos hidroxila e às forças de *van der Waals*, as cadeias de glucose se agupam juntas formando microfibrilas que por sua vez se agregam formando as macrofibrilas e as fibras, conferindo assim à molécula de celulose uma matrix estrutural cristalina, compacta, resistente à biodegradação e insolúvel na maioria dos solventes ordinários (PETTERSEN, 1984; FENGEL; WEGENER, 1989; SWATLOSKI *et al.*, 2002). Contudo, a matrix cristalina da celulose é intercalada com regiões menos ordenadas, designadas por regiões amorfas (HEARLE, 1958; MOISER *et al.*, 1999; NISHIYAMA *et al.*, 2003).

Figura 4: Estrutura química de uma cadeia linear de celulose com as unidades de glucose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e a unidade repetitiva sendo a β -celobiose.

Estima-se que cerca de 180 bilhões de toneladas de celulose sejam produzidas anualmente pelas plantas tornando este polissacarídeo o maior reservatório de carbono a nível global (FESTUSHI-BUSSELL *et al.*, 2007). Além das atuais aplicações industriais milionárias para a produção de diversos produtos (papel, tecidos, ácidos orgânicos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos, etc.) o potencial biotecnológico da

celulose é ainda vasto, sobretudo, para a produção do etanol de segunda geração e derivados de celulose (KUMAR *et al.*, 2008).

2.6.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses, localizadas principalmente nas paredes celulares secundárias, são heteropolímeros amorfos, ramificados e variáveis, constituídos por hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e podem conter também grupos acetil e ácidos urônicos, nomeadamente ácidos D-glucurônico, metilglucurônico, D-galacturônico e metilgalacturônico (VAN MARIS *et al.*, 2006; GIRIO *et al.*, 2010), sendo que as unidades monoméricas da cadeia principal estão geralmente unidas por meio ligações β -(1 $\rightarrow$ 4), as ramificações e grupos pendentes estão unidos por vários tipos de ligações químicas e o grau de polimerização é geralmente inferior a 200 unidades, conforme pode ser visto na Tabela I (CAI; PASZNER, 1988; SAHA, 2003).

A composição das hemiceluloses varia em função da espécie considerada, do tipo de tecido, do estado e condições de crescimento, armazenamento e método de processamento (VAN MARIS *et al.*, 2006). De um modo geral, as hemiceluloses são classificadas de acordo com os açúcares encontrados na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas. Essa cadeia pode ser um homopolímero (xilanas) ou um heteropolímero (glucomananas) (FENGEL; WEGENER, 1989; RAMOS, 2003). Hemiceluloses de madeiras duras (folhosas) contém maioritariamente xilanas enquanto as de madeiras moles (coníferas) contem maioritariamente glucomananas. Nas gramíneas, como é o caso da cana-de-açúcar, existem maioritariamente xilanas (McDOUGALL, 1993; PENG *et al.*, 2012). As xilanas, de facto, são o tipo de hemicelulose mais abundante nos materiais lignocelulósicos considerados para a produção de bioenergia.

Comparativamente à celulose, as hemiceluloses são facilmente hidrolisáveis em condições pouco severas, em solventes ácidos, neutros ou alcalinos devido à sua estrutura amorfa, ramificada e seu menor grau de polimerização. Dado à sua íntima associação com a celulose, em muitos processos biotecnológicos, grande parte das hemiceluloses precisa ser removida no sentido de aumentar o acesso à celulose (AGBOR *et al.*, 2011). Desta forma, sendo as hemiceluloses o segundo componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos (ainda considerada resíduo não utilizável na maioria dos processos biotecnológicos) e perante o imperativo global de uma conversão desses materiais de forma eficiente e ambientalmente sustentável, um vasto leque de aplicações se tem

apontado para esses polissacarídeos, sobretudo, na produção de biocombustíveis e de produtos químicos de valor acrescentado como o hidroximetilfurfural (HMF), furfural, ácido levulínico e xilitol (SAHA, 2003; GIRIO *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2012).

Tabela 1: Principais tipos de polissacarídeos presentes nas hemiceluloses.

Polissacarídeos	Origem Biológica	%	Unidades			Dp ^b
			Cadeia P.	Cadeia Lat.	Ligações	
Arabinogalatanas	Madeiras moles	5-35	β -D-Galp	β -D-Galp α -L-Araf	β -(1 $\rightarrow$ 6) α -(1 $\rightarrow$ 3)	100-600
Xiloglucanas	Madeiras moles, madeiras duras e gramíneas	2-25	β -D-Glcp β -D-Xylp	β -L-Arap β -D-Xylp β -D-Galp α -L-Araf α -L-Fucp Acetyl	β -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 4) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2)	
Galacto-glucomananas	Madeiras moles	10-25	β -D-Manp β -D-Glcp	β -D-Galp Acetyl	α -(1 $\rightarrow$ 6)	40-100
Glucomananas	Madeiras duras	2-5	β -D-Manp β -D-Glcp			40-70
Glucuronoxilanas	Madeiras duras	15-30	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA Acetyl	α -(1 $\rightarrow$ 2)	100-200
Arabino-glucuronoxilanas	Gramíneas e madeiras moles	5-10	β -D-Xylp	4-O-Me- α -D-GlcpA α -L-Araf	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)	50-185
Glucurono-arabinoxilanas	Gramíneas	15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA Acetyl	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)	
Homoxilanas β (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)-glucanas	Algas e gramíneas	2-15	β -D-Xylp ^c β -D-Glcp		β -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 4)	

Fonte: PENG *et al.*, 2012.

2.6.3 Lignina

A lignina, o terceiro maior componente dos materiais lignocelulósicos, é uma macromolécula aromática e ramificada que se associa às hemiceluloses e à celulose conferindo rigidez à parede das células vegetais gerando estruturas resistentes ao impacto, compressão e tensão e serve como barreira natural contra a degradação enzimática e microbiológica (FENGEL; WEGENER, 1989; KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004). A sua estrutura natural se forma a partir da polimerização radicalar, iniciada por enzimas desidrogenases, de três precursores primários fenilpropânicos: álcool *trans*-coniferílico, álcool *trans*-sinapílico e álcool *trans-para*-cumarílico (Figura 5. 1) (CARVALHO *et al.*, 2009). Essa polimerização gera macromoléculas complexas com diversos tipos de ligações em todas as direções, sendo os tipos mais comuns as ligações β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (Figura 5. 2) (HIGUCHI, 1985; FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina de coníferas é composta quase que exclusivamente por resíduos derivados do álcool coniferílico (lignina do tipo G), enquanto a lignina de folhosas contém resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico (lignina do tipo GS). Em contraste, a lignina derivada de gramíneas contém os três precursores básicos (lignina do tipo HGS). Como consequência, a lignina das folhosas que possui alta quantidade de grupos metílicos, é menos condensada e mais suscetível à conversão química do que a lignina derivada de coníferas (RAMOS, 2003; CARVALHO *et al.*, 2009; HENRIKSSON, 2009).

Figura 5: 1 - Álcoois hidroxicinâmílicos precursores da lignina. Os principais precursores são o álcool *trans-p*-coumarílico (A), o álcool coniferílico (B) e o álcool *trans*-sinapílico (C). Os precursores que podem existir em menores proporções são o coniferaldeído (D), o álcool acetilconiferaldeído (E) e o ácido ferúlico (F). 2 – Principais tipos de ligações entre as unidades estruturais da lignina.

Fonte: HENRIKSSON, 2009.

A lignina, como um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza e o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constitui uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química, além de, atualmente, ser considerada uma fonte de bioenergia com potencial para garantir a autossuficiência energética da indústria de lignocelulósicos e, eventualmente, até produzir excedente que poderia ser exportada como energia elétrica, o que seria positivo tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência de recursos energéticos fósseis externos (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2013).

2.7 Bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para bioetanol

Acredita-se que a cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia e Indonésia, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Quando Alexandre, o Grande, invadiu a Índia, seus escribas escreveram sobre os habitantes: “mastigavam uma cana maravilhosa que produzia uma espécie de mel sem ajuda das abelhas” (ICIDCA/GEPLACEA/PNUD, 1990). Posteriormente, a cana-de-açúcar disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial por regiões tropicais e subtropicais. Para o Brasil, as primeiras mudas de cana-de-açúcar foram trazidas nos navios que participavam da expedição de Martim Afonso de Souza, em 1532 (MOZAMBANI *et al.*, 2006), e a partir daí o solo fértil, o clima tropical propício e a mão-de-obra escrava ajudaram na expansão da sua cultura por várias regiões do país. Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das culturas de maior importância econômica no Brasil, dada à dimensão da sua produção que, segundo dados disponibilizados pela FAO (2013), foi de aproximadamente 734 milhões de toneladas a respeito do ano agrícola de 2011. No mundo todo produziu-se cerca de 1,8 bilhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2011, sendo o Brasil o maior produtor (Figura 6), seguido pela Índia e China, e estes três países representam cerca de 73% dessa produção mundial (FAO, 2013).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta herbácea monocotiledónea pertencente à família Poaceae (Gramíneas), a mais importante família botânica em culturas comerciais pois reúne também os cereais como o arroz, o trigo, a cevada, o milho, entre outros. Ela é uma planta perene ou semi-perene, de porte ereto podendo atingir em média 2-3 m de altura, possui caule, geralmente, não ramificado do tipo colmo cheio, o qual é rico em reserva de sacarose. Dentro do gênero *Saccharum* são seis as espécies com algum interesse comercial, sendo duas espécies selvagens (*S. spontaneum* L. e *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl), e quatro espécies cultivadas (*S. officinarum* L., *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb e *S. edule* Hassak). Dentre estas espécies, se destaca o *S. officinarum* que é a mais apetejada por possuir colmos grossos, com alto teor de sacarose e é, por isso, denominada *cana nobre* (DANIELS; ROACH, 1987; AITKEN; McNEIL, 2010). No geral, a biomassa da cana-de-açúcar contém, aproximadamente, 70% de água, 20% de biomassa (seca) e 10% de açúcar (sacarose) (CORCORAN *et al.*, 2008).

Figura 6: Produção de cana-de-açúcar no mundo.

Fonte: FAO, 2013.

De acordo com Teixeira (2006) e Santos *et al.* (2011) no Brasil, cerca de 90% da produção de cana-de-açúcar é direcionada à indústria sucroalcooleira, sendo 55% destinada à produção de açúcar e 35% à produção de etanol, e os 10% restantes utilizados para a produção de ração animal, cachaça, rapadura, entre outros. No processo industrial de produção de açúcar e etanol, por cada tonelada de cana-de-açúcar usada gera-se cerca 280 quilogramas de bagaço úmido e aproximadamente 250 quilogramas de folhas secas fica no campo, portanto percebe-se a enorme quantidade de resíduos que é gerada e que se for usada de forma adequada e eficiente constitui uma grande fonte de recursos, além de contribuir também para uma melhor sustentabilidade e diminuição do impacto sobre o ambiente (ADSUL *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2007; CHANDEL *et al.*, 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar é tido atualmente como uma das mais promissoras fontes de biomassa lignocelulósica com grande potencial para a produção de energia e biocombustíveis, através de processos de conversão térmica, química, física ou biológica, dado ser material renovável, de uma planta com crescimento rápido e cultivo generalizado nas regiões tropicais e subtropicais e disponível em abundância e a baixo custo, especialmente como resíduo ou subproduto da indústria de açúcar e álcool em países como Brasil, Índia, China, Cuba, México, Indonésia e Colômbia onde é produzido em grandes quantidades (CARDONA *et al.*, 2010).

O Bagaço ou a biomassa seca da cana-de-açúcar após a extração do caldo ou suco, constitui-se, aproximadamente, por 35-45% de celulose, 25-35% de hemicelulose, 11-25% de lignina e 3-14% relativos aos extrativos e cinzas (LEE, 2005; PENG *et al.*, 2009; CHANDEL *et al.*, 2012), sendo a celulose e a hemicelulose polissacarídeos constituídos por açúcares ricos em energia que podem ser fermentados a etanol.

Até o ano 2000 cerca de 50% do bagaço gerado pelas indústrias do açúcar e álcool era usado para geração de energia e vapor consumidos pela própria instalação enquanto a restante parte era considerada resíduo excedente que era armazenado ou eliminado através de queima a céu aberto (PANDEY *et al.*, 2000). Todavia, na última década, com o aumento do preço dos combustíveis de origem fóssil e com o endurecimento das políticas ambientais tem-se procurado utilizar integral e eficientemente todo o bagaço produzido, quer seja na geração de eletricidade usando sistemas de combustão e turbinas mais eficientes, quer seja também na produção de bioetanol e outros produtos de maior valor agregado (HOFSETZ *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2013; LOH *et al.*, 2013).

Atualmente, a cogeração de eletricidade persiste como a maior aplicação do bagaço de cana-de-açúcar, tanto para o consumo nas próprias usinas como para exportar para a rede elétrica (HOFSETZ *et al.*, 2012). Contudo, já foi demonstrado que tanto a cogeração de eletricidade como a produção de etanol de segunda geração resultaria em benefícios ambientais em relação ao uso de combustíveis fósseis equivalentes. Uma cogeração de elevada eficiência resultaria num melhor rendimento energético e maiores benefícios ambientais enquanto o bioetanol seria preferível pelo seu potencial de substituir combustíveis líquidos de origem fóssil (KADAM, 2002; BOTHA; von BLOTTNITZ, 2006).

Ao passo que se tem apresentado o bioetanol produzido a partir de bagaço de cana e de outros materiais lignocelulósicos como uma alternativa viável para o futuro tem-se tornado cada vez mais evidente que esse processo requer equipamentos mais sofisticados e maior investimento com instalações de maior escala, tal que possibilite rendimento que garanta o retorno de capital (STEVENS *et al.*, 2004). Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar, ao contrário do amido e do melaço tradicionalmente usados na produção de etanol, é um material recalcitrante que requer pré-tratamento adequado que desestruture os seus componentes a fim de permitir uma hidrólise eficiente gerando açúcares, tanto o quanto livres de inibidores, que resultem em bom rendimento de fermentação (DEMIRBAS, 2005; MOSIER *et al.*, 2005b; HIMMEL *et al.*, 2007).

2.8 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos – Bagaço de cana-de-açúcar

Como já mencionado, a composição do bagaço de cana-de-açúcar, e de toda biomassa lignocelulósica, influi diretamente no desempenho e na eficiência do processo de conversão desses materiais a bioetanol. A complexa matriz estrutural formada pela celulose-hemicelulose-lignina e a estrutura cristalina da celulose constituem uma barreira física que previne os processos enzimáticos e microbiológicos tradicionalmente empregues na produção de etanol (TALEBNIA, 2008). Contudo, graças aos inúmeros estudos nesta área, a produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos com base na hidrólise enzimática da celulose já passou da escala laboratorial para a escala piloto e de demonstração mas ainda não chegou à escala comercial (GALBE; ZACCHI, 2012). Uma das etapas cruciais desse processo é a necessidade do fracionamento dos componentes estruturais a fim de vencer a recalcitrância desses materiais através do aumento a área superficial, aumento da porosidade, pela retirada parcial de hemicelulose e lignina, e diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose com o intuito de aumentar a acessibilidade da enzima e a eficiência da sacarificação e obtenção de açúcares livres de inibidores para a fermentação. Desta forma, o processo simplificado de produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos compreende as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise/sacarificação, fermentação, separação/purificação e tratamento dos efluentes (CARDONA *et al.*, 2010).

2.8.1 Pré-tratamento

Qualquer pré-tratamento visa alterar algumas características estruturais do material lignocelulósico, aumentando a acessibilidade dos agentes de hidrólise aos componentes estruturais da biomassa, por meio do rompimento da parede celular (barreira física) e diminuição da cristalinidade da celulose (MOSIER *et al.*, 2005b; ALVIRA *et al.*, 2010). A Figura 7 esquematiza a desestruturação da fibra lignocelulósica ao passar por um pré-tratamento.

Atualmente, as pesquisas no âmbito do pré-tratamento estão focadas na identificação, avaliação, desenvolvimento e demonstração de abordagens promissoras que, antes de tudo, aumentem a eficiência da subsequente hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, com baixa carga enzimática e em curto tempo de conversão. Uma diversidade de

métodos de pré-tratamento (químicos, físicos, físico-químicos, térmicos e biológicos) tem vindo a ser investigados em diversos tipos de matérias-primas como pode ser visto em vários artigos de revisão recentes (CARVALHEIRO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010; CARDONA *et al.*, 2010; GALBE; ZACCHI, 2012; MOOD *et al.*, 2013).

Figura 7: Esquema da desestruturação da fibra lignocelulósica depois de passar por um pré-tratamento.

Fonte: KUMAR *et al.*, 2009.

Uma vez que não existem diferenças qualitativas consideráveis na composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos, a maioria dos métodos de pré-tratamento desenvolvidos tem a mesma base científica e podem ser aplicados a vários tipos de matéria-prima. Assim, para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em particular, diversos métodos tem vindo a ser testados e os mais vulgarmente usados incluem explosão a vapor, pré-hidrólise com ácido diluído, hidrotermólise, oxidação úmida, pré-tratamento com álcali diluído, pré-tratamento biológico, pré-tratamento térmico e pré-tratamento organosolv (KUMAR *et al.*, 2009; CARDONA *et al.*, 2010).

Ultimamente, alguns estudos tem mostrado que o pré-tratamento de algumas matérias-primas lignocelulósicas com sulfito permite uma extensa deslignificação e conduz a uma melhoria significativa na sacarificação enzimática (ZHU *et al.*, 2009; GU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013), inclusive o bagaço de cana-de-açúcar (MENDES *et al.*, 2011). Porém, um pré-tratamento eficaz e de eleição tem que se adequar a vários critérios, nomeadamente, deve evitar a necessidade de reduzir muito o tamanho das partículas de biomassa, deve preservar as pentoses (hemiceluloses) e evitar ou minimizar a formação de produtos de degradação que inibam a sacarificação enzimática e o crescimento de

microrganismos fermentativos, deve minimizar os custos e exigência energética e os reagentes não devem ter custo elevado nem reciclagem dispendiosa (MOSIER *et al.*, 2005b). Assim, no âmbito desta revisão serão tratados com detalhes apenas alguns dos métodos mencionados que, de acordo com Kaar *et al.* (1998) e Velmurugan e Muthukumar (2011), são os mais eficazes e eficientes pré-tratamentos para a conversão do bagaço de cana-de-açúcar, incluindo o pré-tratamento catalisado com sulfito.

2.8.1.1 Explosão a vapor

Explosão a vapor é o método mais econômico, eficiente e comumente utilizado para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (McMILLAN, 1994; SUN; CHENG, 2002; KUMAR *et al.*, 2009; ZHANG; CHEN, 2012). Esse processo termomecânico é normalmente realizado a temperaturas de 160-260°C (pressão correspondente a 0,69-4,83 MPa) durante vários segundos a alguns minutos antes de o material ser despressurizado até à pressão atmosférica. Durante esse pré-tratamento, o vapor penetra na biomassa lignocelulósica e condensa, formando água líquida dentro das fibras, provocando hidrólise e solubilização da hemicelulose e modificação ou degradação parcial da lignina devido à alta temperatura. Com essa fragilização das ligações que asseguram a coesão da biomassa e devido à descompressão súbita, a água contida na biomassa, que está em equilíbrio com o vapor a alta pressão, é rapidamente evaporada gerando literalmente uma explosão no interior das fibras, provocando, dessa forma, uma maciça desagregação da estrutura lignocelulósica (SILVA, 1995; RAMOS, 2003; MABEE *et al.*, 2006), o que explica o aumento da suscetibilidade do material à hidrólise enzimática.

O processo de explosão a vapor foi primeiramente introduzido por Mason em 1928 (MASON, 1928) para desfibrar resíduos da indústria madeireira para a produção de papelão. Em 1932, Babcock mostrou que este processo podia ser utilizado para produzir açúcares fermentescíveis e álcool a partir da madeira (BABCOCK, 1932). Desde então, surgiram outros processos similares, com o propósito de viabilizar comercialmente a conversão da biomassa lignocelulósica em produtos químicos, energia e ração animal.

No trabalho de Grous *et al.* (1986), foi demonstrado que o pré-tratamento de cavacos de madeira com explosão a vapor possibilitou uma eficiência de hidrólise enzimática de 90% em 24 horas ao passo que apenas 15% de hidrólise foi obtida para cavacos não tratados. Já nessa altura se reconhecia que o tempo de residência, a

temperatura, o tamanho dos cavacos e a percentagem de umidade eram os principais parâmetros interferentes no processo e, sendo assim, havia necessidade de uma combinação ótima deles no sentido de uma otimização da hidrólise e solubilização da hemicelulose e boa disponibilização da celulose. Nesta lógica, os estudos mais recentes tem indicado que temperatura mais baixa e maior tempo de residência são mais favoráveis na medida em que permitem melhor preservação dos polissacarídeos e minimização da formação de compostos inibidores das etapas subsequentes (WRIGHT, 1998; SUN; CHENG, 2002; KUMAR *et al.*, 2009). Para alguns materiais lignocelulósicos, já foi demonstrado que adição de catalisadores aumenta a seletividade das reações de hidrólise dos carboidratos permitindo diminuir o tempo e a temperatura de reação, diminuir a formação de compostos inibidores, conduzir à remoção completa da hemicelulose e melhorar consideravelmente a hidrólise enzimática subsequente, (RECZEY; ZACCHI, 2004; BALLESTEROS *et al.*, 2006). Conforme revisto por Kumar *et al.* (2009), esse método já foi testado para materiais lignocelulósicos de diversas origens em vários estudos que mostraram sempre a necessidade de otimização dos fatores de severidade em função do material de origem, do potencial de maximização de açúcares disponíveis e do uso que se pretende dar ao produto resultante.

As principais vantagens do pré-tratamento por explosão a vapor, em comparação com outros métodos, consistem na menor exigência energética e não possuir custo de reciclagem nem prejuízos ambientais. Contudo, possui também inconvenientes que incluem a destruição das xilanas, a desfibração incompleta da matriz lignocelulósica e a geração de compostos de degradação que funcionam como inibidores e podem afetar a hidrólise enzimática, o crescimento microbiano e a fermentação, daí que a biomassa pré-tratada precisa de ser lavada com água para remover esses inibidores juntamente com fração solúvel da hemiceluloses (SUN; CHENG, 2002). Estudos mais antigos (MESHARTREE *et al.*, 1988; McMILLAN, 1994; KAAR *et al.*, 1998) consideravam uma perda no rendimento de sacarificação de 20-25% derivado desse processo de lavagem, já que ainda não havia conhecimentos suficientes acerca de processos de destoxificação nem acerca de microrganismos e processos para a fermentação eficiente de pentoses.

Para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar o método de explosão a vapor tem sido quase sempre o escolhido, muito por causa dos bons resultados obtidos e das vantagens face a outros métodos, ou seja, é muito eficiente em tornar essa biomassa mais facilmente digerível por enzimas e requer pouco ou nada de produtos químicos, o que é de grande valia do ponto de vista ambiental (KAAR *et al.*, 1998; VELMURUGAN;

MUTHUKUMAR, 2011). Todavia, este método é também apropriado quando se quer dar outras utilizações ao bagaço de cana além da hidrólise enzimática e subsequente fermentação a etanol, por exemplo, conforme mostrado por Silva (1995) e Rocha *et al.* (2012), bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor pode ser deslignificado usando álcali diluído obtendo polpa celulósica com bons rendimentos e com ótima reprodutibilidade.

2.8.1.2 Pré-tratamento hidrotérmico - Hidrotermólise

Alternativamente ao método de explosão a vapor têm-se desenvolvido e aplicado o método hidrotermólise que consiste num pré-tratamento usando água líquida quente sob pressão em que a mistura de água e biomassa é aquecida até temperaturas de 180 a 230°C e mantida sob pressão por um tempo, geralmente, de 5 a 20 minutos após o qual a mistura é arrefecida, com adição de água fria, até à temperatura desejada para a hidrólise (LYND, 2002). A premissa por detrás deste método é que a essas temperaturas dá-se a clivagem dos grupos acetil debilmente ligados às hemiceluloses, o que, por sua vez, através da formação de ácido acético, reduz o pH levando assim ao processo de auto-hidrólise (BRANDON *et al.*, 2008). Este método tem sido testado em batelada e em refluxo contínuo sendo o último apontado como mais eficiente na remoção de hemiceluloses e lignina (LIU; WYMAN, 2005). No sentido de preservar a hemicelulose dissolvida e minimizar a formação de produtos de degradação dos açúcares, tais como furfural e hidroximetilfurfural, que podem inibir o crescimento de muitos dos organismos usados na fermentação, alguns autores têm aplicado este método com o controle do pH à volta de 5 através da adição de pequenas quantidades de base (WEIL *et al.*, 1998; MOSIER *et al.*, 2005a).

O processo hidrotermólise já foi demonstrado como sendo eficaz no pré-tratamento de biomassa de gramíneas e folhosas mas não de coníferas. Utilizando este pré-tratamento, seguido de deslignificação, foi conseguida sacarificação enzimática da celulose com rendimentos acima de 90% para a palha de milho (MOSIER *et al.*, 2005a), para uma espécie de capim-elefante (*switchgrass*) (FAGA *et al.*, 2010), para bagaço de cana-de-açúcar (LASER *et al.*, 2002) e para o eucalipto (ROMANI *et al.*, 2010). Além disso, este método é promissor porque, por um lado, remove completamente as hemiceluloses, reduz a lignina, preserva a celulose e, por outro lado, não requer produtos químicos nem os reatores dispendiosos associados a alguns desses produtos químicos.

2.8.1.3 Pré-tratamento com ácido diluído - Pré-hidrólise ácida

Pré-hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos consiste num pré-tratamento com ácido diluído visando principalmente quebrar as ligações éter heterocíclicos entre monómeros de açúcar das cadeias poliméricas dos polissacáridos, especialmente hemiceluloses que são mais facilmente hidrolisadas que a celulose, levando assim a um aumento da acessibilidade à celulose e, por conseguinte, permitindo uma maior eficiência da hidrólise subsequente, especialmente a enzimática. Uma vez que nesta pré-hidrólise pretende-se uma liberação preferencial da hemicelulose, usa-se temperaturas moderadamente brandas a fim de evitar também a formação de compostos inibidores derivados da decomposição dos açúcares (McMILLAN, 1994; ESTEGHLALIAN *et al.*, 1997; KUMAR *et al.*, 2009; CARDONA *et al.*, 2010). Desta forma, o hidrolisado neste processo constitui-se principalmente de açúcares fermentáveis, tais como xilose, arabinose e glicose, acompanhados de frações de alguns materiais solúveis, tais como fragmentos de lignina, ácido acético e furfural, que podem se constituir inibidores em etapas subsequentes no processo de obtenção do etanol (CHENG *et al.*, 2008).

Na pré-hidrólise ácida, as abordagens mais amplamente utilizadas e testadas são baseadas em ácido sulfúrico diluído, tipicamente em concentrações de 0.5 a 2.0% combinadas com temperaturas moderadas variando de 100-150°C, embora, se tenha usado e testado também ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico (KUMAR *et al.*, 2009; CARDONA *et al.*, 2010; GÓMEZ *et al.*, 2010). Esse pré-tratamento ácido tem sido usado numa ampla variedade de materiais lignocelulósicos sendo que as condições ótimas de processo dependem muito da matéria-prima em causa, da natureza das etapas seguintes e da finalidade que se quer dar ao produto final. Corroborando isto, condições ótimas bastante distintas foram obtidas recentemente para a palha de milho (LU *et al.*, 2007), resíduos agrícolas de oliveira (CARA *et al.*, 2008) e bagaço de cana-de-açúcar (GÓMEZ *et al.*, 2010). Todavia, é consensual que quando o propósito é a sacarificação enzimática e subsequente fermentação para obtenção de etanol, para qualquer material lignocelulósico de partida, as condições ótimas de pré-tratamento devem ser tais que minimizem a formação de compostos inibidores, maximizem a percentagem de açúcares fermentáveis face ao valor teórico e permitam obter o melhor rendimento em etanol, a um custo economicamente favorável (CHENG *et al.*, 2008).

Embora o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácido diluído, sob condições ótimas, possa melhorar significativamente a acessibilidade e a posterior

hidrólise enzimática da celulose, o seu custo é geralmente mais elevado do que o dos processos de pré-tratamento físicos, como é o caso de explosão de vapor e hidrotermólise, sendo que as maiores desvantagens desse processo se prendem com a ação corrosiva do ácido que requer reatores resistentes e dispendiosos (MOSIER *et al.*, 2005b) e com a necessidade de neutralização do pH antes de seguir para a sacarificação enzimática e fermentação do substrato o que implica mais custos na aquisição de produtos químicos (KUMAR *et al.*, 2009). Existem também relatos (SELIG *et al.*, 2007) de que esse pré-tratamento afeta negativamente a sacarificação enzimática se for realizado a temperaturas superiores a 150°C devido à formação gotículas de lignina que obstruem a porosidade do material pré-tratado.

2.8.1.4 Pré-tratamento em meio alcalino

No pré-tratamento alcalino, tal como nos processos de polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação Kraft e polpação organosolv, o principal propósito é promover inchamento e desorganização da estrutura da biomassa lignocelulósica e facilitar a remoção da lignina, dos grupos acetil e dos ácidos urónicos das hemiceluloses deixando a fibra mais reativa. Estas alterações estruturais propiciam a sacarificação enzimática (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O pré-tratamento alcalino é, geralmente, realizado em condições um pouco menos severas, em comparação com o pré-tratamento ácido, sendo que para biomassa lignocelulósica *in natura*, usa-se temperaturas acima de 150°C e concentração de alcali, geralmente, até 10%; para biomassa que já passou por um estágio de pré-tratamento costuma-se usar condições mais brandas com temperatura por volta dos 70°C e 4% de álcali (SILVA, 2009). Os agentes alcalinos mais empregues nessa técnica são hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (CaOH) e amônia (MOOD *et al.*, 2013).

Embora o pré-tratamento alcalino funcione em condições menos severas e requeira equipamentos menos complexos e dispendiosos que a pré-hidrólise ácida, o seu principal inconveniente é o longo tempo de residência, que varia de horas a dias, e também a necessidade de neutralizar o hidrolisado e o material tratado antes das etapas subsequentes (LI *et al.*, 2010; WAN *et al.*, 2011).

2.8.1.5 Pré-tratamento com sulfito

O processo de tratamento ou polpação de biomassa lignocelulósica com soluções sulfito foi inventado em 1866 por Benjamim Chew Tilghman e visava a fabricação de papéis. Na verdade, o processo de polpação sulfito foi o método químico dominante na produção de polpa celulósica até o princípio de 1960. Esse processo é ainda baseado na invenção original, embora se tenham introduzidos algumas alterações e melhorias técnicas depois de 1950, especificamente, a substituição do cálcio pelas chamadas bases solúveis, como magnésio, sódio ou amônia, dando mais flexibilidade às condições operacionais, permitindo também vários métodos de polpação sulfito que diferem tanto nas bases usadas como no pH do licor de polpação que pode ser ácido, neutro ou alcalino (SJOSTROM, 1993).

Dado a versatilidade do processo sulfito e ao seu alto rendimento (até 90%), foram desenvolvidos vários processos semi-químicos de polpação envolvendo o uso de sulfito, a saber, processos quimio-mecânicos e quimio-termomecânicos, que têm sido empregues na produção de polpas de alto rendimento assim como também no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica visando posterior sacarificação enzimática e fermentação alcoólica (ZHU *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011; GU *et al.*, 2013).

A efetividade do sulfito em meio alcalino na obtenção da polpa celulósica foi demonstrada como sendo superior à do método alcalino que não envolve sulfito (KHRISTOVA *et al.*, 2006). Desta forma, quando o intuito é obter biomassa pré-tratada com bom rendimento, reativa e suscetível à sacarificação enzimática visando a produção de etanol de segunda geração, tem-se aplicado, geralmente, o sulfito alcalino, ou seja, licores que consistem em hidróxido de sódio (NaOH) e sulfito de sódio (Na₂SO₃). Enquanto o NaOH, em concentrações de 1-8%, pode reduzir a lignina na biomassa de 60-90%, o sulfito reage com a lignina aumentando a sua hidrofilicidade, através da formação de lignosulfonados, facilitando a sua remoção. O efeito combinado do Na₂SO₃ e NaOH, além de acentuar a deslignificação, contribui também para a inchamento das fibras, despolimerização/remoção parcial das hemiceluloses e diminuição da cristalinidade da celulose o que maximiza a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico pré-tratado (ZHAO *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

Vários trabalhos recentes têm empregado o método usando sulfito para pré-tratar diversos materiais lignocelulósicos para a subsequente sacarificação enzimática. Zhu *et al.* (2009), Wang *et al.* (2009) e Mendes *et al.*, 2011 empregaram o pré-tratamento com sulfito

seguido de refino em refinador de discos para tratar madeira mole, madeira dura e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, e obtiveram alta conversão enzimática ($\cong 90\%$) dos materiais pré-tratados a açúcares fermentescíveis.

O bagaço de cana-de-açúcar, quando visado por pré-tratamentos com sulfito alcalino geralmente requer condições menos severas que madeiras para se conseguir um rendimento adequado, dado ser mais facilmente hidrolisado por processos alcalinos. Idrees *et al.* (2013), pré-trataram bagaço de cana-de-açúcar com sulfito de sódio (1%) na presença de hidróxido de sódio (0,5%) em condições otimizadas (130°C, 2-3h) e obtiveram remoção de lignina e hemiceluloses na ordem de 75% e 90% respectivamente, e sacarificação enzimática de cerca de 84% do teórico. Contudo, não existe ainda uma condição ótima, abrangente e largamente aceite para o pré-tratamento do bagaço de cana usando o processo sulfito e que permita um rendimento global amplamente satisfatório.

2.8.1.6 Impactos do pré-tratamento com sulfito

A eficiência de qualquer bioproduto é geralmente avaliada com base no seu balanço energético/econômico e nos impactos ambientais que podem advir da sua produção e utilização. O balanço energético/econômico depende do conteúdo energético da matéria-prima e do custo energético/econômico do processo empregue para a sua conversão em bioproduto de interesse (THAMSIRIROJ; MURPHY, 2011). No que concerne à produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos, o conteúdo energético da matéria-prima é o fator comum a todos os processos de conversão dado a similaridade da composição estrutural destes materiais. Assim, quando o intuito é eleger um processo de conversão adequado do ponto de vista da sustentabilidade, considera-se o rendimento energético/econômico positivo e a neutralidade em termos de impactos ambientais como fatores chave. Assim, quanto ao pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito os dois critérios considerados se cumpriram com a adoção de um sistema de recuperação/reciclagem completa dos reagentes e dos efluentes e com a eliminação das emissões nocivas.

Dado à variedade de bases possíveis de serem usadas nos pré-tratamentos catalisados com sulfito, que pode ser ácido, neutro ou alcalino, diversos sistemas de recuperação dos licores de pré-tratamento evoluíram ao longo do Sec. XX. Atualmente, já existe tecnologia e *know-how* que viabilizam a reciclagem integral dos licores resultantes

de todas as bases, independentemente da faixa de pH, (COLLINS, 1961), permitindo assim o suprimento de toda a demanda interna de reagentes químicos e água (LOVELADY *et al.*, 1999). Relativamente às emissões, os particulados, o dióxido de enxofre, o sulfeto de hidrogênio e mercaptanas constituem os principais poluentes (HENDRICKSON *et al.*, 1970; EPA, 1973; EPA, 1977) que, no entanto, podem ser recuperados e/ou eliminados por sistemas já existentes.

Atendendo ao facto de que a maioria dos pré-tratamentos acima citados, apesar de ter atingido algum grau de sucesso (YANG; WYMAN, 2008; ALVIRA *et al.*, 2010; MOOD *et al.*, 2013), não atingiu a escala comercial devido às limitações intrínsecas, o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito, como processo que potencializa a sacarificação enzimática, apresenta algumas vantagens que poderão contribuir de forma significativa para a sua aplicação industrial e comercial: ao contrário de outros métodos, como explosão a vapor e pré-tratamento ácido, ele atenua significativamente a degradação das pentoses preservando os carboidratos no substrato pré-tratado para a hidrólise enzimática, permitindo uma fermentação consideravelmente eficiente e a baixo custo; além de que, os lignosulfonados recuperados no licor de pré-tratamento são considerados os derivados de lignina com maior potencial de comercialização para diversas aplicações (YAN *et al.*, 2010); ademais, todo o processo sulfito tem vindo a ser aplicado industrialmente por mais de um século, pelo que, o pré-tratamento com sulfito pode usar equipamentos e tecnologias industriais já existentes o que, em comparação com outras abordagens de pré-tratamento, facilita a implantação e comercialização, com baixos riscos ambientais e tecnológicos e muito menos barreiras económicas.

2.8.2 Hidrólise e sacarificação da biomassa lignocelulósica

São diversas as tecnologias investigadas atualmente visando a viabilização económica da conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e compostos químicos de valor acrescentado. A conversão bioquímica através da sacarificação e fermentação alcoólica é uma das tecnologias mais apelativas dada a possibilidade de produção de biocombustíveis com potencial para a substituição direta dos combustíveis líquidos derivados do petróleo e assim reduzir significativamente a dependência mundial de combustíveis fósseis.

A sacarificação envolve a hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica liberando os seus açúcares monoméricos a fim de poderem ser utilizados pelos micro-organismos fermentativos. Para tal, diversos métodos têm sido descritos, sendo, os mais comumente aplicados, classificados em dois grupos distintos: a hidrólise química e a hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a e 2007b).

A hidrólise química de lignocelulósicos envolve a exposição do material a produtos químicos, principalmente ácidos, por um determinado período de tempo a uma temperatura específica sendo que isso resulta na clivagem das ligações que unem as unidades estruturais dos polímeros celulose e hemicelulose. Entre os processos de hidrólise química destacam-se os métodos de hidrólise com ácido diluído (concentração do ácido de 1-3% e temperatura de 180-240°C) e com ácido concentrado (concentração do ácido de 30-70% e temperatura na ordem dos 40°C), empregando o ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4) ou ácido nítrico (HNO_3), sendo o tempo de reação variáveis consoante a modalidade e origem do material lignocelulósico (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a; CARDONA *et al.*, 2010). A Tabela II mostra um exemplo das diferenças nas condições de operação e no desempenho dos três principais processos de hidrólise.

Embora os métodos de hidrólise química com ácido diluído ou concentrado sejam efetivos na sacarificação de materiais lignocelulósicos, eles envolvem diversos inconvenientes que, por um lado, se prendem com a extrema capacidade corrosiva dos ácidos minerais, que requer reatores e equipamentos resistentes e dispendiosos, com a necessidade de neutralização dos ácidos para parar a reação, com a elevada demanda energética para a reciclagem dos ácidos, tratamento dos efluentes e também com o forte impacto ambiental (DEMIRBAS, 2008); Por outro lado, se prendem com a degradação dos açúcares e formação de subprodutos que tanto contribuem para a diminuição do rendimento da sacarificação como também se constituem inibidores dos micro-organismos usados na etapa da fermentação (TAHERZADEH, 1999; BALAT, 2011).

Tabela 2: Comparação das condições e desempenho dos três principais processos de hidrólise.

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	<1% H_2SO_4	215	3 min	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H_2SO_4	40	2-6 h	90%
Enzimática	celulase	50	1,5 dias	75-95%

Fonte: HAMELINCK *et al.*, 2005.

Por seu turno, o processo de sacarificação enzimática consiste no uso de enzimas hidrolíticas que atuam de forma específica sobre os polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) obtendo assim os seus monômeros constituintes. Comparativamente à hidrólise química, o processo de sacarificação enzimática, do ponto de vista técnico, apresenta-se como uma alternativa mais adequada à produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, sobretudo o bagaço de cana-de-açúcar, principalmente, devido às condições amenas aplicadas durante o processo que tornam praticamente desprezível a produção de subprodutos potencialmente inibidores da etapa fermentativa e a recuperação dos açúcares redutores seja já superior a 90% do teórico, em alguns casos, mesmo empregando-se baixas cargas enzimáticas (<10 FPU/g celulose) (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b; MENDES *et al.*, 2011).

O rendimento da hidrólise enzimática em si é governado por diversos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento da biomassa, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termoestabilidade das enzimas, adsorção ao substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio, taxa de agitação, etc., pelo que, é necessário otimizar as condições de hidrólise para se conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação. Entretanto, a viabilidade econômica deste processo depende fundamentalmente de dois fatores: adequado pré-tratamento da biomassa a fim de aumentar o acesso das enzimas aos polissacarídeos permitindo assim obter rendimentos de sacarificação próximos do valor teórico; e o fornecimento de enzimas a preços competitivos e em quantidade e qualidade suficientes que satisfaçam a demanda (ZHUANG *et al.*, 2007; KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2011; GALBE; ZACCHI, 2012).

2.8.2.1 Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose para gerar glicose é executada por enzimas celulasas que são catalisadores altamente específicos. O processo é realizado em condições amenas (pH 4,5-5,0 e temperatura 40-50°C), pelo que, apresenta algumas vantagens em comparação com os métodos químicos, nomeadamente, não há problemas de corrosão, há um baixo consumo de reagentes e o hidrolisado apresenta baixa toxicidade para os micro-organismos fermentativos (HAMELINCK *et al.*, 2005; TAHERZADEH; KARIMI,

2007b). O principal inconveniente deste processo se prende com o custo dos extratos enzimáticos, o que tem vindo a ser superado com o aumento da escala de produção de enzimas, com a utilização de materiais lignocelulósicos como substrato e com a integração da produção de enzimas aos sistemas das instalações industriais.

As celulasas mais intensivamente estudadas são as produzidas por fungos e o maior interesse nesses sistemas celulolíticos fúngicos reside no facto de serem extracelulares e, por isso, de mais fácil obtenção, sendo que as espécies mais utilizados na produção dessas enzimas são: *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma reesei* (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988).

Geralmente, todas as enzimas celulasas ou celulolíticas pertencem às *O*-Glicosil hidrolases (EC 3.2.1.-), um grupo difundido de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas, do tipo β (1-4), entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e um não carboidrato. Tradicionalmente, as celulasas foram classificadas em duas classes distintas: celobiohidrolases (CBH), também chamadas de *exo*-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91) e *endo*-1,4- β -D-glicanases (EG) (EC 3.2.1.4), baseado em suas especificidades em relação ao substrato, ou seja, afinidade para as extremidades da cadeia ou para o interior da cadeia de glicose, respectivamente. A terceira classe de enzimas que atuam em conjunto e de forma sinérgica com CBH e EG, são as β -glicosidases (BG) (EC 3.2.1.21). Estas últimas enzimas não são referidas, frequentemente, como celulasas “reais” já que elas hidrolisam as ligações glicosídicas de oligossacarídeos solúveis ou celobiose, não atuando assim na celulose propriamente dita (SUN; CHENG, 2002; ZHANG; LYND, 2004; BALAT, 2011).

Sucintamente, as endoglucanases (EG) clivam aleatoriamente as regiões internas da das cadeias da celulose, preferencialmente nas regiões amorfas, liberando novos terminais livres, gerando fragmentos menores e assim conduzem a uma rápida redução do grau de polimerização, enquanto as celobiohidrolases (CBH) ou exoglucanases, que atuam também sobre as regiões cristalinas, degradam as cadeias da celulose a partir das extremidades livres através da remoção de unidades de celobiose. As β -glicosidases clivam as moléculas de celobiose liberando açúcares redutores, ou seja, a glicose (LYND *et al.*, 2002). A ação sinérgica dessas três diferentes classes de enzima envolvidas na degradação da celulose expressa-se essencialmente pela maior eficiência do processo de hidrólise, ou seja, a ação combinada de duas ou mais dessas enzimas conduz a uma maior taxa de hidrólise do que a

soma de suas taxas individuais (MANSFIELD *et al.*, 1999; LYND *et al.*, 2002; CASTRO; PEREIRA Jr, 2009).

2.8.2.2 Hidrólise enzimática das hemiceluloses

Existe um grande interesse na hidrólise enzimática das hemiceluloses, sobretudo as xilanas, em virtude das suas possíveis aplicações, nomeadamente, na produção de biocombustíveis e compostos químicos, no tratamento de resíduos, na fabricação de papel, entre outras (SILVA *et al.*, 1999). Diferentemente das celulosas, as hemiceluloses são quimicamente heterogêneas e constituídas, em geral, por uma cadeia principal, possuindo um ou dois açúcares diferentes, que contem cadeias laterais e outras substituições ou ramificados em diferentes configurações, pelo que, a sua degradação exige uma atuação cooperativa de várias enzimas com especificidades para os diferentes açúcares e para os diferentes tipos de ligações químicas. Essas enzimas são designadas conjuntamente por hemicelulases sendo as designações específicas variáveis consoante a posição e o tipo de ligação que as enzimas catalisam (MONICA *et al.*, 2009).

A título de exemplo, para a degradação da arabino-glucurono-xilana, que é a principal hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar, são necessárias basicamente seis classes de enzimas diferentes: as *endo*-(1,4)- β -xilanases (EC 3.2.1.8) e *exo*-(1,4)- β -xilanases atacam a cadeia principal liberando xilooligossacarídeos que são hidrolisados em monómeros pelas β -xilosidases (EC 3.2.1.37); as α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) e as α -D-glucuronidases (EC 3.2.1.139) removem a arabinose e os ácidos glucurônicos, respectivamente; as acetilxilana esterases (EC 3.1.1.72) hidrolisam os grupos acetil e as feruloil esterases (EC 3.1.1.73) clivam as ligações éster entre a arabinose e o ácido ferúlico. (HOWARD *et al.*, 2003; SAHA, 2003, 2004).

2.8.3 Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático

A conversão de materiais lignocelulósicos a etanol, que envolve a hidrólise da celulose para gerar glicose e a fermentação alcoólica desse açúcar, pode ser realizada simultaneamente numa só etapa ou sequencialmente em duas etapas. A Figura 8 apresenta as alternativas possíveis para essa conversão.

Figura 8: Possíveis vias de hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: RABELO, 2010.

O processo em duas etapas tem sido a abordagem mais adotada em virtude da sua maior flexibilidade para o controle das condições operacionais, isto é, a sacarificação (ácida ou enzimática) e a fermentação são realizadas separadamente (HFS), com a vantagem de se poder realizar essas etapas nas suas condições ótimas de temperatura e pH. No caso da hidrólise enzimática, a temperatura considerada ótima é a da enzima (45-50°C), enquanto a temperatura ótima da fermentação é a do micro-organismo fermentativo (28-34°C). A principal desvantagem do processo de HFS é a inibição das celulasas e β -glicosidases por acúmulo de produtos de hidrólise levando a baixos rendimentos ou maior tempo de conversão (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

No processo em etapa única, a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas no mesmo reator, sendo que a principal vantagem é a redução da inibição pelos produtos de hidrólise, que acontece no processo de HFS, devido à presença de micro-organismos fermentativos que reduzem o acúmulo de açúcares liberados pelas enzimas celulolíticas. Por este motivo é possível obter maiores taxas de hidrólise e percentagens de conversão, em comparação ao processo HFS, sendo necessária uma menor carga enzimática para se obter um aumento do rendimento de etanol. A principal desvantagem deste processo está relacionada com as diferentes condições ótimas de pH e temperatura nas etapas de hidrólise e fermentação o que faz necessário realizar o processo numa condição compatível com as duas etapas. Considerando que a temperatura ótima de hidrólise enzimática está próxima dos 50°C e que micro-organismos convencionais produtores de etanol operam com ótimo de temperatura em torno dos 28-34°C, é recomendável a utilização de

microrganismos termotolerantes a fim de evitar a baixa eficiência de hidrólise ou baixa produtividade em etanol (OLOFSSON *et al.*, 2008; SUN; CHEN, 2008). Outro inconveniente do processo realizado em etapa única é a impossibilidade do reciclo dos organismos fermentativos, dado a complexa mistura com o resíduo de hidrólise.

O processo em etapa única pode ser de duas modalidades: uma conhecida como sacarificação e fermentação simultânea (SFS), na qual se empregam celulasas exógenas na presença de um microrganismo produtor de etanol; e outra chamada de bioprocessamento consolidado (BPC) ou conversão direta pelo microrganismo (CDM) em que os mesmos microrganismos, simultaneamente, produzem as enzimas celulolíticas e realizam a fermentação. Este bioprocessamento consolidado pode envolver um único microrganismo capaz de hidrolisar a biomassa com enzimas próprias e ao mesmo tempo fermentar os açúcares, produzir e tolerar alto teor de etanol; ou envolver sinergismo entre vários tipos de microrganismos que em conjunto produzem enzimas, hidrolisam a biomassa e fermentam os açúcares com significativo rendimento em etanol. Tal como no processo de SFS, a diferença de temperatura e pH ótimos para a produção de enzimas, sacarificação e fermentação é uma limitação que pode ser ultrapassada com a seleção de micro-organismos fermentativos termotolerantes ou através da engenharia genética e desenvolvimento de microrganismos recombinantes adaptados e eficientes em determinadas condições de processo (LYND *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2009; HASUNUMA; KONDO, 2012).

À luz dos novos avanços, mesmo perante a necessidade do desenvolvimento de um procedimento para reciclagem das células fermentativas, o bioprocessamento consolidado parece ser o desfecho lógico na evolução da produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos. Dado que a viabilidade deste processo também passa pelo descobrimento ou desenvolvimento de microrganismos termotolerantes capazes de manter um considerável rendimento em etanol a temperaturas favoráveis para a sacarificação, diversas estirpes de microrganismos, nomeadamente dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Fabospora* e *Candida*, foram já identificados pelas suas capacidades de produzir e tolerar concentrações de etanol de cerca de 5% do volume total a temperaturas superiores a 40°C (SZCZODRAK; TARGONSKI, 1988; GÍRIO *et al.*, 2010). Uma das limitações dos microrganismos fermentativos termotolerantes é a baixa tolerância ao etanol, contudo, conforme pode ser visto na revisão de Hasunuma e Kondo (2012), algumas estirpes de várias espécies tem sido isoladas e desenvolvidas por recombinação genética passando a assimilar vários açúcares e a atingir ótimas produtividades e bons rendimentos em etanol a

temperaturas de até 52°C. Uma dessas espécies é *Kluyveromyces marxianus*, que tem sido apontada como promissora por crescer bem a temperaturas de 45-52°C e produzir eficientemente o etanol a temperaturas de 38-45°C (FONSECA *et al.*, 2008). Esta espécie possui estirpes para as quais já foi demonstrado serem capazes de produzir etanol até 60-72 g/L a 42°C, o que é similar à concentração obtida por *S. cerevisiae*, espécie regularmente utilizada em destilarias industriais. Além disso, *K. marxianus* possui uma elevada taxa de crescimento e é capaz de assimilar e processar uma grande variedade de substratos tanto hexoses quanto pentoses (RODRUSSAMEE *et al.*, 2011).

No sentido de reduzir os custos, diminuir os investimentos em equipamentos, aumentar o rendimento em etanol e aumentar a viabilidade do bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, é de extrema importância o desenvolvimento desses micro-organismos com ampla aplicação, sobretudo porque o hidrolisado obtido dessas matérias-primas contem tanto hexoses (glucose, galactose, manose e fucose) como pentoses (xilose e arabinose) derivados da celulose e hemiceluloses (BALAT, 2011).

Correntemente, a fermentação da glicose é um processo completamente estabelecido e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais amplamente utilizado a nível industrial, na produção de etanol de primeira geração, apresentando uma elevada tolerância às condições industriais, processuais e à presença de etanol e de alguns inibidores (GOLDEMBERG, 2008; ARGUESO *et al.*, 2009; BALAT, 2011). No que concerne à produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisados celulósicos, a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis* constituem as mais promissoras alternativas dado os seus desempenhos na conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica. Todavia, esses micro-organismos não fermentam pentoses naturalmente (KESHWANI; CHENG, 2009).

Quanto à fermentação das pentoses, poucos microrganismos possuem a capacidade de fermentá-las a etanol, sendo que essa transformação é fundamental no âmbito do aproveitamento integral da biomassa. Apenas alguns microrganismos fermentam naturalmente pentoses, nomeadamente, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Candida shehatae* e *Candida parapsilosis*. O desempenho dessas espécies é muito limitado, já que o metabolismo das pentoses exige a presença de um nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado (KATAHIRA *et al.*, 2006). Estas estirpes apresentam ainda baixa tolerância a etanol e aos ácidos alifáticos. Esses microrganismos reduzem xilose a xilitol por intermédio da enzima xilose redutase e depois convertem xilitol a xilulose por meio da enzima xilitol desidrogenase (KATAHIRA *et al.*, 2006). A xilulose, por sua vez,

pode ser fermentada a etanol (SHI; JEFFRIES, 1998). Além disso, de acordo com Katahira *et al.* (2006), já é possível fermentar com sucesso a xilose usando *S. cerevisiae* recombinante portadora de xilose redutase e xilitol desidrogenase heterólogas. Todavia, têm sido desenvolvidas várias estirpes recombinantes, nomeadamente de *Escherichia coli*, *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*, com elevada capacidade para fermentar tanto hexoses como pentose, evidenciando potencial para se tornar a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol economicamente viável (CARDONA *et al.*, 2010; HASUNUMA; KONDO, 2012).

A seleção desses microrganismos para fermentação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos obedece a vários critérios de desempenho e, segundo Dien *et al.* (2003), para utilização industrial adequada um microrganismo deve deter características que garantam um bom desempenho dentro dos parâmetros fermentativos tais como, intervalo de temperatura, pH, a tolerância ao álcool, a taxa de crescimento, a produtividade, a tolerância osmótica, a especificidade, o rendimento, a estabilidade genética e a tolerância a inibidores, bem como também, a compatibilidade com os processos e equipamentos existentes. Neste âmbito, o desenvolvimento da engenharia genética vem acrescentando melhorias consideráveis na produtividade volumétrica, no aumento da tolerância a etanol, na eliminação de problemas de inibição durante a utilização de misturas ricas em glicose, e desenvolvimento de linhagens que são inteiramente resistentes aos produtos inibidores presentes no hidrolisado, possibilitando assim a eliminação das etapas de destoxificação.

3. Objetivos

O principal propósito deste trabalho foi avaliar os efeitos de pré-tratamentos com sulfito na composição química do bagaço de cana-de-açúcar, na digestibilidade enzimática da fração celulósica desse bagaço pré-tratado e na fermentabilidade do hidrolisado enzimático.

Para atingir o objetivo principal estipulou-se os seguintes objetivos secundários:

- Tratar o bagaço pelo processo hidrotérmico catalisado com sulfito neutro e alcalino.
- Caracterizar quimicamente o bagaço de cana-de-açúcar na sua forma *in natura* e pré-tratada;
- Analisar a influência das variáveis experimentais, tempo de residência, temperatura e concentração de sulfito, sobre a eficiência na remoção da hemiceluloses e lignina;
- Avaliar a digestibilidade dos bagaços pré-tratados através da hidrólise enzimática, considerando principalmente a liberação de açúcares fermentescíveis, glicose e xilose;
- Testar a fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos obtidos de bagaços pré-tratados em condições otimizadas, usando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*;

4. Metodologia

4.1 Preparação da matéria-prima usada no estudo

A matéria-prima usada nos experimentos deste trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar (BCA), que foi gentilmente cedido pela Usina Açucareira FURLAN S/A, Santa Bárbara D'Oeste (SP), safra de 2012. O material foi diretamente ensacado do monte de bagaço moído no dia 29 de Outubro usando sacos pretos de polietileno, totalizando cerca de 40 kg de bagaço úmido. O bagaço foi transportado para Lorena e já no Laboratório de Química de Lignocelulósicos do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP, foi homogeneizado e embalado em sacos de polietileno transparentes hermeticamente fechados após aplicação de vácuo. Os sacos contendo cerca de 4 kg de bagaço com cerca de 50% de umidade foram armazenados num congelador a -20°C até o posterior uso na condução dos experimentos. Antes do uso, o bagaço foi descongelado e seco a temperatura ambiente no interior do laboratório até a umidade média de cerca 10-15%.

4.2 Caracterização química do Bagaço *in natura* e do Bagaço pré-tratado

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados, foram caracterizadas quimicamente conforme metodologias em uso no Laboratório de Química de Lignocelulósicos e detalhadas a seguir. Essas amostras reservadas para a caracterização química foram moídas num moinho de facas, usando uma peneira com malha de 20 *mesh*, e selecionadas as partículas menores ou igual a esse tamanho que foram utilizadas nos ensaios para determinação de cinzas, extrativos, lignina total (insolúvel e solúvel) e carboidratos. Todos os ensaios de caracterização química foram realizados em triplicata e os dados foram expressos em percentuais médios juntamente com os respectivos desvios padrões.

4.2.1 Determinação da massa seca

O percentual de umidade das amostras de bagaço de cana foi determinado numa balança de infravermelho (Shimadzu, MOC-120H), a 105°C, por 20 min, usando uma

amostra de 0,5-1 g, sendo esse dado usado para calcular a massa seca das amostras através da Equação 1.

$$M = \frac{M_A \cdot (100 - \%umidade)}{100} \quad (1)$$

Sendo:

M - massa seca da amostra;

M_A - massa da amostra úmida.

4.2.2 Determinação dos extrativos

Em envelopes de papel de filtro foram colocados cerca de 4 g de bagaço *in natura* moído (≤ 20 mesh), com umidade conhecida, que em seguida foram inseridos num extrator *Soxhlet* e foram extraídos com etanol 95% por cerca de 7 horas (cerca de 10 sifonações). Os envelopes contendo o bagaço extraído foram secos ao ar à temperatura ambiente para evaporação do solvente até à massa constante, após a qual, as amostras foram pesadas e quantificadas em balança analítica (Shimadzu, AY220). Cerca de 1 g do material contido em cada envelope foi utilizado para determinação da umidade e a restante parte foi reservada para a hidrólise com ácido sulfúrico 72% visando a caracterização química. O percentual de extrativos foi determinado pela Equação 2:

$$E = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo:

E - percentual de extrativos do bagaço de cana;

M_i – massa seca inicial da amostra de bagaço *in natura*;

M_f - massa seca final após extração.

4.2.3 Hidrólise com ácido concentrado (H₂SO₄ 72%)

Em tubos de ensaio com capacidade para 50 mL, devidamente etiquetados, foram pesadas 0,3 g (massa seca) de bagaço de cana (*in natura* extraído ou pré-tratado) com

aproximadamente 10% de umidade. Com os tubos mergulhados num banho-maria a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72% e a reação ocorreu por 60 min sendo a mistura agitada a cada intervalo de 10 min com auxílio de um bastão de vidro. A reação em cada tubo foi interrompida com a adição de cerca de 15 mL de água destilada do total de 79 mL usados para transferir quantitativamente as amostras para erlenmeyers de 125 mL e também para reduzir a concentração final do ácido para cerca de 3%. Para a hidrólise completa dos oligômeros restantes, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 60 min a 121°C . Foi também preparado um “branco” com ácido sulfúrico a 3% em condições similares. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura reacional de cada erlenmeyer contendo o hidrolisado solúvel e o resíduo sólido (lignina insolúvel e cinzas) foi filtrada através de microfiltro em fibra de vidro (GF-3) (previamente seco e tarado juntamente com pesa-filtro) e transferido para um balão volumétrico de 250 mL. Lavou-se bem o erlenmeyer e o papel de filtro, com cerca de 140 mL de água destilada, para não haver perda dos produtos gerados, e essa água foi transferida para o balão que posteriormente foi avolumado com água destilada. Para o “branco” foi adotado o mesmo procedimento.

4.2.4 Determinação da lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância num espectrofotômetro UV-visível de feixe duplo (Dynamica, Halo DB-20). A solução “branco” preparada de ácido sulfúrico 3% foi adequadamente diluída e usada como “branco” referência. Transferiu-se uma alíquota de 2 mL de cada hidrolisado ácido para balões volumétricos de 50 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. Utilizando celas/cubetas de quartzo, as leituras de absorvância das soluções foram realizadas a 205 nm. Conforme a Equação 3, para a determinação das concentrações de lignina solúvel utilizou-se o coeficiente de extinção molar da lignina de 105 L/g.cm que é a média das absorvidades apresentadas para diversos materiais lignocelulósicos (MENDES *et al.*, 2011). A leitura de absorvância deve ser realizada até 6 h após hidrólise.

$$C_{Lig} = \frac{A_{Hid}}{105} \quad (3)$$

Sendo:

C_{Lig} - concentração de lignina solúvel, em g/L;

A_{Hid} - absorvância da amostra de hidrolisado em 205 nm.

4.2.5 Determinação de lignina Klason insolúvel em meio ácido

Usando-se um pesa-filtro, o microfiltro em fibra de vidro contendo o resíduo insolúvel (lignina + cinzas) foi seco em estufa a 105°C até peso constante, após o qual foi pesado e determinado a massa seca de lignina. Em seguida, a lignina de cada triplicata foi cuidadosamente transferida para um cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, e calcinada inicialmente a 300°C e depois por mais 2 h a 800°C. Posteriormente o cadinho contendo as cinzas das amostras de lignina foi deixado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, fazendo-se em seguida a sua pesagem. O percentual de lignina insolúvel foi determinado pela diferença entre o resíduo sólido e o percentual da massa de cinzas da lignina, conforme apresentado na Equação 4:

$$L_I = \frac{(M_{R2} - M_{R1}) - (M_{C2} - M_{C1})}{M_A} \cdot 100 \quad (4)$$

Sendo:

L_I - percentual de lignina insolúvel;

M_{R2} - massa do pesa-filtro contendo microfiltro com resíduo insolúvel;

M_{R1} - massa do pesa-filtro contendo microfiltro;

M_{C2} - massa do cadinho com cinzas;

M_{C1} - massa do cadinho;

M_A - massa da amostra utilizada para a caracterização química.

4.2.6 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais no bagaço de cana *in natura* e no bagaço de cana pré-tratado foi feita em triplicata e de maneira semelhante à determinação das cinzas da lignina e conforme metodologia descrita em SILVA (1995) com pequenos ajustes. Cerca de 1g (massa seca) de bagaço, com umidade conhecida, foi pesado, com incerteza de 0,001g, em um cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Em seguida, o bagaço foi calcinado inicialmente a 300°C e depois por mais 2 h a 800°C. Após a

calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. O percentual de cinzas totais foi determinado pela Equação 5:

$$C_T = \frac{(M_{C2} - M_{C1})}{M_A} \cdot 100 \quad (5)$$

Sendo:

C_T - percentual de cinzas totais;

M_{C2} - massa do cadinho com cinzas;

M_{C1} - massa do cadinho;

M_A - massa da amostra (massa seca).

4.2.7 Determinação de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois

Os açúcares, os ácidos orgânicos e os álcoois foram determinados num cromatógrafo líquido modelo Waters 1515, a partir de amostras dos hidrolisados ou dos fermentados previamente filtradas em cartucho Sep-Pak C18 (Waters). A coluna de separação utilizada foi a Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm Bio-Rad Laboratories Ltd), acoplada a uma pré-coluna de troca iônica (Bio-Rad Laboratories Ltd), a fase móvel usada foi H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ à vazão de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura de 45°C e período de análise de 11, 18 e 23 min, consoante sejam amostras de hidrólise enzimática, hidrólise ácida e fermentação, respectivamente. Os compostos foram identificados através de um detetor de índice de refração Waters 2414 (FERRAZ *et al.*, 2000) e suas concentrações foram determinadas com base nas respetivas curvas analíticas. As massas de celulose e hemicelulose foram obtidas multiplicando-se as massas de cada monômero correspondente pelos respetivos fatores de conversão (Tabela 3), com base na estequiometria das reações.

Tabela 3: Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respetivos valores de conversão

Monômero	Fator de Conversão	Polímero
Celobiose	0,95	Celulose
Glicose	0,90	Celulose
Xilose	0,88	Hemicelulose
Arabinose	0,88	Hemicelulose
Ácido Acético	0,72	Hemicelulose

4.3 Reações de pré-tratamento

4.3.1 Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito

Os ensaios de pré-tratamento hidrotérmico foram realizados num sistema de autoclave com reator cilíndrico de Nióbio, com capacidade de cerca de 700 mL, equipado com termopar e manômetro. Em funcionamento o reator foi acoplado a uma mesa oscilante dotada de camisa de aquecimento elétrica. A agitação foi de aproximadamente 60 Hz e o tempo para se atingir as temperaturas de reação a partir da temperatura ambiente consta da curva de aquecimento mostrada na Figura 9.

Nos processos utilizados para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* empregou-se o sulfito de sódio (Na_2SO_3) como catalisador na proporção de 10% para sulfito neutro e 5, 7.5 e 10% para o sulfito alcalino, relativamente à massa do bagaço seco. No caso do sulfito alcalino foi utilizada como alcali o hidróxido de sódio (NaOH) na proporção de 5% em relação à massa do bagaço. A consistência de sólidos em todos os ensaios foi de 8% (m/v), ou seja, para cada ensaio foi utilizado 40 gramas (peso seco) de bagaço *in natura* para 500 mL de solução sulfito neutro ou sulfito alcalino. As reações foram conduzidas a temperaturas variáveis de 130-175°C e os tempos de reação de 30 e 60 min.

Figura 9: Curva de aquecimento do reator de Nióbio

Após o tempo de reação determinado à temperatura de trabalho de cada ensaio, o reator foi retirado da camisa de aquecimento e mergulhado num banho de água fria para interromper as reações. Depois de zerada a pressão interna, o reator foi aberto e o conteúdo reacional obtido foi filtrado a vácuo até à máxima remoção do licor que teve o pH medido. Após essa etapa foi feita a lavagem do bagaço pré-tratado com água destilada a 60°C, recirculando quatro vezes a água de lavagem para retenção dos finos. Num balão volumétrico, o licor ($\cong$ 350 mL) foi misturado à água de lavagem (cerca de 1,6 L), avolumado para 2L e reservado para determinação da lignina e açúcares solubilizados durante o pré-tratamento. O bagaço pré-tratado foi seco à temperatura ambiente até cerca de 10-15% de umidade após o qual foi moído num moinho de facas, usando uma malha de 20 *mesh*, e armazenado em sacos de polietileno com fecho hermético até ser usado nos ensaios de caracterização química (secção 4.2) e hidrólise enzimática (secção 4.4.3).

4.3.2 Cálculo da severidade dos pré-tratamentos

Para comparar a eficiência de diferentes métodos de pré-tratamento em preparar a biomassa lignocelulósica para a conversão bioquímica, geralmente se usam os rendimentos da recuperação da celulose no substrato pré-tratado, os rendimentos em monossacarídeos fermentescíveis após sacarificação ou o rendimento em etanol após fermentação do hidrolisado. Muitos autores encontraram uma relação linear entre estas respostas citadas e os fatores de severidade dos pré-tratamentos (OVEREND; CHORNET, 1987; CHUM *et al.*, 1990; YANG; WYMAN, 2004; PEDERSEN *et al.*, 2010). Dado que diversos fatores inerentes a cada pré-tratamento podem afetar a biomatriz do substrato lignocelulósico e assim influenciar a sua digestibilidade, várias fórmulas de severidade têm sido usadas, sem, no entanto, existir uma fórmula única com abrangência de todos os fatores e para todas as faixas de pH, pelo que, há que considerar para cada modalidade de pré-tratamento uma fórmula que reúna os fatores de maior relevância.

Assim, neste trabalho, no sentido de determinar a fórmula de severidade que melhor se ajusta/adequa aos resultados obtidos, foram utilizadas três metodologias de cálculo de fator de severidade para avaliar os resultados de maior relevância. Com este intuito, foram usados o índice de severidade proposto por Overend e Chornet (1987) (Equação 6A), o fator de severidade combinada descrito por Chum *et al.* (1990) (Equação 6B) e um terceiro

fator de severidade adaptado do trabalho de Chum *et al.* (1990) e modificado especificamente para o tipo de pré-tratamento usado neste trabalho, que leva em consideração o efeito da temperatura e tempo de reação sobre a solubilização, principalmente, das hemiceluloses e o efeito da concentração de catalisadores sobre a solubilização da lignina, denominada então de severidade catalítica (Equação 6C).

$$\log R_0 = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (6A)$$

$$\log R_0' = \log(R_0) + |pH - 7| \quad (6B)$$

$$\log (S_0) = \log \left[C^n \cdot s \cdot t \cdot \exp \left(\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (6C)$$

Sendo:

$\log (R_0)$ – índice severidade;

$\log (R_0')$ – severidade combinada;

$\log (S_0)$ – severidade catalítica;

t – tempo de reação (min);

T – temperatura (°C);

T_{ref} – 100 °C;

s – concentração de sulfito;

C^n – concentração do catalisador ácido ou alcalino onde n é uma constante arbitrária de valor 0,849 para o ácido sulfúrico e 3,90 para hidróxido de sódio.

4.3.3 Cálculos de rendimento dos pré-tratamentos

Os rendimentos (expressos em relação à fração sólida) das reações de pré-tratamento foram calculados, utilizando a Equação 7, através da diferença de massa seca entre o bagaço pré-tratado e o bagaço inicial *in natura*. Já as perdas de celulose, hemicelulose e lignina foram calculadas pela Equação 8.

$$R = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (7)$$

Sendo:

R - percentual de rendimento da reação;

M_f - massa final após a reação (massa seca);
 M_i - massa inicial (massa seca);

$$P = 100 \cdot \left(1 - \frac{R}{100} \cdot \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (8)$$

Sendo:

P - percentual de perda do componente;

R - percentual de rendimento da reação de pré-tratamento;

y_f - teor do componente do bagaço após a reação;

y_i - teor do componente do bagaço antes da reação;

4.3.4 Análise da fração líquida do pré-tratamento

Após cada ensaio de pré-tratamento, o líquido reacional, contendo a fração solubilizada misturada à água de lavagem, foi separada para análise quanto ao teor de lignina e para quantificação dos carboidratos solubilizados.

Para a determinação da lignina solúvel, logo após a filtração, amostras do líquido reacional foram coletadas, diluídas mil vezes e lidas espectrofotometricamente como descrito em 4.2.4, usando como “branco” a solução sulfito usada no pré-tratamento, depois de adequadamente diluída. Para análise dos açúcares, uma amostra de cerca de 100 mL do líquido reacional foi separada e conservada no congelador até a análise por cromatografia, conforme descrito no item 4.2.7.

Como as frações hidrossolúveis geradas nos pré-tratamentos apresentaram, numa análise prévia, alguma presença de oligossacarídeos em sua constituição, foi necessária a realização de uma etapa complementar de pós-hidrólise para garantir uma análise consistente para o fechamento do balanço de massas. Assim, para a quantificação dos carboidratos presentes no licor de pré-tratamento, aproximadamente 10 mL do líquido reacional de cada ensaio de pré-tratamento foi transferido para um erlenmeyer de 25 mL ao qual foi gotejado ácido sulfúrico 1 mol/L até atingir $\text{pH} \cong 3$. De seguida os frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C para hidrólise completa dos oligômeros. Depois de resfriados, uma amostra de cada hidrolisado foi filtrada, antes, em cartuchos de membrana de nylon com porosidade de 0,45 μm e, depois, em cartucho

Sep-Pak C18 (Waters), e analisada quanto ao teor de açúcares por cromatografia líquida, como descrito em 4.2.7.

4.4 Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e β -glucosidase (Novozym 188). Para todos os ensaios de dosagem enzimática ou diluição (quando necessário) foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

4.4.1 Determinação da atividade celulásica total (UFP)

A atividade enzimática da Celluclast 1.5 L foi previamente determinada empregando-se a metodologia padrão (GHOSE, 1986). Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução mãe preparada pela diluição do extrato enzimático original Celluclast 1.5 L. Em posse dessa solução mãe, efetuou-se 5 novas diluições em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

Em tubos de ensaio, mantidos num banho termostático a 50°C, adicionou-se 1 mL de tampão citrato e 50 mg de tiras de papel de filtro Whatman nº1. Após 10 minutos para equilibrar a temperatura e saturar o papel de filtro com tampão, adicionou-se a cada tubo 0,5 mL de cada uma das diluições da enzima previamente preparadas e os tubos foram encubados por 60 minutos, ao final do qual, foram removidos e a reação enzimática parada com a adição de 3 mL do reagente DNS, preparado segundo a metodologia descrita por Miller (1959). Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C, em seguida invertidos três vezes para homogeneização, resfriados num banho de gelo e a cor formada foi medida no espectrofotômetro a 540 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na concentração de açúcares redutores liberados pela ação enzima em cada um dos ensaios, inferidos a partir da reta de calibração de glicose construída a partir de ensaios realizados em simultâneo e nas mesmas condições que a atividade enzimática.

O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática (MILLER, 1959). A atividade enzimática foi calculada em UFP/mL (unidades de papel de filtro por mL de preparação enzimática, ou seja, a quantidade de enzima capaz de liberar 1

mmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio) através da seguinte Equação 9.

$$\text{UPF/mL} = \frac{E_{\text{dil}} \cdot V_T (\text{mL})}{t (\text{min}) \cdot 1 \mu\text{mol de glucose (mg)} \cdot V_E (\text{mL})} \quad (9)$$

Sendo:

V_T - é o volume total da reação (2mL);

t - é o tempo da reação (60 min);

1 μmol de glucose corresponde a 0,18016 mg;

V_E - é o volume da diluição da enzima empregue no ensaio.

E_{dil} - diluição da enzima necessária para liberar 1 mg/mL de glucose no meio reacional, obtida por regressão linear (interpolação).

4.4.2 Determinação da atividade celobiásica total (UCB)

O objetivo desta secção foi medir a atividade da β -glicosidase através de uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressá-la em unidades de celobiose (UCB) por volume de enzima original. Desta forma, a atividade celobiásica foi determinada segundo as recomendações da IUPAC (GHOSE, 1986) e partindo-se de uma solução mãe da enzima β -glicosidase com diluição de 1:1000, foram preparadas outras cinco diluições distintas, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, com capacidade para produzir em torno de 1 mg/mL de glucose. Em tubos de ensaio, alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções enzimáticas foram pré-incubadas a 50°C e a reação foi iniciada com a adição de 1 mL de uma solução de celobiose a 15 mmol/L em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Após 30 min, a reação foi terminada com a imersão dos tubos em água fervente por 5 min. Depois de resfriadas em banho de gelo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm, 4°C (Hettich ROTANTA 460), sendo coletadas amostras dos sobrenadantes que, depois diluídas apropriadamente, os açúcares solúveis produzidos foram analisados por cromatografia líquida, conforme descrito em 4.2.7. Estes dados serviram para construir um gráfico semi-log, relacionando as diluições da enzima e suas respectivas concentrações de açúcar redutor (determinadas por DNS), de onde a E_{dil} foi determinada por regressão linear (interpolação). Assim, a atividade celobiásica foi calculada através da Equação 10.

$$UCB/mL = \frac{E_{dil} \cdot V_T (mL)}{t (min) \cdot 2 \mu mol \text{ glucose (mg)} \cdot V_E (mL)} \quad (10)$$

Sendo:

V_T - volume total da reação (2 mL);

t - tempo da reação (30 min);

1 μ mol de glucose corresponde a 0,36 mg;

V_E - volume da diluição da enzima empregue no ensaio.

4.4.3 Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado

Apesar da eficácia de um pré-tratamento ser, frequentemente, relatada em termos dos seus efeitos sobre a composição química e nas características físicas da biomassa pré-tratada, no âmbito da produção de etanol por fermentação de hidrolisados enzimáticos desses materiais pré-tratados é interessante testar a eficácia do pré-tratamentos em termos de sua habilidade para promover a digestibilidade enzimática e maximizar o rendimento, principalmente, o rendimento glicosídico.

Assim, para se verificar as melhores condições de pré-tratamento, foram realizadas hidrólises enzimáticas para cada uma das amostras de bagaço pré-tratado, usando condições ótimas de temperatura e pH da enzima, com a finalidade de analisar a digestibilidade e quantificar os açúcares liberados durante esta etapa.

A hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados em diferentes condições foi realizada a uma consistência de sólidos de 5% (m/v) em relação à massa seca do bagaço pré-tratado. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 125 mL usando 2 g de amostra (massa seca) para um volume total de 40 mL, incluindo o volume do tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) com azida sódica¹ 0,02% e o volume da solução do extrato enzimático. Foram utilizadas cargas enzimáticas de 10 UFP/g de amostra para o complexo

¹ Embora seja prática comum o uso de azida sódica (NaN_3) na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, no que concerne à produção de etanol, a junção desse aditivo dificultaria ou mesmo impossibilitaria a fermentação destes hidrolisados pelas linhagens comuns de levedura produtoras de álcool, pelo que, para os hidrolisados submetidos à fermentação, optou-se pela autoclavagem (10 min a 0,5 bar) dos bagaços pré-tratados imersos em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8, ao invés do uso de inibidores de crescimento microbiano. Após a esterilização do bagaço, numa câmara de fluxo (BioFlux II 90A), adicionou-se as soluções enzimáticas e completou-se o volume com tampão esterilizado. Desta forma, pôde-se conduzir a hidrólise dos bagaços sem contaminação microbiana e, portanto, com os açúcares monoméricos preservados para a fermentação.

Celluclast 1.5 L e de 10 UCB/g de amostra para a enzima β -glicosidase. Após a adição da preparação enzimática, os erlenmeyers foram colocados numa incubadora com agitação orbital (150 rpm), pré-aquecida à temperatura de 45°C (determinada como ótima para a enzima) e iniciou-se a contagem do tempo de hidrólise. Cada ensaio de hidrólise foi realizada em duplicado e acompanhado pelo respectivo branco de enzima. A cinética de liberação de açúcares foi acompanhada por 72 horas sendo que foram coletadas amostras (250 μ L) do líquido reacional de hidrólise em períodos de tempo pré-determinados (0, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 h). As amostras coletadas foram fervidas por 5 minutos, em tubos Eppendorf identificados, para inativação das enzimas, centrifugadas a 10000 rpm (Beckman Microfuge 12) e, depois de amostras do sobrenadante serem adequadamente diluídas, foram analisadas por cromatografia líquida, conforme descrito em 4.2.7, para quantificação de celobiose, glucose e xilose, após a qual se traçou o perfil da hidrólise em cada ensaio, onde a concentração dos açúcares liberados no meio reacional foi analisada em função do tempo de hidrólise. A máxima conversão enzimática da celulose para cada ensaio foi calculada pela Equação 11, usando a massa de glucose quantificada no hidrolisado depois das 72 horas de hidrólise.

$$C = \frac{M_g \times f_h}{M_i \times y_i} \cdot 100 \quad (11)$$

Sendo:

C - percentual de conversão enzimática da celulose;

M_g - massa de glucose presente no hidrolisado;

M_i - massa seca do bagaço pré-tratado usado na hidrólise enzimática;

y_i - teor de celulose no material no bagaço pré-tratado;

f_h - fator de conversão de glucose em celulose (0,9).

4.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático

Para o teste de fermentabilidade foi utilizado o hidrolisado enzimático obtido do bagaço pré-tratado em condições otimizadas, ou seja, nas condições que possibilitaram o maior rendimento global em açúcares fermentescíveis com o mínimo de energia investida, tomando em consideração as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Na fermentação foram empregues as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e a *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773. A *S. cerevisiae* PE-2 é a mais robusta estirpe

selvagem dessa espécie, isolada das usinas de etanol em 1994 (BASSO *et al.*, 2008) e largamente adotada e implementada em destilarias industriais do Brasil, por apresentar um elevado desempenho fermentativo, superior ao das leveduras de panificação e não manifestar problemas de floculação ou espuma. Nas condições industriais, essa estirpe de leveduras apresenta ótima adaptabilidade, elevada implementação e predominância sobre as outras estirpes. Dada à sua elevada resistência, esta estirpe poderá ser uma das melhores opções para fermentação de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana. A *P. stipitis* CBS 5773 é uma estirpe bastante empregue em fermentações à escala laboratorial, especialmente na fermentação de hidrolisados de substratos lignocelulósicos devido à sua capacidade de assimilação de diversos açúcares (glicose, celobiose, xilose, etc.) e não requerer suplementação complexa para a conversão destes em etanol (TANIGUCHI *et al.*, 1997).

4.5.1 Manutenção e reativação das leveduras

Todos os procedimentos envolvendo as leveduras foram efetuadas em condições de assepsia e os materiais utilizados foram autoclavados por 10 minutos à pressão de 0,5 bar, incluindo os meios utilizados. A fim de evitar contaminações, o manuseio da levedura foi sempre realizado em câmara de fluxo laminar (BioFlux II 90A) cujas superfícies foram previamente esterilizadas com álcool etílico 70°GL e com radiação ultravioleta germicida por 15 min.

As culturas estoque de *S. cerevisiae* PE-2, cedida pelo Prof. Basso, e de *P. stipitis* CBS 5773 são mantidas no Laboratório de Química de Lignocelulósicos em meio de cultura YEPD semi-sólido contendo extrato de levedura (5 g.L⁻¹), peptona (10 g.L⁻¹), glicose anidra (20 g.L⁻¹) e Agar (20 g.L⁻¹), distribuída em tubos de ensaio devidamente vedados com rolha de algodão, autoclavados e inclinados. Consoante a necessidade, essas culturas estoque foram repicada para vários tubos semelhantes e mantidas a 30°C por 24 h, após o qual foram refrigeradas a 4°C, mantendo-as inativas por até seis meses.

A reativação das leveduras e obtenção do pré-inóculo foi realizada partindo-se dos repiques em meio sólido. Essas culturas de reativação foram efetuada em 5 mL de meio YEPD sem Agar, em frascos erlenmeyer de 25 mL, mantidos numa incubadora Shaker (SOLAB), sem agitação, a 30°C, por um período de 24 horas, em seguida transferida

totalmente para 100 mL do mesmo meio e incubada nas mesmas condições por mais 48 horas.

4.5.2 Propagação e preparação do inóculo

Na capela de fluxo laminar (previamente esterilizada como descrito em 4.5.1), cada cultura de levedura reativada foi decantada e o sobrenadante descartado. A biomassa de cada uma delas foi transferida para um erlenmeyer de 1L contendo 0,5 L de meio líquido de propagação (previamente autoclavado conforme descrito em 4.5.1), tendo na sua composição sacarose (100 g/L), extrato de levedura (2,5 g/L), ureia (0,6 g/L), K_2HPO_4 (0,87 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,49 g/L), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,029 g/L), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,017g/L) e pH ajustado para 5,5. O meio de cultura usado para a propagação da de *P. stipitis* CBS 5773 foi em tudo semelhante ao meio usado para a *S. cerevisiae* PE-2, exceto a sacarose que foi substituída por xilose. Tendo o erlenmeyer vedado com rolha de algodão envolto por gaze, a cultura foi incubada a 30°C por 72 horas, após a qual, as cultura foram refrigerada a 4°C por cerca de 4 horas para facilitar a decantação.

Para a separação da biomassa das leveduras do meio de propagação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e as células foram recolhidas em tubos de centrifuga e lavadas com água destilada previamente esterilizada. Esta lavagem consistiu em três séries de centrifugação (Hettich ROTANTA 460) a 3000 rpm, 4°C, por 10 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão da biomassa em água destilada. No final, toda a biomassa colhida foi ressuspensa e avolumada com água destilada esterilizada em balões volumétrico, dos quais foram retiradas alíquotas para avaliação da viabilidade celular e determinação da concentração de biomassa, sendo a restante parte conservada para inoculação dos hidrolisados a fermentar.

4.5.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade das leveduras foi determinada através do método de coloração com azul-de-metileno, como descrito por Sami *et al.* (1994). O uso desse método permite avaliar o estado fisiológico das leveduras, através da capacidade que as células em bom estado fisiológico têm de expulsar ativamente o corante. O método consistiu em misturar um volume conhecido da solução corante (0,01% de azul-de-metileno numa solução de

citrato de sódio 2%) com igual volume da suspensão celular a ser analisada e, após 5 min a 25 °C, quantificar a proporção de células mortas e vivas numa câmara hemocitométrica de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico. As células mortas apareceram fortemente coradas de azul.

4.5.4 Determinação do peso seco e da concentração de biomassa de leveduras

Para a determinação do peso seco e da concentração de biomassa na suspensão inicial de leveduras usadas como inóculo e no vinho de fermentação foram separadas alíquotas de 10 mL dessas suspensões de células que foram lavadas, adequadamente diluídas e analisadas suas absorvâncias num espectrofotômetro UV-visível de feixe duplo (Dynamica, Halo DB-20) a 600 nm. As concentrações de biomassa nas suspensões de leveduras foram determinadas com base nas curvas analíticas previamente construídas para as duas estirpes de leveduras, conforme o método descrito por Rice *et al.* (1980).

4.5.5 Ensaios de fermentação

Apenas os hidrolisados enzimáticos dos bagaços pré-tratados em condições otimizadas, obtidos sem adição de inibidores de crescimento microbiano, foram usados para avaliar a fermentabilidade da glicose e xilose obtidas.

Os ensaios de fermentabilidade (em duplicata) foram realizados em erlenmeyers de 125 mL usando 30 mL do hidrolisado. Como controle foi usado um meio semissintético contendo glicose e xilose em concentrações semelhantes às encontradas no hidrolisado enzimático. Ambos, o hidrolisado e o meio controle, foram enriquecidos com os seguintes componentes: extrato de levedura (2,5 g.L⁻¹), ureia (0,6 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,87 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,49 g.L⁻¹), ZnSO₄.7H₂O (0,029 g.L⁻¹), MnSO₄.H₂O (0,017g.L⁻¹). Em seguida, o pH foi ajustado para 5,5 e ambos os meios foram autoclavados a 0,5 bar por 10 min e, após resfriados em banho de gelo, foram inoculados com determinado volume da suspensão de leveduras, preparada como descrito em 4.5.2, de modo que a concentração inicial de célula no meio de fermentação fosse de 3 a 4 g/L. Para cada tempo de amostragem, foram preparados dois ensaios para cada levedura e para o respectivo controle, tendo sido estes mantidos numa incubadora shaker (SOLAB) a 30°C, com agitação orbital de 100 rpm, por 24 horas, com coletas no início da fermentação e depois de 2, 4, 8 e 24 horas.

4.5.6 Preparação e análise das amostras

As amostras coletadas a cada intervalo de tempo foram transferidas para tubos de centrifuga, refrigeradas em gelo e em seguida centrifugadas (HT 80-2B) a 3000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em frascos de amostras devidamente identificados e a seguir congelados para posterior análise dos carboidratos, ácidos orgânicos e etanol por cromatografia líquida, conforme o procedimento descrito em 4.2.7. O *pellet* de células precipitadas na centrifugação foi ressuspensionado com água destilada e novamente centrifugado, repetindo-se o processo 3 vezes com o descarte do sobrenadante. No final, as células precipitadas foram ressuspensionadas e adequadamente diluídas e analisadas quanto à concentração de biomassa, seguindo os procedimentos descritos em 4.5.4.

4.5.7 Determinação dos parâmetros fermentativos

O desempenho fermentativo das duas estirpes de leveduras, *S. cerevisiae* PE-2 e *P. stipitis* CBS 5773, foi avaliado com base nos seguintes parâmetros:

Consumo de substrato (ΔS) – fração de glicose e xilose consumidas no período de fermentação (g e %);

Rendimento da biomassa ($Y_{X/S}$) – quantidade de biomassa produzida em função da massa dos açúcares consumidos (g/g);

Rendimento em etanol ($Y_{Et/S}$) – quantidade de etanol produzida por grama de açúcares consumidos (g/g);

Eficiência de conversão de açúcares em etanol (Y_{Et}) – razão entre o rendimento real em etanol e o rendimento teórico (%);

Produtividade volumétrica (Q_P) – quantidade de etanol produzida, por litro de meio de cultura e por hora, durante o período de fermentação (g/(L.h));

Rendimento em glicerol (Y_G) - quantidade de glicerol produzida por grama de açúcares consumidos (g/g).

4.5.8 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios realizados com base no planejamento fatorial foram analisados estatisticamente, por meio de regressão, análises de variância (ANOVA) e metodologia de superfície de resposta (MSR), utilizando-se o programa STATISTICA

(Statsoft, v.7.0) para a verificação dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas chave para o processo de pré-tratamento em questão e para a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas. A análise da significância dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada considerando os parâmetros estatísticos F, t e p e o nível de confiança foi fixado em 95% ($p < 0,05$). O valor de t serviu para mostrar o quão grande é o valor do efeito em relação ao seu desvio padrão. Para a análise da significância da predição considerou-se o parâmetro estatístico, valor F.

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado neste trabalho foi caracterizado quimicamente e os teores percentuais de seus componentes estruturais (celulose, hemiceluloses e lignina) e não estruturais (cinzas e extrativos) foram determinados e estão apresentados, juntamente com os desvios médios, na Tabela 4. Esses dados foram utilizados para evidenciar as variações no teor dos componentes estruturais obtidos para os bagaços pré-tratados com sulfito neutro e sulfito alcalino em função das condições operacionais de pré-tratamento (% de sulfito, temperatura e tempo de residência no reator). Quando comparados com resultados de trabalhos anteriores obtidos no nosso laboratório e encontrados na literatura (Tabela 5), esses valores se mostraram relativamente semelhantes aos reportados para esse tipo material lignocelulósico. Nomeadamente, Cunha (2005) encontrou, no bagaço de cana *in natura* que usou, 37% de celulose, 30% de hemicelulose e 22,9% de lignina, Gámez *et al.* (2006) encontraram, no mesmo tipo de material, 38,9% de celulose, 26,1% de hemicelulose e 23,9% de lignina e Sanjuan *et al.* (2001) também obtiveram 42,3% de celulose, 28,6% de hemicelulose e 21,7% de lignina para esse material lignocelulósico. Apesar do teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar geralmente variar de 35-45%, muitos resultados encontrados na literatura para esse material apresentam teor alto de celulose (42%~45,4%) como se pode ver, a título de exemplo, nos trabalhos de Silva (1995) e Rodrigues *et al.* (2010). Mesmo assim, o teor de celulose encontrado neste trabalho ($37,5\% \pm 2$) é considerado satisfatório e torna esse bagaço utilizado uma biomassa vegetal interessante para a produção de etanol celulósico. Além disso, considerando que, neste trabalho, não foram analisados e quantificados o ácido metilglucurônico e os produtos de degradação dos açúcares, como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), pode-se dizer que as frações de celulose e hemiceluloses foram subestimadas. Outro facto a salientar para esse bagaço utilizado é o teor de extrativos ($8,1 \pm 0,1$) que foi ligeiramente elevado, considerando a média dos resultados reportados na literatura que é de cerca de 5% da massa total (PANDEY *et al.*, 2000; FENGEL; WEGENER, 1989). Esse valor pode ser explicado em parte pelo facto do bagaço ter sido utilizado sem nenhuma lavagem prévia e, portanto, pode trazer adsorvido açúcar residual do processo de prensagem ou moagem, que foi arrastado pelo solvente no

processo de extração e contabilizado como extrativo. Esse facto foi reportado por Esteves (2011) que verificou que cerca de 26% do total de extrativos do bagaço de cana consistia em açúcares.

Tabela 4: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado no presente trabalho.

Componentes	Proporção (%)
Celulose	$37,5 \pm 2$
Hemicelulose	$24,3 \pm 1$
Lignina total	$19,3 \pm 0,9$
Extrativos	$8,1 \pm 0,1$
Cinzas	$4,8 \pm 0,4$
Total	$94,1 \pm 2$

Uma outra diferença marcante em relação aos bagaços de cana caracterizados por outros autores, mostrados na Tabela 5, foi o alto conteúdo de cinzas determinado no bagaço utilizado neste presente trabalho (4,8%). Este valor é muito dependente das propriedades solo em que se cultiva a cana, da capacidade das variedades de cana para bioacumulação de minerais e, como neste caso se trata de bagaço de cana oriundo de cultivo industrial, o teor de cinzas pode ter sido influenciado pela suplementação com fertilizantes minerais. O teor percentual de lignina obtido para a variedade de bagaço usada neste trabalho (19,3%) corrobora com diversos resultados relatados na literatura sendo alguns mostrados na Tabela 5. Geralmente, as variedades de cana-de-açúcar empregues em cultivos industriais pelas usinas sucroalcooleiras são caracterizadas por apresentarem elevado rendimento em sacarose e possuírem teor de lignina na faixa do valor obtido neste trabalho e em vários resultados reportados na literatura, nomeadamente, os valores obtidos por Brienzo *et al.* (2009) e Santos *et al.* (2009).

Tabela 5: Teores percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Referências	Componentes					
	Celulose	Hemiceluloses	Lignina Total	Extrativos	Cinzas	Total
Presente trabalho	$37,5 \pm 2$	$24,3 \pm 1$	$19,3 \pm 0,9$	$8,1 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,4$	$94,1 \pm 2$
Cunha, 2005	37 ± 2	30 ± 2	$22,9 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,2$	98 ± 3
Mattos, 2000	$39,2 \pm 0,9$	22 ± 1	24 ± 1	$2,8 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,1$	$95,5 \pm 4$
Silva, 1995	43 ± 1	25 ± 1	23 ± 2	$3,53 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,4$	99 ± 3
Esteves, 2011	35,7	25,9	21	-----	4,9	-----
Sun <i>et al.</i> , 2004	43,6	33,5	18,1	-----	1,6	-----
Brienzo <i>et al.</i> , 2009	42,4	25,2	19,6	-----	1,6	-----
Santos <i>et al.</i> , 2009	45	25,8	19,2	-----	1	-----

5.2 Efeito do pré-tratamento com sulfito na composição do bagaço pré-tratado

Atendendo aos objetivos deste trabalho que se inteiram no estabelecimento de uma condição ótima para o pré-tratamento de bagaço de cana com sulfito, no sentido de se obter o máximo de rendimento global em termos de açúcares fermentescíveis com o mínimo de investimento energético, estabeleceu-se testar a efetividade do sulfito neutro e sulfito alcalino na solubilização seletiva da lignina, retirada parcial das hemiceluloses e preservação da celulose. Assim, nesta fase, vai-se optar pelo processo de pré-tratamento que assegure maior seletividade para remoção de lignina e preservação dos carboidratos na fração insolúvel do pré-tratamento.

5.2.1 Pré-tratamento com sulfito neutro

Os ensaios experimentais de pré-tratamento com sulfito neutro foram realizados com o bagaço seco ao ar (8 a 12 % de umidade), assim como proveio da usina que forneceu a matéria-prima, sem demais procedimentos de redução de tamanho das partículas ou lavagem. Após cada pré-tratamento o conteúdo reacional recolhido do reator foi filtrado e lavado abundantemente gerando assim duas frações distintas: a fração insolúvel doravante designada de bagaço pré-tratado; e a fração líquida, contendo os componentes solubilizados, daqui em diante chamada por fração solubilizada. Ambas as frações foram caracterizadas quimicamente e os resultados obtidos encontram-se sumariamente apresentados na Tabela 6.

Esses dados foram utilizados para avaliar a evolução dos efeitos das variáveis temperatura e tempo de residência no reator sobre o rendimento e solubilização seletiva dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar, com influência direta na eficiência do pré-tratamento e nas etapas que se seguirão visando a produção de etanol.

Com o intuito de analisar as alterações na composição dos bagaços pré-tratados em relação ao bagaço *in natura* e estabelecer o balanço de massa, os percentuais de celulose, hemiceluloses (xilanas), lignina total e cinzas totais, obtidos em cada condição de pré-tratamento com sulfito neutro, foram corrigidos pelos respectivos rendimentos de reação e os dados estão apresentados na Tabela 7. Observando os valores totais dos componentes recuperados no bagaço pré-tratado e na fração solubilizada nota-se que o aumento da severidade das condições de pré-tratamento teve efeito direto sobre o percentual total de

componentes recuperados em relação ao bagaço *in natura*, ou seja, incremento na severidade levou ao aumento da fração perdida para compostos não identificados.

Tabela 6: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito neutro (10%) e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.

				Componentes (percentagens relativas)							
Temp. (°C)	Tempo (min)	Fração	Rend. (%)	Celulose	Hemicelulose			Lignina	Extrativos	Cinzas	Total
					Total	Acetil	Arabinosil				
Bagaço <i>in natura</i>				37,5 ± 2	24,3 ± 1	2,6 ± 0,1	2,8 ± 0,3	19,3 ± 0,9	8,1 ± 0,1	4,8 ± 0,4	94,1 ± 2
130	60	Bag. Pré-trat.	85,6	42,6 ± 0,6	27,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1	18,4 ± 0,6	n.a.	3,4 ± 0,1	92,3 ± 0,9
		Fração Solubil.		1,7	5,6	2,2	n.d.	4	n.a.	n.a.	
150	30	Bag. Pré-trat.	83,9	44,1 ± 0,7	27,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	17,7 ± 0,2	n.a.	2,8 ± 0,3	92,2 ± 0,8
		Fração Solubil.		1,5	6	2,24	0,23	3,4	n.a.	n.a.	
	60	Bag. Pré-trat.	80,3	45,7 ± 0,5	26,5 ± 0,1	1,46 ± 0,0	1,8 ± 0,1	17,6 ± 0,4	n.a.	2,3 ± 0,4	92,0 ± 0,8
		Fração Solubil.		1,4	5,7	2,5	0,2	6,4	n.a.	n.a.	
160	30	Bag. Pré-trat.	80,6	46,9 ± 0,1	26,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,1	18,8 ± 0,3	n.a.	3,0 ± 0,1	95,1 ± 0,4
		Fração Solubil.		1,4	5,9	2,5	0,2	5,8	n.a.	n.a.	
	60	Bag. Pré-trat.	71,8	50,4 ± 0,2	22,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,1 ± 0,0	17,6 ± 0,5	n.a.	2,6 ± 0,3	92,8 ± 0,6
		Fração Solubil.		1,3	6,1	2,7	0,3	8,7	n.a.	n.a.	
175	30	Bag. Pré-trat.	63,8	55,3 ± 2	16,9 ± 0,8	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	17,4 ± 0,4	n.a.	3,1 ± 0,2	92,9 ± 2
		Fração Solubil.		1,2	7,1	3,1	0,5	10,9	n.a.	n.a.	
	60	Bag. Pré-trat.	57,7	59,7 ± 1	11,8 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	18,9 ± 0,2	n.a.	3,3 ± 0,2	93,6 ± 1
		Fração Solubil.		1,2	7,2	3,3	0,2	8,6	n.a.	n.a.	

Uma análise criteriosa dos resultados mostra que a fração recuperada da celulose teve variações mínimas ao longo do espectro de variação das condições experimentais, sendo que, mesmo para a condição mais drástica, foi recuperada 91,7% da celulose no bagaço pré-tratado, o que revela a potencialidade deste tipo de pré-tratamento no âmbito do etanol celulósico. Todavia, pode-se notar que, com o aumento da severidade, diminuiu a fração de celulose recuperada em relação ao total de celulose solubilizada o que pode estar relacionado com a degradação dos açúcares solubilizados pela ação das condições mais drásticas. O mesmo fator parece estar associado à significativa redução do total de hemiceluloses (xilanas) recuperadas, verificada com o aumento da severidade. Para a condição mais drástica de pré-tratamento, foi recuperada apenas 40,7% das hemiceluloses inicialmente determinadas no bagaço *in natura*, o que indica que maior parte (59,3%) dos açúcares, solubilizados a partir desse componente estrutural do bagaço, foi degradada ou perdida para compostos não identificados. Ainda em relação às hemiceluloses, a tabela 6

mostra que os grupos acetil são os mais visados com o aumento da severidade das condições de pré-tratamento atingindo o máximo de remoção com drasticidade intermediárias. A mesma tendência foi verificada para os grupos arabinosil, contudo, ao contrário dos grupos acetil que foram recuperados na fração solubilizada como ácido acético, a grande parte da arabinose não foi recuperada, dando a entender que este açúcar foi sendo degradado e perdido para compostos não identificados. Esta desacetilação acentuada durante o pré-tratamento é de notável importância no âmbito do processo bioquímico de produção de etanol lignocelulósico, uma vez que, tem influência direta nas etapas seguintes do processo. Este facto já foi demonstrado no trabalho de Chang e Holtzapple (2000) em que observaram que à medida que se desacetila as xilanas das hemiceluloses de madeiras duras e herbáceas, a fração de celulose e hemicelulose se torna até três vezes mais hidrolisável. À mesma conclusão chegaram Chen e seus colaboradores (2012) quando constataram que a remoção dos grupos acetil das xilanas da palha de milho poderia aumentar significativamente a digestibilidade enzimática do substrato pré-tratado, e reduzir apreciavelmente a citotoxicidade do caldo de fermentação (hidrolisado enzimático).

Pelo que se pode constatar na Tabela 7, o percentual de lignina recuperada no bagaço pré-tratado também diminuiu com o aumento da severidade do pré-tratamento. Contudo, nota-se que, mesmo na condição mais severa, apenas 43,5% da lignina, encontrada no bagaço *in natura*, foi solubilizada, dos quais cerca de 43% foi recuperada na fração solubilizada, totalizando 75,1% de lignina recuperada em relação ao conteúdo inicialmente determinado no bagaço bruto. No geral, embora a quantidade de lignina recuperada na fração solubilizada tenha aumentado com o aumento da severidade, verificou-se, com essas condições, um aumento na fração de lignina perdida para compostos não identificados, atingindo o máximo de 24,9% para a condição mais severa. No contexto do bioetanol lignocelulósico, não é atrativa esta deslignificação pouco efetiva do substrato pré-tratado uma vez que a lignina é o principal contribuinte para a recalcitrância deste tipo de matéria-prima, sendo o seu principal efeito negativo atribuído à inacessibilidade das enzimas aos carboidratos, devido ao impedimento estérico (MOONEY *et al.*, 1998; MUSSATTO *et al.*, 2008), à adsorção inespecífica/improdutiva das enzima (OOSHIMA *et al.*, 1990; SEWALT *et al.*, 1997; TU *et al.*, 2009) e também aos seus derivados que são tóxicos aos microrganismos fermentativos. Assim, substratos pré-tratados contendo baixo teor de lignina devem apresentar melhor digestibilidade requerendo uma menor carga de enzima para um rendimento aceitável no processo.

Tabela 7: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito neutro. n.a. = não analisado.

T (°C)/t(min)	Componentes	Bagaço <i>in natura</i>		Proporções corrigidas pelo rendimento (%)				
Bagaço pré-tratado				Fração solubilizada	Total recuperado			
Rendimento (%)		Valor ± DP			Valor ± DP		Valor ± DP	
130/60 R = 85,6	Celulose	37,5	2	36,5	0,5	0,2	36,7	0,5
	Hemicelulose	24,3	1	23,8	0,3	0,81	24,6	0,3
	Lignina total	19,3	0,9	15,8	0,5	0,60	16,3	0,5
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	2,9	0,1	n.a.	2,9	0,1
	Total	94,1	2	79,0	0,8	1,6	80,6	0,8
150/30 R = 83,9	Celulose	37,5	2	37,0	0,6	0,2	37,2	0,6
	Hemicelulose	24,3	1	23,2	0,1	0,97	24,1	0,1
	Lignina total	19,3	0,9	14,9	0,2	0,55	15,4	0,2
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	2,3	0,3	n.a.	2,3	0,3
	Total	94,1	2	77,4	0,7	1,75	79,1	0,7
150/60 R = 80,3	Celulose	37,5	2	36,7	0,4	0,3	37,0	0,4
	Hemicelulose	24,3	1	21,3	0,1	1,1	22,4	0,1
	Lignina total	19,3	0,9	14,1	0,3	1,3	15,4	0,3
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	1,8	0,3	n.a.	1,9	0,3
	Total	94,1	2	73,9	0,6	2,7	76,5	0,6
160/30 R = 80,6	Celulose	37,5	2	37,8	0,1	0,3	38,1	0,1
	Hemicelulose	24,3	1	21,3	0,1	1,1	22,4	0,1
	Lignina total	19,3	0,9	15,2	0,2	1,3	16,5	0,2
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	2,4	0,1	n.a.	2,4	0,1
	Total	94,1	2	76,7	0,3	2,7	79,4	0,3
160/60 R = 71,8	Celulose	37,5	2	36,2	0,1	0,4	36,6	0,1
	Hemicelulose	24,3	1	16,0	0,0	1,7	17,7	0,0
	Lignina total	19,3	0,9	12,6	0,4	2,5	15,1	0,4
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	1,9	0,2	n.a.	1,9	0,2
	Total	94,1	2	66,6	0,4	4,6	71,3	0,4
175/30 R = 63,8	Celulose	37,5	2	35,3	1	0,4	35,7	1
	Hemicelulose	24,3	1	10,8	0,5	2,6	13,4	0,5
	Lignina total	19,3	0,9	11,1	0,3	4	15,1	0,3
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	2,0	0,1	n.a.	2,0	0,1
	Total	94,1	2	59,3	1	7,0	66,2	1
175/60 R = 57,7	Celulose	37,5	2	34,4	0,6	0,5	35,0	0,6
	Hemicelulose	24,3	1	6,8	0,2	3	9,9	0,2
	Lignina total	19,3	0,9	10,9	0,1	3,6	14,5	0,1
	Extrativos	8,1	0,1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
	Cinzas	4,8	0,4	1,9	0,1	n.a.	1,9	0,1
	Total	94,1	2	54,0	0,6	7,2	61,2	0,6

5.2.1.1 Rendimentos

Como se pode notar nas Tabelas 6 e 7, em geral, os rendimentos totais de recuperação decresceram com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, ou seja, com o aumento da temperatura e do tempo da reação. Nestes experimentos, o maior rendimento de recuperação do bagaço pré-tratado, em relação ao peso seco do bagaço *in natura*, foi de 85,6% e foi obtido para a condição mais suave usada no pré-tratamento com sulfito neutro. Na mesma lógica, o menor rendimento (57,7%) foi observado para o pré-tratamento na condição mais drástica empregue neste conjunto de ensaios. Os rendimentos obtidos nas diversas condições de pré-tratamento com sulfito neutro foram plotados no gráfico da Figura 10 juntamente com a fração solubilizada (calculada pela diferença de massa seca entre o bagaço *in natura* e o bagaço pré-tratado) e a fração solubilizada recuperada (somatório da lignina e dos carboidratos quantificados na fração solubilizada através do pré-tratamento). Analisando a Figura 10 pode-se notar que a fração solubilizada recuperada foi sempre menor que a fração solubilizada total em todas as condições de pré-tratamento experimentadas, sendo que a diferença entre essas duas frações tendeu a aumentar com o aumento da severidade das condições.

Figura 10: Esboço do rendimento do bagaço pré-tratado, da fração solubilizada e da fração solubilizada recuperada, relativos aos pré-tratamentos com sulfito neutro (10%).

Esta diferença, em parte, pode estar associada ao facto de não se ter analisado os compostos de degradação dos açúcares cuja formação aumenta com o aumento da severidade do pré-tratamento, sendo assim dados como compostos perdidos ou não

identificados. Não obstante, esta fração perdida tanto contribui para diminuir o rendimento do processo como também dificulta/impossibilita o aproveitamento da fração solubilizada dado a sua elevada toxicidade.

5.2.1.2 Solubilização dos componentes estruturais

Os percentuais de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento com sulfito neutro foram esboçados em gráfico e apresentados na Figura 11. Como se nota, a parcela de celulose solubilizada em todas as condições de pré-tratamento foi relativamente baixa, atingindo o máximo de 8,1% na condição mais severa. Relativamente às hemiceluloses (xilanas) e lignina, verificou-se que as suas extensões de solubilização variaram com a severidade das condições de pré-tratamento. Para as condições mais amenas houve uma seletividade para a solubilização da lignina, todavia, com o aumento da severidade das condições de pré-tratamento, acentuou-se a perda das hemiceluloses, superando a solubilização da lignina.

Figura 11: Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas nos pré-tratamentos com sulfito neutro.

Os máximos de solubilização de lignina (43,5%) e hemiceluloses (72%) foram obtidos nas condições mais severas de temperatura e tempo de reação, condições essas que também favoreceram a solubilização da celulose e possível degradação dos açúcares solubilizados, o que seria pouco interessante no que concerne a eficiência do pré-tratamento. Além dessa maior solubilização das xilanas, pelo que foi visto a respeito da fração solubilizada recuperada (Figura 10), ela foi menor em termos percentuais, provavelmente, por ter havido uma maior degradação dos açúcares solubilizados com o aumento da severidade das condições de pré-tratamento, o que poderia levar a um aumento

de compostos inibidores que poderiam atuar negativamente nas etapas subsequentes do processo de produção de etanol, bem como também, poderia inviabilizar o aproveitamento desses açúcares solubilizados no pré-tratamento.

5.2.1.3 Composição química da fração solubilizada

Na Figura 12 encontra-se esboçada a variação da composição química das frações solubilizadas através do pré-tratamento com sulfito neutro nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência. Esses traçados representam os teores glucanas (celulose) e xilanas (hemiceluloses), determinadas por cromatografia líquida, e lignina, determinada pelo método espectrofotométrico. O gráfico mostra que os teores de glucanas quantificadas na fração solubilizada para os dois tempos de residência experimentados foram muito similares e ambos tenderam a diminuir com o aumento da temperatura de pré-tratamento, ao contrário do que foi calculado com base nos rendimentos (Figura 11), em que os teores de glucanas aumentaram seguindo os aumentos de temperatura e tempo de residência. Isso corrobora a hipótese levantada de que, com o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento, parte dos açúcares solubilizados se degradaram, formando produtos que não foram analisados e quantificados neste trabalho.

Os teores de xilanas, determinadas na fração solubilizada, foram bastante similares para os dois tempos de residência experimentados neste segmento do trabalho, tendendo a aumentar ligeiramente com o aumento da temperatura do pré-tratamento. Porém, esse aumento foi consideravelmente inferior ao aumento da solubilização da hemicelulose calculado com base no rendimento do bagaço pré-tratado. Com isso resultou que, para o pré-tratamento na condição mais severa, o máximo de xilanas determinadas na fração solubilizada foi de 7,2%, bem abaixo do valor calculado que foi de 72%. Assim, de acordo com a hipótese levantada acima, uma boa parte das xiloses solubilizadas sofreu degradação e os produtos não foram identificados/quantificados na fração solubilizada.

Relativamente aos teores de lignina encontrados na fração solubilizada, constatou-se que houve um aumento acentuado dependente tanto da temperatura como também do tempo de residência da reação de pré-tratamento. Nas condições de temperaturas mais brandas o fator tempo de reação foi determinante para a uma maior solubilização da lignina enquanto em condições mais severas não se verificou uma grande influência do tempo de reação nessa solubilização, provavelmente, devido a uma maior recondensação da lignina, uma vez que nos pré-tratamentos com sulfito neutro verificou-se uma ligeira acidificação

do licor de reação durante o pré-tratamento, chegando a pH=4,7 no tratamento na condição mais severa.

Figura 12: Variação da composição química das frações solubilizadas através do pré-tratamento com sulfito neutro nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.

5.2.1.4 Composição química do bagaço pré-tratado

Os valores apresentados na Tabela 6 demonstram que as condições de pré-tratamento hidrotérmico catalisado por sulfito neutro tiveram grande influência sobre a composição química dos bagaços pré-tratados verificando-se variações consideráveis nos teores de celulose, hemicelulose (xilanas) e lignina dos bagaços pré-tratados em função das condições operacionais. O conteúdo de hemiceluloses foi o que registrou o maior decréscimo, passando de 24,3% no bagaço *in natura* para 11,8% no bagaço pré-tratado na condição mais severa. Pelo balanço de massa (Tabela 7 e Figura 13B) constata-se que, nesta condição, apenas 27,98% das xilanas quantificadas no bagaço bruto foram recuperadas no bagaço pré-tratado. Assim, apesar do teor de hemiceluloses no bagaço pré-tratado em condições menos severas ter sido maior que no bagaço *in natura* (Tabela 6 e na Figura 13A), isso meramente deve-se à retirada de outros componentes, nomeadamente, a lignina que apresentou maior seletividade para a solubilização nas condições brandas (Figura 11). Contudo, esse conteúdo de hemiceluloses no bagaço pré-tratado foi diminuindo com o aumento da temperatura e do tempo da reação, sendo que ambas as variáveis tiveram efeitos significativos sobre essa diminuição, apesar dos efeitos derivados do aumento do

tempo de residência terem sido menos acentuados que os do aumento da temperatura (Figura 13A), principalmente quando de usou condições menos severas.

Figura 13: Variação da composição química (A) e balanço de massa dos componentes estruturais (B) dos bagaços pré-tratados com sulfito neutro nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.

Com a solubilização das hemiceluloses pelo pré-tratamento e sua remoção pela lavagem com água quente, o teor de lignina aumentou ligeiramente nos bagaços pré-tratados mas diminuiu em relação ao conteúdo verificado no bagaço *in natura*, isto é, o conteúdo de lignina total recuperada passou de 19,3% no bagaço *in natura* para 17,4% e 18,9% para os pré-tratamentos a 175°C por 30 min e 60 min respectivamente. Um facto a salientar é o maior teor de lignina recuperado nos bagaços pré-tratados por 60 minutos a todas as temperaturas de operação (Tabela 6 e Figura 13A), o que pode dever-se à maior solubilização das hemiceluloses nessas condições mas também sugerindo recondensação

da lignina sobre as fibras do bagaço pré-tratado. O balanço de massas (Tabela 7 e Figura 13B) mostra que no mínimo 56,5% da lignina inicial foi recuperada no bagaço pré-tratado o que não é vantajoso no âmbito do etanol lignocelulósico uma vez que pode influir negativamente nas etapas seguintes do processo (MUSSATTO *et al.*, 2008; TU *et al.*, 2009).

Os teores percentuais de celulose também aumentaram com o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento, variando de 37,5%, no bagaço *in natura*, para o máximo de 59,7% na condição de pré-tratamento mais severa (175°C por 60 min). Conforme apontado na literatura, este enriquecimento dos bagaços pré-tratados em seus teores de celulose e lignina ocorre principalmente pela remoção das hemiceluloses, embora outros fatores tais como hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose e da lignina possam também contribuir para as alterações verificadas na composição química do bagaço pré-tratado (RODRIGUES *et al.*, 2010). Todavia, essa variação apenas revela a proporção relativa, porque, pelo balanço de massa (Figura 13B), observa-se que a celulose sofreu uma ligeira diminuição com o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento. No entanto, em comparação com resultados obtidos de substratos lignocelulósicos pré-tratados pelo processo hidrotérmico não catalisado ou catalisado por ácido diluído, o processo sulfito apresenta menor retirada de carboidratos e maior deslignificação o que pode ser explicado pela adição de sulfito que, por um lado, aumenta o pH licor e diminui a hidrólise ácida das hemiceluloses e celulose e, por outro lado, sulfona e solubiliza a lignina, aumentando assim a extensão de deslignificação (ZHANG *et al.*, 2013).

5.2.2 Pré-tratamento com Sulfito Alcalino

Preliminarmente, pretendia-se estabelecer uma comparação entre os dois processos de pré-tratamento, com sulfito neutro e sulfito alcalino, e assim eleger o que melhor atendesse o objetivo deste trabalho, isto é, obter um substrato pré-tratado com baixo teor de lignina e com os carboidratos o mais preservados possível na fração sólida. Atendendo a estes requisitos, realizou-se inicialmente, neste segmento do trabalho, o pré-tratamento com sulfito alcalino na concentração de 10% em relação à massa seca do bagaço *in natura* e observou-se, conforme mostrado na Tabela 8, uma maior efetividade deste tratamento na seletividade e extensão da deslignificação como também na preservação dos carboidratos.

Tabela 8: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 10% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.

Pré-tratamento Sulfito Alcalino 10%				Componentes (percentagens relativas)															
Temp. (°C)	Tempo (min)	Rend. (%)	Fração	Celulose	± DP	Hemicelulose						Lignina	± DP	Extrativos	± DP	Cinzas	± DP	Total	± DP
						Total	± DP	Acetil	± DP	Arabinose	± DP								
Bagaço <i>in natura</i>				37.5	2	24.3	1	2.6	0.1	2.8	0.3	19.3	0.9	8.1	0.1	4.8	0.4	94.1	2
130	30	83.6	Bag. Pré-trat.	48.4	0.2	28.2	0.2	0.55	0.7	2.63	0.05	16.2	0.2	n.a.		3.9	0.2	96.7	0.8
			Fração Solubil.	1.5		7.3		3.75		0		8.9		n.a.		n.a.		17.7	
	60	74.75	Bag. Pré-trat.	50.1	1	27.4	0.7	0.35	0.01	2.39	0.27	13.5	0.1	n.a.		2.51	0.5	93.5	1
			Fração Solubil.	1.9		7.3		3.57		0		12.5		n.a.		n.a.		21.7	
140	30	73.32	Bag. Pré-trat.	49.2	1	26.9	0.7	0.44	0.15	2.45	0.08	13.4	0.6	n.a.		3.26	0.3	92.8	1
			Fração Solubil.	1.4		7.5		3.66		0		12.4		n.a.		n.a.		21.3	
	45	71.69	Bag. Pré-trat.	51.7	0.2	28.1	0.1	0.36	0.04	2.6	0.03	12	0.1	n.a.		4.1	0.6	95.9	0.7
			Fração Solubil.	1		6.7		3.15		0.75		12.4		n.a.		n.a.		20.1	
	60	69.67	Bag. Pré-trat.	54.5	2	27.6	1	0.29	0.02	2.55	0.17	11	0.2	n.a.		3.7	0.3	96.8	2
			Fração Solubil.	1.5		7.4		3.67		0		13.5		n.a.		n.a.		22.4	
150	30	70.4	Bag. Pré-trat.	53.3	1	26.9	0.5	0.36	0.05	2.42	0.19	11.6	0.1	n.a.		3.68	0.1	95.5	1
			Fração Solubil.	1.8		7.2		3.64		0		14.3		n.a.		n.a.		23.3	
	45	66.85	Bag. Pré-trat.	55	0.5	27.5	0.2	0.32	0.09	2.42	0.03	9.5	0.3	n.a.		2.97	0.9	95.0	1
			Fração Solubil.	1.1		6.9		3.11		0.97		15.8		n.a.		n.a.		23.8	
	60	64.47	Bag. Pré-trat.	55.6	0.3	26.4	0.3	n.d.	0	2.38	0.11	9.5	0.2	n.a.		2.9	0.2	94.4	0.5
			Fração Solubil.	1.4		7.3		3.6		0		16.8		n.a.		n.a.		25.5	
160	30	64	Bag. Pré-trat.	56.8	0.3	26.2	0.3	n.d.	0	2.37	0.09	9.2	0.1	n.a.		2.95	0.2	95.2	0.5
			Fração Solubil.	2.1		7.7		3.86		0		18.4		n.a.		n.a.		28.2	
	45	58.73	Bag. Pré-trat.	58.5	0.6	27.4	0.3	0.29	0.03	2.33	0.02	7.5	0.6	n.a.		3.58	0.2	97.0	0.9
			Fração Solubil.	1.1		7.9		3.37		1.29		18.3		n.a.		n.a.		27.3	
	60	60.78	Bag. Pré-trat.	57.7	0.3	25.8	0.2	0.23	0.06	2.26	0.04	7.4	0.1	n.a.		3.96	0.3	94.9	0.5
			Fração Solubil.	1.5		7		3.61		0		19		n.a.		n.a.		27.5	

Tabela 9: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 7,5% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.

Pré-tratamento Sulfito Alcalino 7,5%				Componentes (percentagens relativas)															
Temp. (°C)	Tempo (min)	Rend. (%)	Fração	Celulose	± DP	Hemicelulose						Lignina	± DP	Extrativos	± DP	Cinzas	± DP	Total	± DP
						Total	± DP	Acetil	± DP	Arabinose	± DP								
Bagaço <i>in natura</i>				37.5	2	24.3	1	2.6	0.1	2.8	0.3	19.3	0.9	8.1	0.1	4.8	0.4	94.1	2
140	30	75.71	Bag. Pré-trat.	49.5	0.1	28.5	0.3	0.41	0.06	2.72	0.04	14.4	0.1	n.a.		3.1	0.3	95.5	0.5
			Fração Solubil.	0.9		6.1		3.08		0.31		10		n.a.		n.a.		17.0	
	45	71.91	Bag. Pré-trat.	52	0.5	27.9	0.2	0	0	2.52	0.03	12.9	0.1	n.a.		2.7	0.1	95.5	0.6
			Fração Solubil.	0.9		6.3		3.32		0.3		10.96		n.a.		n.a.		18.2	
	60	72.73	Bag. Pré-trat.	50.7	0.3	28	0.2	0.28	0.02	2.54	0.09	13.2	0.4	n.a.		3	0.3	94.9	0.6
			Fração Solubil.	0.9		6.3		3.04		0.54		11.4		n.a.		n.a.		18.6	
150	30	70.4	Bag. Pré-trat.	51.3	1	27.1	0.2	0	0	2.55	0.05	12.6	0.3	n.a.		2.89	0.2	93.9	1
			Fração Solubil.	1		7		3.31		0.69		12.9		n.a.		n.a.		20.9	
	45	67.12	Bag. Pré-trat.	54.5	0.1	28.1	0.2	0.26	0.07	2.54	0.06	11.9	0.3	n.a.		4.21	1	98.7	1
			Fração Solubil.	0.9		6.3		2.83		0.7		13.4		n.a.		n.a.		20.6	
	60	66.68	Bag. Pré-trat.	55	0.1	27.9	0.5	0	0	2.49	0.02	11.3	0.1	n.a.		4	0.1	98.2	0.5
			Fração Solubil.	1.0		7.1		3.34		0.8		14.1		n.a.		n.a.		22.2	
160	30	62.44	Bag. Pré-trat.	56.2	0.1	26.5	0.1	0	0	2.36	0.02	9.9	0.5	n.a.		3.6	0.3	96.2	0.6
			Fração Solubil.	1.0		6.7		3.07		0.82		15		n.a.		n.a.		22.7	
	45	63.86	Bag. Pré-trat.	56.3	0.2	27	0.3	0.44	0.27	2.36	0.04	9.9	0.2	n.a.		3.36	0.1	96.6	0.5
			Fração Solubil.	1.0		7.5		3.39		1.01		14.8		n.a.		n.a.		23.3	
	60	62.96	Bag. Pré-trat.	56.8	0.4	26.9	0.1	0.35	0.02	2.33	0.09	8.6	0.7	n.a.		2.79	0.3	95.1	0.9
			Fração Solubil.	0.1		0.9		0.43		0.11		15.6		n.a.		n.a.		16.6	

Tabela 10: Quadro comparativo da composição química dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino 5% e das respectivas frações solubilizadas. n.a. = não analisado; n.d. = não detetado.

Pré-tratamento Sulfito Alcalino 5%				Componentes (percentagens relativas)															
Temp. (°C)	Tempo (min)	Rend. (%)	Fração	Celulose	± DP	Hemicelulose						Lignina	± DP	Extrativos	± DP	Cinzas	± DP	Total	± DP
Bagaço <i>in natura</i>				37.5	2	24.3	1	2.6	0.1	2.8	0.3	19.3	0.9	8.1	0.1	4.8	0.4	94.1	2
140	30	75.75	Bag. Pré-trat.	49.1	0.5	27.6	0.1	0.56	0.04	2.6	0.04	14.3	0.3	n.a.		4.13	0.4	95.1	1
			Fração Solubil.	1.1		6.1		2.76		0.55		8.7		n.a.		n.a.		15.9	
	45	74.11	Bag. Pré-trat.	50.5	0.2	27.5	0.2	0.54	0.1	2.59	0.01	12.6	0.2	n.a.		3.66	1	94.3	1
			Fração Solubil.	0.9		6.6		3.17		0.66		9.1		n.a.		n.a.		16.6	
	60	72.71	Bag. Pré-trat.	49.8	0.5	27	0.2	0.46	0.03	2.66	0.11	12.5	0.5	n.a.		3.21	0.1	92.5	1
			Fração Solubil.	0.8		6.6		3.28		0.5		10.2		n.a.		n.a.		17.6	
150	30	72.4	Bag. Pré-trat.	51.7	0.1	28.3	0.1	0.67	0.04	2.59	0.05	13.2	0.3	n.a.		2.6	0.2	95.8	0.4
			Fração Solubil.	0.9		6.5		3.13		0.67		10.4		n.a.		n.a.		17.8	
	45	72.8	Bag. Pré-trat.	51.1	0.9	27	0.5	0.58	0.16	2.48	0.03	12.6	0.5	n.a.		3.61	0.4	94.3	1
			Fração Solubil.	0.8		7		3.23		0.66		10.4		n.a.		n.a.		18.2	
	60	70.47	Bag. Pré-trat.	52.3	0.7	27.4	0.2	0.34	0	2.5	0.01	12.5	0.7	n.a.		2.77	0.02	95.0	1
			Fração Solubil.	0.8		6.6		3.09		0.69		10.3		n.a.		n.a.		17.7	
160	30	69.3	Bag. Pré-trat.	54.5	0.2	27.9	0.2	0.47	0.04	2.37	0.02	11.8	0.2	n.a.		2.67	0.3	96.9	0.5
			Fração Solubil.	0.8		7.1		3.29		0.91		11.7		n.a.		n.a.		19.6	
	45	68.13	Bag. Pré-trat.	54.9	0.3	27.5	0.2	0.48	0.05	2.3	0.01	10.9	0.1	n.a.		2.66	0.3	96.0	0.5
			Fração Solubil.	0.8		6.9		3.39		0.72		12		n.a.		n.a.		19.7	
	60	65.74	Bag. Pré-trat.	54.2	0.3	26.9	0.2	0.45	0.13	2.32	0.05	10.5	0.4	n.a.		2.41	0.2	94.0	1
			Fração Solubil.	0.8		7.2		3.43		0.9		12.2		n.a.		n.a.		20.2	

Assim, elegeu-se o pré-tratamento com sulfito alcalino como o que melhor atendia os critérios estabelecidos e foi aplicado para o desenvolvimento do trabalho.

Similarmente às reações catalisadas por sulfito neutro, após cada pré-tratamento com sulfito alcalino, o conteúdo reacional recolhido do reator foi filtrado e lavado abundantemente gerando a fração insolúvel do bagaço pré-tratado e a fração solubilizada. Seguindo os mesmos procedimentos usados anteriormente para as frações do pré-tratamento com sulfito neutro, ambas as frações obtidas usando o sulfito alcalino, nas concentrações de 10%, 7,5% e 5% em relação à massa seca do bagaço *in natura*, foram caracterizadas quimicamente e os resultados obtidos encontram-se sumariamente apresentados nas Tabela 8, 9 e 10, respectivamente. Da mesma forma, os dados foram utilizados para avaliar a evolução dos efeitos das variáveis concentração de sulfito, temperatura e tempo de residência no reator sobre o rendimento e solubilização seletiva dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

As Tabelas 11, 12 e 13 apresentam o balanço de massa relativo às reações de pré-tratamento com sulfito alcalino nas diversas condições de severidade experimentadas. Os valores reportam as alterações na composição dos bagaços pré-tratados e das frações solubilizadas em relação ao bagaço *in natura*. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais, foram corrigidos pelos rendimentos de cada reação, o que permitiu calcular as parcelas dos componentes estruturais recuperadas no bagaço pré-tratado, na fração solubilizada e no total em relação ao bagaço *in natura*. Com a apreciação dos valores totais dos componentes recuperados no bagaço pré-tratado e na fração solubilizada notou-se que com o aumento da severidade do pré-tratamento houve diminuição da parcela total de componentes recuperados em relação ao bagaço *in natura*, similarmente ao que foi verificado para o pré-tratamento com sulfito neutro.

Examinado a recuperação de celulose, nas duas frações derivadas dos pré-tratamentos com sulfito alcalino nas diversas condições de severidade, é possível verificar que não ocorreram alterações significativas, sendo que houve recuperação superior a 95% do conteúdo inicial desse componente, mesmo na condição mais severa. Não obstante, a parcela de celulose determinada na fração solubilizada foi ligeiramente inferior ao total solubilizado desse componente, levando a crer que houve degradação parcial dos açúcares solubilizados nessa fração.

Tabela 11: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 10%. n.a. = não analisado.

T (°C)/t(min)		Componentes	Bagaço <i>in natura</i>		Proporções corrigidas pelo rendimento (%)				
					Bagaço pré-tratado		Fração solubilizada	Total recuperado	
Rendimento (%)			Valor ± DP		Valor ± DP			Valor ± DP	
130/30 R = 83.6		Celulose	37.5	2	40.5	0.2	0.2	40.7	0.2
		Xilanas	24.3	1	23.6	0.2	1.2	24.8	0.2
		Lignina	19.3	0.9	13.5	0.2	1.5	15.0	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	3.3	0.2	n.a.	3.3	0.2
		Total	94.1	2	80.8	0.3	2.9	83.7	0.3
130/60 R = 74.75		Celulose	37.5	2	37.4	0.7	0.5	37.9	0.7
		Xilanas	24.3	1	20.5	0.5	1.8	22.3	0.5
		Lignina	19.3	0.9	10.1	0.1	3.2	13.2	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.4	n.a.	1.9	0.4
		Total	94.1	2	69.9	1.0	5.5	75.4	1.0
140/30 R = 73.32		Celulose	37.5	2	36.1	0.7	0.4	36.4	0.7
		Xilanas	24.3	1	19.7	0.5	2.0	21.7	0.5
		Lignina	19.3	0.9	9.8	0.4	3.3	13.1	0.4
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.4	0.2	n.a.	2.4	0.2
		Total	94.1	2	68.0	1.0	5.7	73.7	1.0
140/45 R = 71.69		Celulose	37.5	2	37.1	0.1	0.3	37.3	0.1
		Xilanas	24.3	1	20.1	0.1	1.9	22.0	0.1
		Lignina	19.3	0.9	8.6	0.1	3.5	12.1	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.9	0.4	n.a.	2.9	0.4
		Total	94.1	2	68.8	0.5	5.7	74.4	0.5
140/60 R = 69.67		Celulose	37.5	2.0	38.0	1	0.5	38.4	1
		Xilanas	24.3	1.0	19.2	0.7	2.2	21.5	0.7
		Lignina	19.3	0.9	7.7	0.1	4.1	11.8	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.6	0.2	n.a.	2.6	0.2
		Total	94.1	2.0	67.4	2	6.8	74.2	2
150/30 R = 70.4		Celulose	37.5	2	37.5	0.7	0.5	38.1	0.7
		Xilanas	24.3	1	18.9	0.4	2.1	21.1	0.4
		Lignina	19.3	0.9	8.2	0.1	4.2	12.4	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.6	0.1	n.a.	2.6	0.1
		Total	94.1	2	67.2	0.8	6.9	74.1	0.8
150/45 R = 66.85		Celulose	37.5	2	36.8	0.3	0.4	37.1	0.3
		Xilanas	24.3	1	18.4	0.1	2.3	20.7	0.1
		Lignina	19.3	0.9	6.4	0.2	5.2	11.6	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.0	0.6	n.a.	2.0	0.6
		Total	94.1	2	63.5	0.7	7.9	71.4	0.7
150/60 R = 64.47		Celulose	37.5	2	35.8	0.2	0.5	36.3	0.2
		Xilanas	24.3	1	17.0	0.2	2.6	19.6	0.2
		Lignina	19.3	0.9	6.1	0.1	6.0	12.1	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.1	n.a.	1.9	0.1
		Total	94.1	2	60.9	0.3	9.1	69.9	0.3
160/30 R = 64		Celulose	37.5	2	36.4	0.2	0.8	37.1	0.2
		Xilanas	24.3	1	16.8	0.2	2.8	19.5	0.2
		Lignina	19.3	0.9	5.9	0.1	6.6	12.5	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.1	n.a.	1.9	0.1
		Total	94.1	2	60.9	0.3	10.2	71.0	0.3
160/45 R = 58.73		Celulose	37.5	2	34.4	0.4	0.5	34.8	0.4
		Xilanas	24.3	1	16.1	0.2	3.3	19.4	0.2
		Lignina	19.3	0.9	4.4	0.4	7.6	12.0	0.4
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.1	0.1	n.a.	2.1	0.1
		Total	94.1	2	57.0	0.5	11.3	68.2	0.5
160/60 R = 60.78		Celulose	37.5	2	35.1	0.2	0.6	35.7	0.2
		Xilanas	24.3	1	15.7	0.1	2.7	18.4	0.1
		Lignina	19.3	0.9	4.5	0.1	7.5	11.9	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.4	0.2	n.a.	2.4	0.2
		Total	94.1	2	57.7	0.3	10.8	68.4	0.3

Tabela 12: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 7,5%. n.a. = não analisado.

T (°C)/t(min)		Componentes	Bagaço <i>in natura</i>		Proporções corrigidas pelo rendimento (%)				
					Bagaço pré-tratado		Fração solubilizada	Total recuperado	
Rendimento (%)			Valor ± DP	Valor ± DP				Valor ± DP	
140/30		Celulose	37.5	2	37.5	0.1	0.2	37.7	0.1
		Xilanas	24.3	1	21.6	0.2	1.5	23.1	0.2
R =	75.71	Lignina	19.3	0.9	10.9	0.1	2.4	13.3	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.3	0.2	n.a.	2.3	0.2
		Total	94.1	2	72.3	0.3	4.1	76.4	0.3
140/45		Celulose	37.5	2	37.4	0.4	0.3	37.6	0.4
		Xilanas	24.3	1	20.1	0.1	1.8	21.8	0.1
R =	71.91	Lignina	19.3	0.9	9.3	0.1	3.1	12.4	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.1	n.a.	1.9	0.1
		Total	94.1	2	68.7	0.4	5.1	73.8	0.4
140/60		Celulose	37.5	2.0	36.9	0.2	0.2	37.1	0
		Xilanas	24.3	1.0	20.4	0.1	1.7	22.1	0.1
R =	72.73	Lignina	19.3	0.9	9.6	0.3	3.1	12.7	0.3
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.2	0.2	n.a.	2.2	0.2
		Total	94.1	2.0	69.0	0.4	5.1	74.1	0.4
150/30		Celulose	37.5	2	36.1	0.7	0.3	36.4	0.7
		Xilanas	24.3	1	19.1	0.1	2.1	21.2	0.1
R =	70.4	Lignina	19.3	0.9	8.9	0.2	3.8	12.7	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.0	0.1	n.a.	2.0	0.1
		Total	94.1	2	66.1	0.8	6.2	72.3	0.8
150/45		Celulose	37.5	2	36.6	0.1	0.3	36.9	0.1
		Xilanas	24.3	1	18.9	0.1	2.1	20.9	0.1
R =	67.12	Lignina	19.3	0.9	8.0	0.2	4.4	12.4	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.8	0.7	n.a.	2.8	0.7
		Total	94.1	2	66.3	0.7	6.8	73.0	0.7
150/60		Celulose	37.5	2	36.7	0.1	0.3	37.0	0.1
		Xilanas	24.3	1	18.6	0.3	2.4	21.0	0.3
R =	66.68	Lignina	19.3	0.9	7.5	0.1	4.7	12.2	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.7	0.1	n.a.	2.7	0.1
		Total	94.1	2	65.5	0.4	7.4	72.9	0.4
160/30		Celulose	37.5	2	35.1	0.1	0.4	35.5	0.1
		Xilanas	24.3	1	16.5	0.1	2.5	19.1	0.1
R =	62.44	Lignina	19.3	0.9	6.2	0.3	5.6	11.8	0.3
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.2	0.2	n.a.	2.2	0.2
		Total	94.1	2	60.1	0.4	8.5	68.6	0.4
160/45		Celulose	37.5	2	36.0	0.1	0.4	36.3	0.1
		Xilanas	24.3	1	17.2	0.2	2.7	20.0	0.2
R =	63.86	Lignina	19.3	0.9	6.3	0.1	5.3	11.7	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.1	0.1	n.a.	2.1	0.1
		Total	94.1	2	61.7	0.3	8.4	70.1	0.3
160/60		Celulose	37.5	2	35.8	0.3	0.04	35.8	0.3
		Xilanas	24.3	1	16.9	0.1	0.3	17.3	0.1
R =	62.96	Lignina	19.3	0.9	5.4	0.4	5.8	11.2	0.4
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.8	0.2	n.a.	1.8	0.2
		Total	94.1	2	59.9	0.5	6.1	66.0	0.5

Tabela 13: Balanço de massa dos ensaios de pré-tratamento com sulfito alcalino 5%. n.a. = não analisado.

T (°C)/t(min)		Componentes	Bagaço <i>in natura</i>		Proporções corrigidas pelo rendimento (%)				
					Bagaço pré-tratado		Fração solubilizada	Total recuperado	
Rendimento (%)			Valor ± DP		Valor ± DP			Valor ± DP	
140/30		Celulose	37.5	2	37.2	0.4	0.3	37.5	0.4
		Xilanas	24.3	1	20.9	0.1	1.5	22.4	0.1
R = 75.75		Lignina	19.3	0.9	10.8	0.2	2.1	12.9	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	3.1	0.3	n.a.	3.1	0.3
		Total	94.1	2	72.1	0.5	3.9	75.9	0.5
140/45		Celulose	37.5	2	37.4	0.1	0.2	37.7	0.1
		Xilanas	24.3	1	20.4	0.1	1.7	22.1	0.1
R = 74.11		Lignina	19.3	0.9	9.3	0.1	2.4	11.7	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.7	0.7	n.a.	2.7	0.7
		Total	94.1	2	69.9	0.8	4.3	74.2	0.8
140/60		Celulose	37.5	2.0	36.2	0.4	0.2	36.4	0.4
		Xilanas	24.3	1.0	19.6	0.1	1.8	21.4	0.1
R = 72.71		Lignina	19.3	0.9	9.1	0.4	2.8	11.9	0.4
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.3	0.1	n.a.	2.3	0.1
		Total	94.1	2.0	67.3	0.5	4.8	72.1	0.5
150/30		Celulose	37.5	2	37.4	0.1	0.2	37.7	0.1
		Xilanas	24.3	1	20.5	0.1	1.8	22.3	0.1
R = 72.4		Lignina	19.3	0.9	9.6	0.2	2.9	12.4	0.2
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.1	n.a.	1.9	0.1
		Total	94.1	2	69.4	0.3	4.9	74.3	0.3
150/45		Celulose	37.5	2	37.2	0.7	0.2	37.4	0.7
		Xilanas	24.3	1	19.7	0.4	1.9	21.6	0.4
R = 72.8		Lignina	19.3	0.9	9.2	0.4	2.8	12.0	0.4
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.6	0.3	n.a.	2.6	0.3
		Total	94.1	2	68.7	0.9	5.0	73.6	0.9
150/60		Celulose	37.5	2	36.9	0.5	0.2	37.1	0.5
		Xilanas	24.3	1	19.3	0.1	1.9	21.3	0.1
R = 70.47		Lignina	19.3	0.9	8.8	0.5	3.0	11.9	0.5
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	2.0	0.01	n.a.	2.0	0.0
		Total	94.1	2	66.9	0.7	5.2	72.2	0.7
160/30		Celulose	37.5	2	37.8	0.1	0.2	38.0	0.1
		Xilanas	24.3	1	19.3	0.1	2.2	21.5	0.1
R = 69.3		Lignina	19.3	0.9	8.2	0.1	3.6	11.8	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.9	0.2	n.a.	1.9	0.2
		Total	94.1	2	67.1	0.3	6.0	73.1	0.3
160/45		Celulose	37.5	2	37.4	0.2	0.3	37.7	0.2
		Xilanas	24.3	1	18.7	0.1	2.2	20.9	0.1
R = 68.13		Lignina	19.3	0.9	7.4	0.1	3.8	11.3	0.1
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.8	0.2	n.a.	1.8	0.2
		Total	94.1	2	65.4	0.3	6.3	71.7	0.3
160/60		Celulose	37.5	2	35.6	0.2	0.3	35.9	0.2
		Xilanas	24.3	1	17.7	0.1	2.5	20.2	0.1
R = 65.74		Lignina	19.3	0.9	6.9	0.3	4.2	11.1	0.3
		Extrativos	8.1	0.1	n.a.	---	n.a.	n.a.	---
		Cinzas	4.8	0.4	1.6	0.1	n.a.	1.6	0.1
		Total	94.1	2	61.8	0.4	6.9	68.7	0.4

Averiguando os dados de recuperação das hemiceluloses (Tabela 11, 12 e 13), constata-se que, para todas as condições de severidade experimentadas, a maior parte desse componente foi recuperada no bagaço pré-tratado. Isso indica que, apesar de ter havido um ligeiro aumento da solubilização das hemiceluloses com o aumento da severidade do pré-tratamento com sulfito alcalino, ocorreu uma significativa preservação desse componente em comparação com o obtido no pré-tratamento com sulfito neutro. Usando o pré-tratamento com sulfito alcalino na condição mais severa experimentada, foi solubilizada apenas 35,4% do total de hemiceluloses determinadas no bagaço *in natura*, dos quais 31,4% foi recuperada na fração solubilizada. Assim, totalizando as parcelas de hemiceluloses recuperadas nas duas frações resultantes da reação na condição mais severa, recuperou-se 75,7% do total de hemiceluloses em relação à parcela desse componente no bagaço bruto. Como pode ser confirmado nas Tabelas 8, 9 e 10, é de se salientar que uma boa parte das perdas de xilanas diz respeito a perdas dos grupos acetil e arabinosil, pelo que, o impacto sobre o rendimento das xilanas propriamente dito não foi muito substancial.

Relativamente à lignina, verificou-se que o seu percentual recuperado no bagaço pré-tratado teve uma diminuição muito marcante com o pré-tratamento com sulfito alcalino e com o aumento da severidade, sendo que, concomitantemente, constatou-se um aumento da lignina recuperada na fração solubilizada. Todavia, o total de lignina recuperada nos bagaços pré-tratados e nas frações solubilizadas tendeu a diminuir com o aumento da severidade, dando a entender que parte da lignina foi sendo perdida para compostos não identificados. É de se notar que no pré-tratamento com sulfito alcalino foi conseguida uma solubilização máxima de lignina de 76,7%, na condição mais severa. Essa solubilização foi bastante seletiva também para as outras condições de severidade, resultando em bagaço pré-tratados enriquecidos em carboidratos, o que é precisamente o objetivo de qualquer pré-tratamento visando a hidrólise enzimática e fermentação alcoólica para produção de etanol.

5.2.2.1 Rendimentos

Os rendimentos obtidos nas diversas condições de pré-tratamento com sulfito alcalino foram apresentados nos gráficos da Figura 14 juntamente com a fração solubilizada (calculada pela diferença de massa seca entre o bagaço *in natura* e o bagaço pré-tratado) e a fração solubilizada recuperada (somatório da lignina e dos carboidratos quantificados na fração solubilizada através do pré-tratamento).

Figura 14: Esboço do rendimento do bagaço pré-tratado, da fração solubilizada e da fração solubilizada recuperada, relativos aos pré-tratamentos com sulfito alcalino nas concentrações de 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C).

Analisando os gráficos, nota-se que os rendimentos do bagaço pré-tratado decresceram com o aumento da temperatura e do tempo da reação nos ensaios realizados com as três concentrações de sulfito, comportamento esse que era esperado dado que o aumento da severidade nas condições do pré-tratamento tende a aumentar a solubilização dos componentes mais suscetíveis à hidrólise. Similarmente ao que aconteceu no pré-tratamento catalisado com sulfito neutro, a fração solubilizada recuperada foi menor que a fração solubilizada total na maioria das condições de pré-tratamento com sulfito alcalino, porém, a diferença entre as duas frações foi menos acentuada. Com isso, pode-se dizer que o pré-tratamento com sulfito alcalino permitiu uma melhor preservação dos componentes solubilizados. Contudo, como está mostrado no Figura 15, com o aumento da severidade, aumentou também a parcela dos produtos solubilizados que se perderam para compostos não identificados. Em parte, esses compostos solubilizados e não identificados podem ser também atribuídos aos extrativos que foram solubilizados no processo de pré-tratamento hidrotérmico e às reações de transformação dos açúcares.

Figura 15: Percentual da fração solubilizada, nos pré-tratamentos com sulfito alcalino (SA) a 10%, 7,5% e 5%, perdida para compostos não identificados.

5.2.2.2 Solubilização dos componentes estruturais

Nos gráficos da Figura 16 foram apresentados os percentuais de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina através do pré-tratamento com sulfito alcalino, calculados com base nos rendimentos e nos seus respectivos teores determinados no bagaço *in natura* e no bagaço pré-tratado. Como se pode observar, a fração de celulose solubilizada foi

relativamente baixa para todas as condições de temperatura e tempo de residência experimentadas, com o máximo de solubilização (8,4%) obtido numa das condições mais severas. Este valor máximo de solubilização da celulose obtido na condição de 160°C, 45 min e 10% de sulfito alcalino foi ligeiramente maior que o máximo obtido no tratamento com sulfito neutro 10% na temperatura de 175°C por 60 min. Esta maior solubilização da celulose no pré-tratamento com sulfito alcalino pode ser explicada pela ocorrência de hidrólise alcalina e reações de “peeling” nestas condições mais drásticas (KNILL *et* KENNEDY, 2003). Atendendo ao objetivo deste trabalho, tais condições, embora possam diminuir o grau de polimerização dos polissacarídeos e a cristalinidade da celulose no bagaço pré-tratado, o que poderia ser vantajoso para a sacarificação, podem influir negativamente no rendimento global de açúcares fermentescível, além de que, os açúcares solubilizados no pré-tratamento sofrem degradação o que dificulta o aproveitamento dessa fração, além de aumentar a sua toxicidade.

Já no que concerne à solubilização das hemiceluloses e da lignina por este pré-tratamento, obteve-se um aumento do percentual de solubilização que acompanhou tanto o aumento da temperatura como também o aumento do tempo de reação, nas três concentrações de sulfito. Todavia, houve uma significativa seletividade para a solubilização da lignina, tendo sido o seu percentual de solubilização superior ao dobro do das hemiceluloses em todas as condições de pré-tratamento experimentadas (Figura 16). Os máximos de solubilização de lignina (77,2%) e hemiceluloses (35,5%) foram obtidos nas condições mais severas, maior concentração de sulfito, temperatura mais elevada e tempos de reação mais longos, condições que também favoreceram levemente a solubilização da celulose, que é precisamente o componente que mais se quer preservar visando a sacarificação e produção de etanol.

Figura 16: Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através dos pré-tratamentos com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C).

5.2.2.3 Composição química da fração solubilizada

A composição das frações solubilizadas através dos pré-tratamentos com sulfito alcalino foi determinada e os resultados, mostrados nas Tabelas 8, 9 e 10. Pelo que se pode observar, os teores de celulose e hemiceluloses, quantificadas nas frações solubilizadas em todas as condições experimentadas no pré-tratamento com sulfito alcalino, permaneceram relativamente constantes, o que diverge um pouco dos valores calculados com base nos rendimentos e teores percentuais desses componentes determinados no bagaço *in natura* e no bagaço pré-tratado. Conforme visto na secção 5.2.2.2, os resultados calculados mostraram um ligeiro aumento na solubilização da fração de hemiceluloses por influência da temperatura e também do tempo de reação. Com isso, pode-se considerar que, embora em menor extensão do que a verificada para os pré-tratamentos com sulfito neutro, o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento com sulfito alcalino também contribui para a degradação de parte dos açúcares solubilizados, levando à formação de subprodutos que não foram analisados e quantificados neste trabalho. Relativamente ao teor da lignina quantificada nas frações solubilizadas, obteve-se um aumento acentuado acompanhando o aumento da temperatura e do tempo de residência do pré-tratamento. Contudo, a temperatura da reação se mostrou mais determinante para o teor de lignina na fração solubilizada. Esta tendência se observa principalmente se considerarmos as condições mais severas, em que o aumento do tempo de reação não levou a um aumento significativo na parcela de lignina solubilizada.

5.2.2.4 Composição química do bagaço pré-tratado

Os gráficos da Figura 17 mostram o balanço de massa dos componentes estruturais (celulose, hemiceluloses (xilanas) e lignina) dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino nas diferentes condições de temperatura, tempo de reação e concentração de sulfito. Pelo que se observa, pequenas perdas de massa ocorreram no componente celulose em relação ao seu conteúdo inicial no bagaço *in natura*, sendo que, pelo menos, 91,93% deste componente foi recuperado no bagaço pré-tratado na condição que conduziu ao menor rendimento. Esta baixa perda de celulose com o aumento da severidade das condições operacionais explica o enriquecimento no teor de celulose nos bagaços pré-tratados constatado pelos dados apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10.

Figura 17: Balanço de massa dos componentes estruturais dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diferentes condições de temperatura e tempo de residência.

Conquanto, este enriquecimento não só se deveu à baixa solubilização verificada para esse componente, mas principalmente ao facto de os percentuais de lignina e hemiceluloses terem sofrido diminuição significativa quando se aumentou a severidade das condições operacionais, o que, aliás, já foi mostrado através das frações solubilizadas mostradas na secção 5.2.2.2.

No que se refere às xilanas, pela Figura 17, percebe-se que na sua grande maioria foi recuperada nos bagaços pré-tratados, isto é, pelo menos 64,5% do conteúdo deste componente presente no bagaço bruto foi recuperado na fração sólida do pré-tratamento. Apreciação dos gráficos da Figura 17 mostra ainda que, em conformidade com os resultados calculados ou determinados nas frações solubilizadas, a lignina é o componente que teve maior perda percentual nos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino em todas as condições experimentadas, chegando a um valor residual mínimo no bagaço pré-tratado de 22,8% do conteúdo deste componente determinado no bagaço *in natura*.

Em suma, pode-se considerar que o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito alcalino apresentou uma ótima seletividade e efetividade, uma vez que, conduziu à uma extensa deslignificação ao mesmo tempo que promoveu a preservação dos carboidratos no bagaço pré-tratado, o que é a condição desejável para sacarificação enzimática e fermentação alcoólica dado que permite obter um hidrolisado com alto rendimento em açúcares fermentescíveis e praticamente livre de compostos tóxicos para os microrganismos fermentativos.

5.3 Efeito do pré-tratamento com sulfito na digestibilidade do bagaço pré-tratado

Conforme apresentado e discutido nas seções anteriores, as diversas condições empregadas nos pré-tratamentos conduziram a amostras de bagaço pré-tratado com teores de componentes estruturais (celulose, xilanas e lignina) muito variadas (Tabelas 8, 9 e 10). A fim de avaliar o efeito destas condições de pré-tratamento sobre a digestibilidade dos bagaços pré-tratados, amostras destes materiais foram submetidas à hidrólise enzimática na consistência de sólidos de 5% (m/v), empregando-se 10 UPF de celulasas (Celluclast1.5L) e 10 UCB de β -glucosidase (Novozym188) por grama de bagaço pré-tratado, estando os resultados da cinética de hidrólise apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16.

5.3.1 Cinética de hidrólise

Em concordância com o que se observa nas Tabelas 14, 15 e 16 e nos gráficos da Figura 18, a conversão enzimática da celulose das amostras de bagaço pré-tratado variou consoante as condições empregadas no pré-tratamento, evidenciando que esta etapa prévia à sacarificação é de suma importância para um rendimento satisfatório em termos de açúcares fermentescíveis, isto porque, esta etapa é responsável por modificar as características estruturais do material pré-tratado, aumentando significativamente a sua digestibilidade enzimática (MOSIER *et al.*, 2005b; ALVIRA *et al.*, 2010). Nas seções anteriores foi mostrado que o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento conduziu a uma extensa deslignificação e isto é considerado um dos mais relevantes princípios para a maximização da digestibilidade enzimática de materiais lignocelulósicos (MUSSATTO *et al.*, 2008; TU *et al.*, 2009). No entanto, a severidade adequada para o melhor pré-tratamento necessita ser contido dentro de certos limites, na medida em que, é essencial uma combinação de fatores que simultaneamente potencia a digestibilidade do substrato pré-tratado e garanta o maior rendimento global em açúcares fermentescíveis livres de inibidores com o mínimo de investimento energético (MOOD *et al.*, 2013).

Os rendimentos de sacarificação enzimática da celulose, em 72h, obtidos no presente estudo, variaram de 51,43% [5% sulfito alcalino (SA), 140°C, 30 min] para o máximo de 79,91% [10% SA, 160°C, 45 min]. Estes valores estão muito próximos aos obtidos por Mendes *et al.* (2011) em que, usando consistência de sólidos de 2% e dosagem enzimática idêntica à aqui usada, obtiveram rendimentos de sacarificação entre 50% e 85% em 96h de hidrólise, usando bagaço pré-tratado com sulfito alcalino e refinado.

Na literatura recente, é comum encontrar trabalhos que tenham usado o pré-tratamento com sulfito em diversas modalidades e usando diversas matérias-primas lignocelulósicas, chegando contudo, em máximos de sacarificação idênticos ao que foi obtido neste trabalho que visava não apenas maximizar a sacarificação enzimática mas também otimizar o rendimento global dos carboidratos com o mínimo de investimento energético na etapa de pré-tratamento.

Tabela 14: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 10% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.

Condições pré-tratamento			Cinética da Hidrólise Enzimática a 45°C (% hidrólise)													
Sulfito Alcalino 10%			Celulose							Xilanas						
T (°C)	t (min)		0	2	4	8	24	48	72	0	2	4	8	24	48	72
130	30	Valor	0	7.67	19.92	32.60	41.61	49.89	53.45	0	5.46	13.74	23.71	33.90	42.49	46.82
		± DP	0	0.42	1.85	0.26	0.28	1.09	0.63	0	0.82	0.77	0.35	0.48	0.38	0.22
130	60	Valor	0	7.51	18.48	31.13	49.68	54.48	64.32	0	5.35	14.58	25.17	42.77	49.30	58.63
		± DP	0	0.24	0.75	0.09	0.24	0.78	1.61	0	0.29	0.55	0.37	0.02	0.78	1.55
140	30	Valor	0	7.74	21.29	31.47	47.91	59.05	64.68	0	5.38	15.91	24.63	40.25	51.89	58.18
		± DP	0	0.1	0.6	1.9	1.9	3.1	4.4	0	0.0	0.1	1.2	1.9	1.4	4.2
140	45	Valor	0	7.71	19.53	33.54	48.15	56.94	66.18	0	5.49	14.59	26.69	39.68	49.22	58.53
		± DP	0	0.2	1.7	1.0	0.7	2.2	0.4	0	0.1	1.1	1.6	1.1	2	0.9
140	60	Valor	0	6.25	17.64	27.39	46.96	56.52	70.86	0	4.68	14.40	23.79	43.55	52.72	63.65
		± DP	0	0.5	0.8	2.1	3.6	3.0	2.7	0	0.4	0.8	1.2	5.6	3.4	9.1
150	30	Valor	0	7.76	20.72	30.64	53.90	63.30	72.03	0	5.34	16.31	25.69	47.45	57.77	66.48
		± DP	0	0.0	1.1	0.2	0.4	1.2	0.8	0	0.1	0.5	0.0	0.6	0	0.3
150	45	Valor	0	7.54	19.84	31.55	53.47	67.69	78.37	0	5.27	15.42	27.04	46.16	59.26	69.91
		± DP	0	0.6	0.7	1.1	4.4	0.8	4.5	0	0.3	0.7	1.5	3.9	0.0	3.9
150	60	Valor	0	15.79	22.56	31.80	56.06	69.21	73.76	0	11.76	19.65	28.21	48.62	60.68	66.10
		± DP	0	1.1	3.4	3.3	5.2	1.3	5.1	0	0.9	3.2	3.5	5.0	0.1	5.1
160	30	Valor	0	12.60	21.50	31.31	54.74	68.45	74.19	0	10.36	19.61	28.16	47.73	59.96	66.64
		± DP	0	0.7	1.3	0.4	1.8	1.5	0.8	0	0.4	1.1	0.3	1.3	1.0	0.7
160	45	Valor	0	13.59	22.94	35.68	56.26	73.93	79.91	0	11.42	20.34	31.92	46.86	62.27	70.69
		± DP	0	3.4	2.5	1.6	1.8	3.4	1.6	0	2.7	1.9	2.7	1.7	3.8	2.6
160	60	Valor	0	15.47	21.83	32.23	54.14	69.39	75.59	0	13.42	21.19	30.73	48.56	62.40	68.93
		± DP	0	0.9	0.8	0.1	2.4	0.3	0.3	0	0.7	0.6	0.4	2.8	0.7	0.0

Tabela 15: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 7,5% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.

Condições pré-tratamento			Cinética da Hidrólise Enzimática a 45°C (% hidrólise)													
Sulfito Alcalino 7,5%			Celulose							Xilanas						
T (°C)	t (min)		0	2	4	8	24	48	72	0	2	4	8	24	48	72
140	30		0	15.83	19.64	29.35	43.83	51.68	52.74	0	10.20	14.52	22.51	35.42	42.94	45.67
		± DP	0	1.1	0.4	0.8	0.9	1.5	2.9	0	0.8	0.0	0.1	0.4	0.9	0.9
140	45		0	15.84	22.29	30.49	47.23	56.70	61.45	0	10.62	16.82	23.69	38.36	47.84	53.57
		± DP	0	0.8	0.5	3.7	4.7	0.2	3.3	0	0.6	0.3	2.6	3.8	0	2.5
140	60		0	15.42	19.44	27.22	43.90	54.78	57.62	0	9.39	14.08	21.28	35.64	46.06	49.79
		± DP	0	0.9	2.3	1.0	1.0	0.4	1.0	0	0.5	1.3	0.2	1.2	1.3	1.4
150	30		0	14.29	20.38	28.35	45.69	59.72	61.08	0	8.76	14.93	22.48	37.60	51.93	54.92
		± DP	0	0.1	0.6	2.3	0.3	3.8	3.6	0	0.1	0.3	1.8	0.3	3	3.0
150	45		0	12.72	18.23	26.36	43.92	55.90	61.08	0	7.08	12.68	21.02	36.53	49.14	55.44
		± DP	0	0.8	1.0	3.1	1.5	2.1	1.7	0	0.3	1.0	2.0	1.6	1.1	2.0
150	60		0	15.30	20.86	28.22	46.15	57.82	63.67	0	10.21	16.13	22.63	38.28	50.56	57.57
		± DP	0	1.0	0.6	1.6	0.4	0.1	2.9	0	0.7	0.3	1.2	0.4	0.2	2.2
160	30		0	13.46	18.70	29.00	47.95	57.58	67.70	0	9.72	15.38	24.32	38.84	51.79	62.18
		± DP	0	0.2	0.2	0.6	1.6	6.1	1.2	0	0.1	0.2	0.2	3.5	5.4	0.7
160	45		0	13.33	18.78	28.11	46.59	61.34	76.84	0	7.99	13.83	23.06	39.51	54.14	69.86
		± DP	0	0.3	0.4	1.2	2.9	9.6	1.4	0	0.3	0.4	0.8	1.8	7.9	1.7
160	60		0	12.02	17.11	26.68	47.87	60.07	68.40	0	7.78	13.53	23.27	42.00	54.53	63.52
		± DP	0	0.1	0.3	0.9	0.2	5.1	5.2	0	0.1	0.2	0.6	0.2	4.3	4.4

Tabela 16: Cinética de conversão de celulose e xilanas por hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino 5% nas diversas condições de temperatura e tempo de reação.

Condições pré-tratamento			Cinética da Hidrólise Enzimática a 45°C (% hidrólise)													
Sulfito Alcalino 5%			Celulose							Xilanas						
T (°C)	t (min)		0	2	4	8	24	48	72	0	2	4	8	24	48	72
140	30		0	14.48	19.07	24.18	38.44	45.40	51.43	0	8.14	12.45	17.37	30.45	38.87	45.39
		± DP	0	0.9	0.4	2.0	1.5	1.0	3.9	0	0.5	0.4	1.0	0.4	1.6	3.9
140	45		0	13.72	20.57	27.61	39.95	50.19	51.51	0	8.20	14.62	21.68	33.74	44.47	47.04
		± DP	0	1.2	0.1	1.4	2.3	3.4	1.8	0	0.9	0.1	1.0	2.1	3	1.8
140	60		0	15.32	19.33	26.64	44.35	52.24	55.77	0	9.29	14.02	21.03	37.68	46.72	51.30
		± DP	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
150	30		0	14.81	21.38	28.65	38.51	48.68	54.11	0	8.45	14.81	21.90	31.91	42.17	48.11
		± DP	0	0.5	0.8	1.7	1.2	3.1	0.2	0	0.2	0.7	1.3	0.7	3	0.2
150	45		0	15.17	21.66	27.03	38.38	51.59	62.79	0	8.26	14.66	20.51	31.77	44.62	55.63
		± DP	0	0.1	0.4	0.6	0.5	1.6	4.5	0	0.0	0.3	0.3	0.5	1.4	4.0
150	60		0	13.79	19.31	26.41	38.82	46.38	65.50	0	7.30	13.31	21.31	34.00	42.50	61.48
		± DP	0	0.1	0.3	0.8	0.4	2.6	2.9	0	0.2	0.6	0.6	0.3	2.3	2.0
160	30		0	13.50	17.49	26.65	35.41	48.05	57.19	0	7.29	11.99	21.57	30.74	43.07	53.31
		± DP	0	0.5	0.3	2.3	1.3	0.1	2.5	0	0.5	0.5	2.0	1.4	0.6	1.2
160	45		0	12.24	17.69	24.83	37.59	45.33	52.30	0	6.42	12.07	20.55	33.34	41.71	49.13
		± DP	0	0.2	0.3	0.2	1.3	2.5	1.1	0	0.3	0.1	0.0	1.1	2.2	0.7
160	60		0	13.64	19.89	25.44	40.48	47.02	54.40	0	7.25	13.55	20.70	35.22	42.69	50.63
		± DP	0	0.4	0.1	0.4	1.6	3.1	1.6	0	0.4	0.5	0.7	1.0	2.5	1.7

Zhu *et al.* (2009) introduziram um novo conceito de pré-tratamento com sulfito que designaram por SPORL (sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose - pré-tratamento com sulfito para superar a recalcitrante de materiais lignocelulósicos) e que tem sido aplicado a diversas matérias-primas. Estes autores aplicaram o SPORL para pré-tratar madeiras moles e obtiveram hidrólises enzimáticas de mais de 90% da celulose do material pré-tratado. O mesmo pré-tratamento foi usado por Wang *et al.* (2009) para tratar madeira dura e, da mesma forma, relataram hidrólise da celulose acima de 90% do teórico. Uma gramínea (*switchgrass*) também foi pré-tratada por meio deste método, por Zhang *et al.* (2013), e 83% da celulose contida no material pré-tratado foi hidrolisada em 48 horas. Apesar destes resultados de sacarificação notoriamente altos, há que considerar o investimento energético no processo e o rendimento global em açúcares fermentescíveis, incluindo as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Assim, se considerarmos que o SPORL é um método ácido ($\text{pH} \approx 1,9$ a $4,5$) que funciona a 180°C por 30 min, a severidade é substancialmente maior do que todas as usadas neste trabalho o que se traduz num maior investimento energético. Por outro lado, sendo o SPORL um processo ácido e severo, uma grande parte das hemiceluloses, e uma fração da celulose, é solubilizada no licor de pré-tratamento tornado a sua recuperação custosa e de baixo aproveitamento dado a toxicidade dessa fração do pré-tratamento. Assim, o pré-tratamento utilizado neste trabalho se mostra promissor, tanto em investimento energético como também no rendimento global dos açúcares fermentescíveis.

No que diz respeito às xilanas conservadas na fração sólida durante o pré-tratamento com sulfito alcalino, como se pode ver nos gráficos da Figura 19, tiveram conversão que variou de 45,39% [5% SA, 140°C , 30 min] para o máximo de 70,69% [10% SA, 160°C , 45 min] apenas com a adição dos extratos Celluclast1.5L e Novozym188. Considerando que mais de 64,5% do conteúdo inicial de xilanas foram preservadas no bagaço pré-tratado, a alta conversão enzimática garante um ganho substancial em açúcares fermentescível que podem ser prontamente convertidas a etanol por microrganismos de uso já tradicional.

Figura 18: Esboço gráfico da cinética de conversão enzimática da celulose dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diversas condições. Legendas correspondem a temperatura(°C)/tempo(min).

Figura 19: Esboço gráfico da cinética de conversão enzimática das xilanas dos bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados com sulfito alcalino a 10% (A), 7,5% (B) e 5% (C) nas diversas condições. Legendas correspondem a temperatura(°C)/tempo(min).

No que concerne à cinética da hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados com sulfito alcalino, observa-se, pelos gráficos das Figuras 18 e 19, que tanto a celulose quanto as xilanas tiveram taxas de hidrólise relativamente altas nas primeiras 8 horas de reação. No gráfico da Figura 20 encontram-se esboçadas as taxas de liberação de açúcares para as primeiras 8 horas e pode-se notar que elas são bastante similares para os bagaços pré-tratados em condições de temperatura e tempo de reação mais brandas. Para as condições mais drásticas essas taxas aumentam ligeiramente mas torna-se notória a disparidade entre as taxas de liberação observadas para bagaços pré-tratados com diferentes cargas de sulfito, isto é, a taxa de liberação de açúcares tende a ser maior com o aumento da carga de sulfito, o que pode ser explicado pelo facto dos bagaços pré-tratados com maior carga de sulfito possuírem menor percentagem de lignina residual o que segundo alguns autores promove a digestibilidade enzimática tanto pela diminuição do impedimento estérico (MUSSATTO *et al.*, 2008) quanto pela diminuição da adsorção inespecífica/improdutiva das enzima (TU *et al.*, 2009).

Figura 20: Velocidade de liberação de açúcares nas primeiras 8 horas de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados nas diversas condições. Glu e Xyl equivalem a glucose e xilose, respectivamente; SA – Sulfito Alcalino.

Ao examinar os gráficos A, B e C das Figuras 18 e 19 verifica-se que a diferença de digestibilidade aumentou significativamente tanto para a celulose quanto para as xilanas quando se aumentou a concentração de sulfito. Verificou-se também que, a partir das 8 horas de hidrólise começaram-se a acentuar as diferenças inerentes à digestibilidade dos bagaços pré-tratados em cada condição, ou seja, as taxas de hidrólise dos bagaços pré-tratados em condições mais severas mantiveram-se mais elevadas que os tratados em

condições mais brandas levando a que o rendimento final de sacarificação aumentasse consideravelmente da condição mais branda para a condição mais severa.

5.3.2 Rendimento de sacarificação e concentração de açúcares fermentescíveis

Os gráficos A e B da Figura 21 apresentam os rendimentos da sacarificação enzimática para da celulose e das xilanas, respectivamente, após 72h de reação. Ao averiguar o gráfico A nota-se que o rendimento de sacarificação da celulose aumentou com o aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento, atingindo valor máximo de 79,91%.

Figura 21: Rendimentos de sacarificação da celulose (A) e xilanas (B) após 72h de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados.

Percebe-se também que o emprego de maior carga de sulfito conduziu a maiores rendimentos de sacarificação dos bagaços pré-tratados em todas as condições experimentadas. No entanto, quando se usou cargas de sulfito de 7,5% e 10%, a temperaturas de 150°C e 160°C, o prolongamento da reação de pré-tratamento para 60 minutos teve um efeito negativo no rendimento da sacarificação apesar de se ter ocorrido uma maior deslignificação nessas condições de pré-tratamento, como pode ser observado nos gráficos da Figura 16. Porém, conforme discutido anteriormente, quando se prolongou o pré-tratamento houve aumento da fração solubilizada que se perdeu para compostos não identificados demonstrando uma certa degradação dos componentes estruturais solubilizados, o que pode ter levado também à formação, no bagaço pré-tratado, de compostos que prejudicam a sacarificação enzimática. Pode-se notar ainda na Figura 21A que quando se usou a mais baixa carga de sulfito à temperatura de 160°C se registrou uma atenuação no rendimento de sacarificação.

Relativamente ao rendimento de sacarificação das xilanas mostrados na Figura 21B nota-se que a tendência é semelhante a verificada para a celulose, ou seja, pré-tratamento com maior carga de sulfito conduziu a maiores rendimentos de hidrólise. Verificou-se também um aumento do rendimento hidrólise das xilanas com o aumento da severidade, chegando a um máximo de 70,69%.

Quanto à concentração de açúcares fermentescíveis no hidrolisado enzimático, mostrado nos gráficos da Figura 22, infere-se que os máximos de 25,97 g/L e 11,01 g/L de glicose e xilose, respectivamente, coincidem com os máximos de rendimento de sacarificação mostrados na Figura 21. Assim, considerando a soma das concentrações de glicose e xilose, obtêm-se a concentração máxima de 36,98 g/L de açúcares fermentescíveis no hidrolisado no bagaço pré-tratado com 10% de sulfito alcalino, a 160°C por 45 minutos. Embora esta concentração de açúcares seja consideravelmente adequada para a consistência de sólidos e dosagem enzimática empregues neste trabalho, a fermentação direta deste hidrolisado levaria a uma baixa concentração de etanol o que tornaria custosa a destilação/separação deste produto. Assim, a estratégia que parece ser mais acertada para a produção de etanol de materiais lignocelulósicos é a sua integração com o processo convencional ou de primeira geração. Desta forma, usar-se-ia o hidrolisado lignocelulósico para diluir o melaço industrial e o processo de fermentação convencional poderia ser realizado sem alterações nas usinas já existentes, sejam em relação a equipamentos ou mesmo alterações de condições do processo.

Figura 22: Concentração de açúcares fermentescíveis obtidos pela hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados. Os gráficos A, B e C mostram as concentrações de glicose, xilose e a soma de glicose e xilose, respectivamente.

5.3.3 Correlação da deslignificação e retirada de xilanas com os rendimentos de hidrólise

Neste segmento do trabalho foi realizado uma análise correlacional entre os rendimentos de sacarificação da celulose e das xilanas na etapa de hidrólise enzimática e a retirada de lignina e xilanas na etapa de pré-tratamento com sulfito alcalino. Pelo que se observa nos gráficos da Figura 23, foi evidente uma correlação direta positiva, isto é, maiores extensões de deslignificação e retirada de xilanas conduziram a maiores rendimentos de hidrólise dos polissacarídeos. Todavia, os valores dos coeficientes de determinação (R^2) relativamente baixos indicam que a sacarificação dos polissacarídeos do bagaço pré-tratado não é explicada simplesmente pela deslignificação e retirada de xilanas.

Tem vindo a ser mostrado que a lignina é um dos principais contribuintes para a recalcitrância de matérias-primas lignocelulósicas, manifestando o seu efeito através da inacessibilidade das enzimas aos polissacarídeos, tanto devido ao impedimento estérico (MOONEY *et al.*, 1998; MUSSATTO *et al.*, 2008), como também por causa da adsorção inespecífica/improdutiva (OOSHIMA *et al.*, 1990; SEWALT *et al.*, 1997; TU *et al.*, 2009). Também já foi mostrada que a retirada parcial das xilanas, sua desacetilação e remoção dos grupos arabinosil potencia a hidrólise dos polissacarídeos remanescentes no substrato pré-tratado (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; CHEN *et al.*, 2012). De acordo com as conclusões do trabalho publicado por Junior *et al.* (2013), o teor de lignina desempenha um papel crucial na porosidade do bagaço de cana o que influi diretamente na sacarificação enzimática dos polissacarídeos constituintes. No entanto, eles também verificaram que a remoção da lignina por si só não aumenta a velocidade inicial de hidrólise da celulose quando a hemicelulose é mantida no substrato lignocelulósico, uma vez que ambos os componentes atuam como barreiras físicas entre celulasas (enzimas) e celulose (substrato). Por outro lado, já foi mostrado por Yu *et al.* (2011), que estender a deslignificação da matéria-prima lignocelulósica através do aumento da drasticidade do pré-tratamento pode ter um efeito adverso na sacarificação uma vez que essas condições levam à remoção das porções amorfas da celulose e ao aumento do seu índice de cristalinidade, o que também prejudica o acesso das enzimas celulolíticas.

Figura 23: Correlação dos rendimentos de sacarificação das glucanas e xilanas com a deslignificação (A) e retirada de xilanas (B) verificadas na etapa de pré-tratamento.

5.4 Rendimentos globais

Por acreditar que a eficiência de qualquer pré-tratamento, no âmbito do etanol lignocelulósico, deve ser medida pela máxima recuperação de açúcares fermentescíveis com o mínimo de investimentos energético e por considerar que, além da composição química do bagaço pré-tratado, outros parâmetros, como cristalinidade, porosidade, área superficial do material, etc., são relevantes para a liberação desses açúcares na etapa de hidrólise enzimática, foi estabelecido o uso do rendimento global de recuperação de açúcares na avaliação/otimização do pré-tratamento com sulfito alcalino empregue neste trabalho. Para tal, foi levado em consideração o efeito combinado das duas etapas, pré-tratamento e hidrólise enzimática: o rendimento de pré-tratamento foi calculado pelo

quociente entre a massa de cada polissacarídeo no bagaço pré-tratado e a sua massa no bagaço bruto; o rendimento de sacarificação foi obtido pela razão entre a massa de cada componente quantificada no hidrolisado e a massa desse mesmo componente no bagaço pré-tratado. Assim, o rendimento global de cada componente foi determinado pelo produto dos rendimentos das duas etapas do processo e os resultados foram esboçados em gráficos e apresentados na Figura 24.

Figura 24: Rendimento global de recuperação das glucanas (A) e xilanas (B) após as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Como pode ser visto nos gráficos A e B, o rendimento global de recuperação de glucanas e xilanas foi consideravelmente melhor, quando se usou a maior carga de sulfito (10%) no pré-tratamento, atingindo os máximos de 76,8% e 52,9%, respectivamente. Vê-se

ainda que quando se usaram as cargas de 7,5% e 5% de sulfito, os rendimentos globais andaram muito próximos. Considerando os pré-tratamentos com maior carga de sulfito, nota-se que o aumento das condições de temperatura e tempo de reação além de 150°C/45 min levou um decréscimo no rendimento global o que se deve principalmente às perdas de celulose e xilanas verificadas na etapa de pré-tratamento, dado que, como visto na Figura 21 da seção 5.3.2, a atenuação no rendimento de sacarificação obtido para os bagaços pré-tratados nestas condições não justifica, por si só, este decréscimo do rendimento global.

Levando em conta os máximos de rendimento global obtido, estipulou-se que, dentro dos intervalos usados neste trabalho, a condição ótima para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com sulfito alcalino foi 10% de sulfito, 150°C por 30 a 45 min. Nestas condições, considerando a baixa carga enzimática utilizada, por cada 100 gramas de bagaço bruto usado, foram obtidos no hidrolisado enzimático 27,1 a 28,8 gramas glicose e 12,6 a 12,9 gramas de xilose, o que totalizou 39,7 a 41,7 gramas de açúcares fermentescíveis.

5.5 Correlação da severidade do pré-tratamento com as respostas mais relevantes do processo

O fator de severidade foi inicialmente utilizado para controlar o processo de polpação na indústria do papel mas foi reintroduzido, por Overend e Chornet (1987), para comparação de severidades no processo de pré-tratamento por explosão a vapor de diversas biomassas lignocelulósicas. Daí em diante, passou a ser utilizado para comparar a eficiência de diferentes estratégias de pré-tratamento em preparar a biomassa lignocelulósica para a conversão enzimática. Tem sido também usada para descrever o efeito do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica, nomeadamente, a retirada de lignina e das hemiceluloses. No entanto, embora esteja demonstrado que a temperatura, o pH e o tempo do pré-tratamento são os principais fatores que afetam a eficiência do pré-tratamento (PEDERSEN *et al.*, 2010), como discutido na seção 5.3.3, outros parâmetros estão envolvidos na abertura da biomatriz lignocelulósica que favorece a digestibilidade enzimática, pelo que, pretender explicar ou prever o rendimento de sacarificação por meio uma simples equação, aparentemente, é pouco realista. A fim de elucidar esta realidade, neste trabalho foram utilizadas três metodologias de estimativa da severidade que foram descritas na seção 4.3.2 da metodologia, cujos resultados estão apresentados na Tabela 17.

As principais variáveis resposta foram então esquematizadas em função dos três índices de severidade e os gráficos foram apresentados na Figura 25.

Tabela 17: Representação das condições de pré-tratamento com sulfito alcalino acompanhadas das severidades e das respostas mais relevantes no contexto de produção de etanol lignocelulósico. %Sulf – percentagem de sulfito alcalino, T(°C) – temperatura da reação, t (min) – tempo do pré-tratamento, Log Ro – fator de severidade, Log Ro' – severidade combinada, Log So – severidade catalítica, Ret Xil – retirada de xilanas, Deslig – deslignificação, Hidr Enz – rendimento da hidrólise da celulose, Rend Gl – rendimento global de recuperação das glucanas.

Condições de pré-tratamento						Variáveis resposta (%)			
% Sulf.	T (°C)	t (min)	Log Ro	Log Ro'	Log So	Ret Xil	Deslig	Hidr Enz	Rend Gl
10	130	30	2.36	3.70	6.09	2.98	29.83	53.45	57.69
10	130	60	2.66	4.51	6.39	15.71	47.71	64.32	64.24
10	140	30	2.65	4.19	6.38	18.84	49.09	64.68	62.22
10	140	45	2.83	4.80	6.56	17.10	55.43	66.18	65.41
10	140	60	2.96	4.71	6.68	20.87	60.29	70.86	71.75
10	150	30	2.95	4.53	6.68	22.07	57.69	72.03	72.21
10	150	45	3.13	5.08	6.85	24.35	67.09	78.37	76.84
10	150	60	3.25	5.11	6.98	29.96	68.27	73.76	70.50
10	160	30	3.24	5.14	6.97	31.00	69.49	74.19	71.92
10	160	45	3.42	5.36	7.15	33.78	77.18	79.91	73.21
10	160	60	3.54	5.49	7.27	35.47	76.70	75.59	70.69
7.5	140	30	2.65	4.01	6.26	11.20	43.51	52.74	52.71
7.5	140	45	2.83	4.30	6.43	17.44	51.94	61.45	61.27
7.5	140	60	2.96	4.94	6.56	16.20	50.26	57.62	56.66
7.5	150	30	2.95	4.81	6.55	21.49	54.04	61.08	58.82
7.5	150	45	3.13	5.00	6.73	22.38	58.62	61.08	59.58
7.5	150	60	3.25	5.11	6.85	23.44	60.96	63.67	62.27
7.5	160	30	3.24	5.13	6.84	31.91	67.97	67.70	63.35
7.5	160	45	3.42	5.15	7.02	29.04	67.24	76.84	73.67
7.5	160	60	3.54	5.07	7.15	30.30	71.95	68.40	65.23
5	140	30	2.65	4.51	6.08	13.96	43.87	51.43	51.01
5	140	45	2.83	4.74	6.26	16.13	51.62	51.51	51.41
5	140	60	2.96	4.81	6.38	19.21	52.91	55.77	53.85
5	150	30	2.95	4.52	6.37	15.68	50.48	54.11	54.01
5	150	45	3.13	4.76	6.55	19.11	52.47	62.79	62.29
5	150	60	3.25	4.89	6.68	20.54	54.36	65.50	64.37
5	160	30	3.24	4.91	6.67	20.43	57.63	57.19	57.60
5	160	45	3.42	4.89	6.84	22.90	61.52	52.30	52.16
5	160	60	3.54	4.69	6.97	27.23	64.23	54.40	51.69

Conforme se observa nos gráficos A, C e E da Figura 25, existe uma correlação positiva entre os três índices de severidade considerados neste trabalho e a solubilização da lignina e das xilanas. Pelos coeficientes de determinação percebe-se que o índice de severidade (Log Ro) de Overend e Chornet (1987) e a severidade combinada (Log Ro')

obtiveram menor ajuste ao conjunto de resultados do que o fator de severidade catalítica (Log So) adaptada para o processo de pré-tratamento com sulfito alcalino com a inclusão dos parâmetros relativos aos catalisadores.

Figura 25: Representação da deslignificação, retirada de xilanas, rendimento da hidrólise e rendimento global de glucanas em função dos índices de severidade Log Ro (A e B), Log Ro' (C e D) e Log So (E e F).

Com a inclusão dos parâmetros referentes aos catalisadores na equação da severidade catalítica obteve-se um aumento considerável no ajuste dos graus de severidade aos níveis de deslignificação e retiradas de xilanas. Desta forma, assume-se aqui que o índice de severidade catalítica é o mais adequado quando se pretende prever ou estimar os

efeitos de pré-tratamentos com sulfito alcalino sobre as proporções de lignina e de xilanas remanescentes no substrato pré-tratado.

Os gráficos B, D e F da Figura 25 mostram os rendimentos de sacarificação enzimática da celulose dos bagaços pré-tratados e os rendimentos globais de recuperação das glucanas em função dos três diferentes índices de severidade calculados. Constata-se que os coeficientes de determinação obtidos foram claramente baixos, o que indica uma considerável falta de correlação entre estes índices de severidade e os rendimentos de recuperação dos açúcares. Contudo, a severidade catalítica foi o índice que obteve a melhor correlação. Nota-se ainda que a maioria dos pontos referentes ao rendimento de sacarificação e rendimento global se sobrepõe o que se deve ao facto da celulose ter sido muito pouco afetada pelas condições de pré-tratamento e sendo assim o rendimento global, que envolve as etapas pré-tratamento e hidrólise, reflete, na verdade, o rendimento da sacarificação, exceto nas condições mais drásticas de pré-tratamento em que houve solubilização duma fração da celulose.

Estes resultados de correlação corroboram o que já foi discutido anteriormente, ou seja, diversos fatores afetam a severidade de uma determinada modalidade de pré-tratamento; não é possível prever de forma fiável a influência das condições de pré-tratamento sobre os rendimentos de sacarificação enzimática com os modelos de índices de severidade atualmente disponíveis. À mesma conclusão chegaram Pedersen *et* Meyer (2010) que fizeram uma compilação de resultados de diversos pré-tratamentos usando palha de trigo e notaram que não havia qualquer correlação entre os modelos de severidade existentes e o rendimento em monossacarídeos após hidrólise enzimática.

5.6 Análise estatística

Neste segmento do trabalho foram considerados os pré-tratamentos com sulfito alcalino que seguiram um planeamento fatorial completo com três variáveis, concentração de sulfito (%), temperatura (°C) e tempo de reação (min), cujos valores descodificados estão na Tabela 18.

Tabela 18: Intervalo de valores estudados no planeamento 3³ referente ao pré-tratamento com sulfito alcalino.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Sulfito (% m/m)	5	7.5	10
Temperatura (°C)	140	150	160
Tempo (min)	30	45	60

Para o planejamento foram considerados 27 diferentes experimentos, sendo as combinações dos níveis das variáveis independentes e as respostas avaliadas (retirada de xilanas, deslignificação, rendimento da hidrólise enzimática da celulose e rendimento global de recuperação das glucanas) apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19: Matriz de planejamento com os resultados das variáveis resposta: retirada de xilanas (Ret Xil), deslignificação (Deslig), hidrólise enzimática (Hid Enz) e rendimento global (Rend Glob).

Ens.	Fatores			Respostas (%)			
	S (%)	T (°C)	t (min)	Ret Xil	Deslig	Hid Enz	Rend Glob
1	-1	-1	-1	13.96	43.87	51.43	51.01
2	-1	-1	0	16.13	51.62	51.51	51.41
3	-1	-1	1	19.21	52.91	55.77	53.85
4	-1	0	-1	15.68	50.48	54.11	54.01
5	-1	0	0	19.11	52.47	62.79	62.29
6	-1	0	1	20.54	54.36	65.50	64.37
7	-1	1	-1	20.43	57.63	57.19	57.60
8	-1	1	0	22.90	61.52	52.30	52.16
9	-1	1	1	27.23	64.23	54.40	51.69
10	0	-1	-1	11.20	43.51	52.74	52.71
11	0	-1	0	17.44	51.94	61.45	61.27
12	0	-1	1	16.20	50.26	57.62	56.66
13	0	0	-1	21.49	54.04	61.08	58.82
14	0	0	0	22.38	58.62	61.08	59.58
15	0	0	1	23.44	60.96	63.67	62.27
16	0	1	-1	31.91	67.97	67.70	63.35
17	0	1	0	29.04	67.24	76.84	73.67
18	0	1	1	30.30	71.95	68.40	65.23
19	1	-1	-1	18.84	49.09	64.68	62.22
20	1	-1	0	17.10	55.43	66.18	65.41
21	1	-1	1	20.87	60.29	70.86	71.75
22	1	0	-1	22.07	57.69	72.03	72.21
23	1	0	0	24.35	67.09	78.37	76.84
24	1	0	1	29.96	68.27	73.76	70.50
25	1	1	-1	31.00	69.49	74.19	71.92
26	1	1	0	33.78	77.18	79.91	73.21
27	1	1	1	35.47	76.70	75.59	70.69

5.6.1 Determinação dos efeitos principais e dos modelos para a predição da retirada de xilanas e da deslignificação

A estimativa dos efeitos principais e das interações das variáveis que contribuíram para a retirada de xilanas e para a deslignificação na etapa de pré-tratamento com sulfito

alcalino foi realizada através da determinação dos coeficientes de regressão, do erro padrão, do teste *t* de *Student* e da significância de cada parâmetro e os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Tabelas 20 e 21 e nos gráficos de Pareto apresentados na Figura 26.

Tabela 20: Coeficientes de regressão para a retirada de xilanas durante a etapa de pré-tratamento, considerando a 95% de confiança.

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	Valor - <i>t</i>	Valor - <i>p</i>
Média	21.8490	1.0740	20.3431	0.00000
(1)Sulfito (L)	3.2345	0.4972	6.5058	0.00001 *
Sulfito (Q)	0.1001	0.8611	0.1163	0.90879
(2)Temperatura(L)	6.1728	0.4972	12.4156	0.00000 *
Temperatura (Q)	0.8311	0.8611	0.9651	0.34802
(3)Tempo (L)	2.0354	0.4972	4.0939	0.00076 *
Tempo (Q)	0.2963	0.8611	0.3440	0.73503
1L * 2L	1.8488	0.6089	3.0363	0.00745 *
1L * 3L	-0.2085	0.6089	-0.3424	0.73627
2L * 3L	-0.2176	0.6089	-0.3574	0.72517
$R^2 = 0,93$		R^2 ajustado = 0,89		

Tabela 21: Coeficientes de regressão para a deslignificação durante a etapa de pré-tratamento, considerando a 95% de confiança.

Fator	Coeficiente	Erro-padrão	Valor - <i>t</i>	Valor - <i>p</i>
Média	58.7802	1.0753	54.6649	0.00000
(1)Sulfito (L)	5.1180	0.4978	10.2820	0.00000 *
Sulfito (Q)	0.9650	0.8621	1.1193	0.27858
(2)Temperatura(L)	8.6109	0.4978	17.2993	0.00000 *
Temperatura (Q)	1.3820	0.8621	1.6030	0.12735
(3)Tempo (L)	3.6741	0.4978	7.3813	0.00000 *
Tempo (Q)	-1.8060	0.8621	-2.0948	0.05148
1L * 2L	1.9639	0.6096	3.2214	0.00501 *
1L * 3L	0.7888	0.6096	1.2940	0.21298
2L * 3L	-0.7662	0.6096	-1.2569	0.22579
$R^2 = 0.97$		R^2 ajustado = 0.95		

Pela análise das Tabelas 20 e 21 e dos diagramas de Pareto apresentados na Figura 26, se constata que, tanto para a retirada de xilanas como para a deslignificação, as três variáveis independentes e a interação dos parâmetros sulfito (linear) com a temperatura (linear) tiveram efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, sendo a temperatura a variável com maior contribuição para estas respostas. Constatou-se

também que a ordem decrescente dos efeitos dos parâmetros significativos é a mesma para ambas as respostas, embora se note, pelos coeficientes de determinação (R^2), que a correlação das variáveis independentes com a deslignificação é mais robusta do que com a retirada de xilanas.

Figura 26: Gráficos de Pareto representando a estimativa dos efeitos principais e das interações sobre as variáveis resposta retirada de xilanas (A) e deslignificação (B), ao nível de 95 % de confiança.

Com o intuito de simplificar os modelos empíricos para predição da retirada de xilanas e da deslignificação, sem afetar substancialmente o seu ajuste, todos os efeitos de interação das variáveis que apresentaram não significância, ao nível de confiança de 95%, foram eliminados e considerados erros aleatórios, pelo que, uma nova análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando apenas os parâmetros com efeitos significativos e os resultados estão mostrados na Tabela 22. No mesmo sentido, foram elaboradas, a partir dos coeficientes de regressão dos parâmetros com efeitos significativos, as Equações 12 e 13 como instrumento para descrever e prever as duas respostas consideradas determinantes para a eficiência do processo de pré-tratamento.

$$\text{Ret Xil} = 22,67 + 3,23.S + 6,17.T + 2,04.t + 1,85.S.T \quad (12)$$

$$\text{Deslig} = 59,14 + 5,12.S + 8,61.T + 3,67.t + 1,96.S.T \quad (13)$$

Onde S, T e t são os valores codificados da percentagem de sulfito, da temperatura e do tempo da reação, respectivamente.

Tabela 22: Análise de variância dos efeitos significativos dos parâmetros avaliados sobre as respostas retirada de xilanas (A) e deslignificação (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática.

	Fator	SQ	GL	MQ	Teste F	Valor - p
(A) Ret Xil	(1)Sulfito (L)	188.32	1	188.32	50.86	0.00000
	(2)Temperatura (L)	685.85	1	685.85	185.23	0.00000
	(3)Tempo (L)	74.57	1	74.57	20.14	0.00018
	1L * 2L	41.02	1	41.02	11.08	0.00305
$R^2 = 0,93$	Erro	81.46	22	3.70		
$R^2_{aj.} = 0,91$	Total	1071.22	26			
	Fator	SQ	GL	MQ	Teste F	Valor - p
(B) Deslig	(1)Sulfito (L)	471.49	1	471.49	81.71	0.00000
	(2)Temperatura (L)	1334.65	1	1334.65	231.30	0.00000
	(3)Tempo (L)	242.99	1	242.99	42.11	0.00000
	1L * 2L	46.28	1	46.28	8.02	0.00970
$R^2 = 0,94$	Erro	126.95	22	5.77		
$R^2_{aj.} = 0,93$	Total	2222.351	26			

Com esta nova análise de variância os efeitos foram confirmados e o ajuste dos modelos não foi afetado, ou seja, a temperatura manteve-se como o principal contribuinte para as respostas retirada de xilanas e deslignificação, seguida pelas variáveis sulfito, tempo e pela interação entre temperatura e sulfito. À partir destes dados foi elaborada a análise de variância de regressão para os modelos preditores das duas respostas, estando os resultados apresentados na Tabela 23. Os coeficientes de determinação (R^2) de 0,92 e 0,94 e as razões F_{calc}/F_{tab} de 24 e 32, para a retirada de xilanas e deslignificação, respectivamente, atestaram que os modelos empíricos para a predição destas duas respostas durante o pré-tratamento com sulfito alcalino foram altamente significativos dentro do intervalo de confiança de 95%.

A avaliação dos modelos também foi feita através da observação do gráfico dos valores preditos versus os valores observados, que são mostrados nos gráficos da Figura 27, onde pode-se constatar que os valores observados (pontos) estão muito próximos aos valores preditos pelos modelos (retas) e que não houve diferenças significativas entre os dois conjuntos de dados, ou seja, os erros relativos entre eles foram consideravelmente baixos (<10%).

Tabela 23: Análise de variância de regressão para os modelos preditores da retirada de xilanas (A) e da deslignificação (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática; Fcalc – valor F calculado; Ftab – valor F tabelado.

	FV	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	Fcalc/Ftab	R ²
(A)	Regressão	989.76	4	247.44	66.83	2.82	24	0.924
	Resíduos	81.46	22	3.70				
	Total	1071.22	26					
	FV	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab	Fcalc/Ftab	R ²
(B)	Regressão	2095.41	4	523.85	90.78	2.82	32	0.943
	Resíduos	126.95	22	5.77				
	Total	2222.35	26					

Figura 27: Valores observados versus valores preditos para a retirada de xilanas (A) e a deslignificação (B), durante a etapa de pré-tratamento com sulfito alcalino.

Com base nas equações 12 e 13, foram geradas as curvas de nível para os dois modelos lineares obtidos, relacionando as variáveis independentes e suas influências sobre as respostas retirada de xilanas e deslignificação, sendo os resultados mostrados na figura 28. Pelos gráficos A B e C apresentados nesta Figura, pode-se notar que a retirada de xilanas é favorecida nos níveis superiores das três variáveis independentes, o sulfito, a temperatura e o tempo. No entanto, foi objetivo deste trabalho intentar uma condição que minimizasse a solubilização das xilanas durante o pré-tratamento, por um lado, para prevenir a sua degradação e formação de compostos inibidores de etapas seguintes, por outro lado, com o intuito de aumentar o rendimento/aproveitamento de açúcares fermentescíveis no substrato sólido do pré-tratamento.

Figura 28: Curvas de nível dos modelos propostos que representam a retirada de xilanas (A, B e C) e a deslignificação (D, E e F) após o pré-tratamento com sulfito alcalino nas diversas condições do planejamento.

Embora, à primeira vista, pareça desejável os níveis inferiores das três variáveis independentes, há que ter em consideração que outros fatores influem no aproveitamento final dos açúcares fermentescíveis, a saber, a deslignificação, que segundo Mussatto *et al.* (2008), Tu *et al.* (2009) e Santi Jr. *et al.* (2013), exerce um papel crucial no rendimento da hidrólise enzimática. Desta forma, precisa-se observar os gráficos D, E e F da Figura 28, onde se nota que os valores máximos de deslignificação foram obtidos nos níveis superiores das três variáveis independentes. Por conseguinte, entende-se que, no âmbito deste trabalho, para se chegar a uma condição otimizada neste processo de pré-tratamento não basta só considerar a composição do substrato pré-tratado mas também avaliar a sua digestibilidade enzimática, que tem influência significativa no aproveitamento final dos açúcares fermentescíveis.

5.6.2 Determinação dos efeitos principais e dos modelos para a predição da hidrólise enzimática e do rendimento global

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento da hidrólise enzimática da celulose e sobre o rendimento global de recuperação de glucanas foi realizada similarmente ao que foi feito para a retirada de xilanas e deslignificação, utilizando o programa Statística (Statsoft, v.7.0). A Tabela 24 e os gráficos da Figura 29 exibem os efeitos sobre as respostas acima citadas considerando nível de confiança de 95%. Como se pode constatar, apenas as variáveis independentes sulfito e temperatura apresentaram efeitos estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança, tanto para a hidrólise enzimática quanto para o rendimento global, sendo o sulfito a variável com maior contribuição para estas respostas.

No sentido de simplificar os modelos empíricos para predição da hidrólise enzimática e do rendimento global, experimentou-se a eliminação dos parâmetros que apresentaram efeitos não significativos ao nível de confiança de 95%. Contudo, no modelo que descreve a hidrólise enzimática, o parâmetro tempo (linear) foi mantido, embora tenha apresentado efeito não significativo, isto porque, a sua eliminação levaria a uma diminuição considerável no coeficiente de determinação e também porque se trata de uma variável determinante no controle do processo de pré-tratamento. Para o modelo preditor do rendimento global, além dos parâmetros com efeitos significativos, também um parâmetro não significativo foi mantido, isto é, a temperatura (quadrática), que apresentou um impacto considerável no coeficiente de determinação do modelo. Desta forma, foram elaboradas as equações 14 e 15, utilizando os coeficientes de regressão dos parâmetros

admitidos nos dois modelos para a predição da hidrólise enzimática e do rendimento global.

Tabela 24: Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática da celulose (A) e rendimento global de glucanas (B), considerando 95% de confiança.

	Fator	Coeficiente	Erro-padrão	Valor - <i>t</i>	Valor - <i>p</i>
A - Hid Enz	Média	66.5895	2.1312	31.2452	0.000000
	(1)Sulfito (L)	8.3646	0.9865	8.4787	0.000000 *
	Sulfito (Q)	1.0777	1.7088	0.6307	0.536626
	(2)Temperatura (L)	4.1263	0.9865	4.1826	0.000625 *
	Temperatura (Q)	-2.5572	1.7088	-1.4965	0.152858
	(3)Tempo (L)	1.6899	0.9865	1.7129	0.104899
	Tempo (Q)	-2.2302	1.7088	-1.3052	0.209225
	1L * 2L	1.8992	1.2083	1.5718	0.134415
	1L * 3L	-0.3020	1.2083	-0.2499	0.805626
	2L * 3L	-1.3416	1.2083	-1.1103	0.282324
$R^2 = 0,86$					
$R^2_{aj.} = 0,78$					
B - Rend Glob	Média	65.0941	2.1294	30.5690	0.00000
	(1)Sulfito (L)	7.5752	0.9857	7.6849	0.00000 *
	Sulfito (Q)	1.4450	1.7073	0.8464	0.40910
	(2)Temperatura (L)	2.9575	0.9857	3.0004	0.00805 *
	Temperatura (Q)	-3.1111	1.7073	-1.8222	0.08606
	(3)Tempo (L)	1.2868	0.9857	1.3055	0.20913
	Tempo (Q)	-2.2690	1.7073	-1.3290	0.20142
	1L * 2L	0.9383	1.2073	0.7772	0.44770
	1L * 3L	-0.0577	1.2073	-0.0478	0.96246
	2L * 3L	-1.7992	1.2073	-1.4904	0.15445
$R^2 = 0,82$					
$R^2_{aj.} = 0,73$					

Figura 29: Gráficos de Pareto representando a estimativa dos efeitos principais e das interações sobre as variáveis resposta hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B), ao nível de 95 % de confiança.

$$\text{Hid Enz} = 64,12 + 8,36.S + 4,13.T + 1,69.t \quad (14)$$

$$\text{Rend Glob} = 64,54 + 7,58.S + 2,96.T - 3,11.T^2 \quad (15)$$

S, T e t são os valores codificados da percentagem de sulfito, da temperatura e do tempo da reação, respectivamente.

Uma nova análise de variância foi realizada utilizando apenas os parâmetros admitidos nos modelos e os resultados estão mostrados na Tabela 25. Pode-se ver que os efeitos foram confirmados e o ajuste dos modelos não teve alterações consideráveis. Embora, os coeficientes de determinação dos modelos tenham ficado entre 0,75 e 0,79, pode-se ver nos gráficos da Figura 30, que os valores observados (pontos) se distribuem próximos dos valores preditos (retas). Esta tendência é também confirmada pelos resultados apresentados na Tabela 26, onde se observa que os erros relativos para os dois modelos foram baixos, especialmente na região de interesse dentro do intervalo de valores estudados. Com isto, pode-se afirmar que os modelos propostos são significativos e válidos para a estimativa das respostas hidrólise enzimática e rendimento global.

Tabela 25: Análise de variância dos efeitos dos parâmetros admitidos nos modelos preditores das respostas hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática.

	Fator	SQ	GL	MQ	Teste F	Valor - p
A Hid Enz	(1)Sulfito (L)	1259.40	1	1259.40	65.86	0.00000
	(2)Temperatura (L)	306.48	1	306.48	16.03	0.00056
	(3)Tempo (L)	51.40	1	51.40	2.69	0.11472
	Erro	439.84	23	19.12		
R ² = 0,79	Total	2057.13	26			
R ² aj = 0,76						
	Fator	SQ	GL	MQ	Teste F	Valor - p
B Rend Glob	(1)Sulfito (L)	1032.91	1	1032.91	56.56	0.00000
	(2)Temperatura (L)	157.45	1	157.45	8.62	0.00742
	Temperatura (Q)	58.07	1	58.07	3.18	0.08774
	Erro	420.01	23	18.26		
R ² = 0,75	Total	1668.43	26			
R ² aj = 0,72						

Figura 30: Valores observados versus valores preditos para a hidrólise enzimática (A) e rendimento global (B).

Tabela 26: Erros relativos dos valores preditos pelos modelos em relação aos valores observados para as respostas hidrólise enzimática e rendimento global. S – Sulfito; T – Temperatura; t – tempo; Obs – valores observados; Pred – valores preditos; Er Rel – erros relativos.

Condições				Hidrólise Enzimática			Rendimento Global		
Ens	S	T	t	Obs	Pred	Er Rel(%)	Obs	Pred	Er Rel(%)
1	-1	-1	-1	51.4	49.9	-2.9	51.0	50.9	-0.2
2	-1	-1	0	51.5	51.6	0.2	51.4	50.9	-1.0
3	-1	-1	1	55.8	53.3	-4.4	53.9	50.9	-5.5
4	-1	0	-1	54.1	54.1	-0.1	54.0	57.0	5.5
5	-1	0	0	62.8	55.8	-11.2	62.3	57.0	-8.5
6	-1	0	1	65.5	57.4	-12.3	64.4	57.0	-11.5
7	-1	1	-1	57.2	58.2	1.7	57.6	56.8	-1.4
8	-1	1	0	52.3	59.9	14.5	52.2	56.8	8.9
9	-1	1	1	54.4	61.6	13.2	51.7	56.8	9.9
10	0	-1	-1	52.7	58.3	10.5	52.7	58.5	10.9
11	0	-1	0	61.4	60.0	-2.4	61.3	58.5	-4.6
12	0	-1	1	57.6	61.7	7.0	56.7	58.5	3.2
13	0	0	-1	61.1	62.4	2.2	58.8	64.5	9.7
14	0	0	0	61.1	64.1	5.0	59.6	64.5	8.3
15	0	0	1	63.7	65.8	3.4	62.3	64.5	3.7
16	0	1	-1	67.7	66.6	-1.7	63.3	64.4	1.6
17	0	1	0	76.8	68.2	-11.2	73.7	64.4	-12.6
18	0	1	1	68.4	69.9	2.2	65.2	64.4	-1.3
19	1	-1	-1	64.7	66.7	3.1	62.2	66.1	6.2
20	1	-1	0	66.2	68.4	3.3	65.4	66.1	1.0
21	1	-1	1	70.9	70.0	-1.2	71.7	66.1	-7.9
22	1	0	-1	72.0	70.8	-1.7	72.2	72.1	-0.1
23	1	0	0	78.4	72.5	-7.5	76.8	72.1	-6.1
24	1	0	1	73.8	74.2	0.6	70.5	72.1	2.3
25	1	1	-1	74.2	74.9	1.0	71.9	72.0	0.1
26	1	1	0	79.9	76.6	-4.1	73.2	72.0	-1.7
27	1	1	1	75.6	78.3	3.6	70.7	72.0	1.8

Com base nos parâmetros admitidos para as respostas aqui avaliadas, os modelos ajustados para descrever a hidrólise enzimática e o rendimento global foram também avaliados através da análise da variância de regressão e os resultados se encontram apresentados na Tabela 27. Pelo que se pode observar, os coeficientes de determinação (R^2) de 0,79 e 0,75 e as razões $F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$ de 9 e 8, para a hidrólise enzimática e rendimento global, respectivamente, confirmaram que os modelos empíricos para a predição destas duas respostas foram perfeitamente válidos e significativos dentro do intervalo de confiança de 95%, pelo que, foram empregados para representar estas resposta por meio das superfícies de resposta apresentadas na Figura 31.

Tabela 27: Análise de variância de regressão para os modelos preditores da hidrólise enzimática (A) e do rendimento global (B). SQ – soma quadrática; GL – graus de liberdade; MQ – média quadrática; F_{calc} – valor F calculado; F_{tab} – valor F tabelado.

	FV	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	$F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$	R^2
(A)	Regressão	1617.29	3	539.10	28.19	3.03	9	0.79
	Resíduos	439.84	23	19.12				
	Total	2057.13	26					
	FV	SQ	GL	QM	F_{calc}	F_{tab}	$F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$	R^2
(B)	Regressão	1248.43	3	416.14	22.79	3.03	8	0.75
	Resíduos	420.01	23	18.26				
	Total	1668.43	26					

A análise das superfícies de resposta A, B e C da Figura 31, que representam a hidrólise enzimática da celulose em função das condições de temperatura, tempo e percentagem de sulfito, dentro dos intervalos estudados no planejamento, permite-nos entender que esta resposta foi propiciada pelos níveis superiores de todas as variáveis independentes. Em conformidade com o que foi visto em relação aos efeitos, constata-se aqui também que o sulfito foi o fator que conduziu ao maior aumento na hidrólise enzimática, quando ele foi levado do nível inferior para o superior. Do mesmo modo, o tempo da reação foi o fator que levou à menor diferença nesta resposta, quando foi aumentado do nível inferior para o superior, pelo que, atendendo ao objetivo de minimizar o dispêndio energético no processo de pré-tratamento, ele pode ser mantido no seu nível baixo ou médio sem afetar significativamente o rendimento da hidrólise enzimática da celulose.

Figura 31: Superfícies de Resposta descritas pelos modelos que representam a hidrólise enzimática (A, B e C) e o rendimento global (D) em função das diferentes condições do planejamento.

A superfície de resposta D da Figura 31, que descreve o rendimento global das glucanas em função das diversas condições, dentro dos intervalos estudados no planejamento, é o esboço que melhor demonstrou que o intervalo de valores das variáveis utilizadas neste trabalho foi adequado. A inflexão na superfície de resposta sugere que temperaturas maiores que o nível superior usado não iria trazer benefícios significativos ao rendimento global. Por conseguinte, dado que o tempo da reação não foi significativo para esta resposta, a condição ótima, dentro dos intervalos de valores estudados, integraria o nível superior da variável sulfito, o nível médio da variável temperatura e o nível inferior da variável tempo. Este desfecho da análise estatística coincide com a conclusão obtida pela análise direta dos resultados o que corrobora a opção tomada na definição da condição ótima para o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com sulfito alcalino.

5.7 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático

Conforme visto na seção 5.4, pela análise dos rendimentos globais de recuperação de açúcares fermentescíveis, estipulou-se que a melhor condição de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com sulfito alcalino, dentro do intervalo de valores estudados, seria com o emprego de 10% de sulfito, em relação à massa do bagaço bruto, à temperatura de 150°C e por um tempo de 30 a 45 minutos. No entanto, tendo em consideração que o objetivo deste trabalho foi maximizar o aproveitamento dos carboidratos com o mínimo investimento energético, estabeleceu-se o tempo de 30 minutos na condição otimizada a fim de garantir menor severidade e menor dispêndio energético, dado que os rendimentos obtidos nesses dois tempos foram relativamente próximos. Assim, foram realizados mais 3 ensaios de pré-tratamento na condição citada, sendo os bagaços pré-tratados caracterizados quimicamente e submetidos à hidrólise enzimática. Os hidrolisados foram também caracterizados quanto à concentração de açúcares fermentescíveis (Tabela 28) e submetidos aos testes de avaliação de fermentabilidade usando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e a *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773.

Tabela 28: Composição química do bagaço pré-tratado e do hidrolisado enzimático, obtidos a partir de pré-tratamentos na condição otimizada (SA 10%, 150°C, 30 min).

Bagaço pré-tratado (%)						Hidrolisado enzimático (g/L)					
Celulose	DP	Xilanas	DP	Lignina	DP	Celobiose	DP	Glicose	DP	Xilose	DP
54.98	±1	27.42	±0.7	10.55	±0.3	1.4	±0.2	20.7	±0.9	9.8	±0.4

Pelos dados apresentados na Tabela 28, percebe-se que, apesar da composição do bagaço pré-tratado ter sido idêntica à do bagaço pré-tratado obtido no ensaio com a mesma condição no planejamento fatorial, a média da concentração de açúcares fermentescíveis obtidos na sacarificação enzimática foi de 30,5 g/L, bem abaixo do valor de 39,7 g/L conseguido na mesma condição considerada ótima no planejamento. Este resultado está associado ao menor rendimento de sacarificação verificado ($67,7 \pm 2$ para glucanas e $62,7 \pm 2$ para xilanas), o que pode ter derivado do aumento de escala de hidrólise e também devido a quedas de energia que interromperam o controle de temperatura e da agitação nas últimas 24 horas de hidrólise.

Figura 32: Perfil de fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado na condição otimizada (A) e meio controle (B), pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Gli – glicose; Xil – xilose; Glice – glicerol.

Os hidrolisados enzimáticos obtidos na etapa de sacarificação foram misturados/homogeneizados, de seguida a mistura foi esterilizada, juntamente com o meio semissintético (controle) preparado com concentrações de glicose e xilose idênticas às do hidrolisado, e então testados quanto à fermentabilidade dos açúcares.

Tabela 29: Parâmetros após 4 horas de fermentação do hidrolisado e do meio controle pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. $\Delta S - \text{Gli} \rightarrow$ consumo de glicose; $\Delta S - \text{Xil} \rightarrow$ consumo de xilose; Etanol Máx. $\rightarrow$ concentração máxima de etanol; $Y_{\text{Et/S}} \rightarrow$ rendimento em etanol; $Y_{\text{Et}} \rightarrow$ Eficiência de conversão de açúcares em etanol; $Q_p \rightarrow$ produtividade volumétrica; $Y_{\text{X/S}} \rightarrow$ rendimento em biomassa; $Y_{\text{G/S}} \rightarrow$ rendimento em glicerol.

Ensaio	$\Delta S - \text{Gli}$ (g)	$\Delta S - \text{Xil}$ (g)	Etanol Máx. (g/L)	$Y_{\text{Et/S}}$ (g/g)	Y_{Et} (%)	Q_p (g/(L.h))	$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)	Y_G (g/g)
Hidrolisado	19.19	0.07	9.8	0.51	99.9	2.5	0.08	0.07
Controle	17.33	1.09	9.2	0.53	103.9	2.3	0.07	0.07

Os perfis de fermentação, dos hidrolisados e dos controles, pelas duas leveduras acima citadas foram apresentados na Figura 32² e 33. Como pode ser visto pela comparação dos gráficos A e B da Figura 32, não se observou problemas de fermentabilidade do hidrolisado em relação ao meio controle, o que se deve, principalmente, ao fato do hidrolisado enzimático apresentar níveis insignificantes de inibidores para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, que proporcionou uma fermentação rápida da glicose presente no hidrolisado e no meio controle, atingindo, após 4 horas de processo, o consumo total deste açúcar e concentrações máximas de etanol de 9,8 g/L e 9,2 g/L, respectivamente. Nota-se, contudo, que, após 2 horas de processo, o consumo deste açúcar atingiu 98,2% no meio controle e 84,9% no hidrolisado, ou seja, a taxa de consumo de glicose foi ligeiramente maior no meio controle do que no hidrolisado. No que respeita à xilose, após 24 de fermentação, apenas 8,4% e 21,2% foram consumidos no hidrolisado e no meio controle, respectivamente, no entanto, esse consumo não resultou num aumento da concentração de etanol. Aliás, a concentração de etanol, de 4 a 24 horas de fermentação, registrou uma diminuição de 11,5% no hidrolisado e 16,1% no meio controle. Coincidentemente, neste intervalo, houve crescimento de biomassa, sugerindo que, após o esgotamento da glicose, a levedura passou a metabolizar o etanol e, possivelmente, assimilou uma pequena fração da xilose. A levedura *S. cerevisiae*, usualmente utilizada na produção de etanol a partir de hexoses, é incapaz de fermentar a D-xilose (BARNETT, 1976), todavia, ela metaboliza a xilulose, um isómero da xilose, com

² Figura 32 na página anterior.

baixa eficiência (WANG; SCHNEIDER, 1980), o que é explicada pelo desequilíbrio de cofatores e pela insuficiente capacidade de conversão da xilulose pela via das pentoses-fosfato.

Outro facto a ser observado na fermentação pela *S. cerevisiae* PE-2 é a formação de glicerol, que está associada ao metabolismo de alguns compostos com caráter inibitório, como o furfural e 5-hidroximetilfurfural. Nota-se que, nas quatro primeiras horas de fermentação, formou-se a mesma concentração de glicerol (1,57 g/L) no hidrolisado e no controle, concentração esta que foi diminuindo para o final do tempo do processo, indicando que a fermentabilidade do hidrolisado foi em tudo similar à fermentação do meio controle, composto por glicose e xilose puras. Esta semelhança de fermentabilidade pode ser atestada pelos parâmetros fermentativos exibidos na Tabela 29³, onde se pode ver que, todos os rendimentos foram semelhantes em ambos os meios testados, sendo que, os açúcares consumidos foram convertidos em etanol com uma eficiência de, praticamente, 100%. Inclusive, a produtividade volumétrica foi maior no hidrolisado em comparação com o meio controle.

Sendo a xilose o segundo açúcar mais abundante em hidrolisados enzimáticos de substratos pré-tratados da maioria das matérias-primas lignocelulósicas consideradas promissoras como fonte de bioenergia, o desenvolvimento de uma metodologia ágil, barata e eficiente para a sua conversão em etanol é um dos grandes desafios para produção eficiente e sustentável do etanol de segunda geração. Dado que a *S. cerevisiae* é o microrganismo mais robusto e aplicado em fermentações industriais, como pode ser visto no trabalho de Lalue et al. (2012), inúmeras pesquisas têm incidido sobre ela, principalmente, através da engenharia genética, tanto no sentido de dotá-la da capacidade de fermentação de pentoses quanto para melhorar a sua tolerância aos inibidores que podem ser encontrados nos hidrolisados. A xilose pode, contudo, ser fermentada a etanol por diversas espécies selvagens de fungos e bactérias (OLSSON et al., 1996), dentre as quais a levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* é a mais exhaustivamente investigada e empregada na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Por esta razão, neste trabalho, ela foi preferida para testar a fermentabilidade do hidrolisado do bagaço pré-tratado em condições otimizadas.

Os ensaios de fermentação, empregando a *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773, foram realizados nas mesmas condições utilizadas para a *S. cerevisiae* PE-2 e os

³ Tabela 29 na página anterior.

perfis de fermentação do hidrolisado e do meio controle foram apresentados na Figura 33. Pelo que se observa nos gráficos A e B, o consumo de glicose foi relativamente rápido nas primeiras quatro horas de fermentação, atingindo 99,5% no hidrolisado e 93,0% no meio controle. Já a xilose, praticamente, não foi consumida nas duas primeiras horas de fermentação, passando, contudo, a ser consumida com a diminuição da concentração de glicose. Até quatro horas de processo, apenas 18,7% e 16,7% de xilose tinham sido consumidos no hidrolisado e no meio controle, respectivamente.

Figura 33: Perfil de fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado na condição otimizada (A) e meio controle (B), pela *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773. Gli – glicose; Xil – xilose; Glice – glicerol.

Percebe-se pela cinética da fermentação que, após o consumo total da glicose, a levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773 fermentou a xilose convertendo-a em etanol, o que é atestado pelo aumento verificado na concentração desse álcool no período de 4 a 8

horas. No entanto, a eficiência de conversão nesse intervalo de tempo ficou em 49,8% para o hidrolisado e 61% para o meio controle.

Tabela 30: Parâmetros após 8 horas de fermentação do hidrolisado e do meio controle pela levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 5773. $\Delta S - \text{Gli} \rightarrow$ consumo de glicose; $\Delta S - \text{Xil} \rightarrow$ consumo de xilose; Etanol Máx. $\rightarrow$ concentração máxima de etanol; $Y_{\text{Et/S}} \rightarrow$ rendimento em etanol; $Y_{\text{Et}} \rightarrow$ Eficiência de conversão de açúcares em etanol; $Q_p \rightarrow$ produtividade volumétrica; $Y_{\text{X/S}} \rightarrow$ rendimento em biomassa; $Y_{\text{G/S}} \rightarrow$ rendimento em glicerol.

Ensaio	$\Delta S - \text{Gli}$ (g/L)	$\Delta S - \text{Xil}$ (g)	Etanol Máx. (g/L)	$Y_{\text{Et/S}}$ (g/g)	Y_{Et} (%)	Q_p (g/(L.h))	$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)	Y_{G} (g/g)
Hidrolisado	19.58	5.34	10.24	0.41	80.41	1.3	0.12	0.05
Controle	18.17	4.44	9.83	0.43	85.08	1.2	0.15	0.04

Com 8 horas de fermentação, a concentração de etanol atingiu valores máximos de 10,24 g/L no hidrolisado e 9,83 g/L no meio controle. A partir deste tempo de amostragem até o final do processo, a concentração de etanol não registrou alterações significativas, tendo apenas uma diminuição de 2,5% no hidrolisado e um ligeiro aumento de 0,5% no meio controle, mesmo perante consumos de xilose de 3,35 g/L e 3,82 g/L, respectivamente. Tudo indica que o metabolismo de xilose foi desviado para a produção de biomassa que registrou, nesse intervalo, aumentos de 2,51 g/L no hidrolisado e 0,96 g/L no meio controle. Esta afirmação é apoiada pelos trabalhos de Du Preez (1994) e de Silva *et al.* (2012) em que mostraram que as condições operacionais e a disponibilidade de oxigênio são cruciais para a conversão de xilose a etanol por *S. (P.) stipitis*, uma vez que esses fatores determinam a partição do fluxo de carbono entre crescimento em biomassa e formação desse produto. Outrossim, a formação de glicerol ao longo da fermentação foi relativamente baixa, chegando a concentrações máximas de 1,04 g/L e 0,91 g/L no hidrolisado e no meio controle, respectivamente. Esta baixa formação de glicerol, como já foi referido, está associado ao nível de *stress* provocado por inibidores e, neste trabalho, como pode ser visto nos gráficos A e B da Figura 33, a formação deste composto é praticamente semelhante no hidrolisado e no meio controle, o que deu a entender que o nível de toxicidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço pré-tratado na condição otimizada é muito reduzida e semelhante ao verificado no meio semissintético usado como controle. Esta proposição pode ser assegurada pelos parâmetros fermentativos mostrados na Tabela 30, onde se pode ver que não houve diferenças consideráveis nos rendimentos de etanol e biomassa. No entanto, há que notar que, em comparação com a fermentação por *S. cerevisiae* PE-2, a eficiência de conversão de açúcares em etanol por *Scheffersomyces*

(*Pichia stipitis* CBS 5773 ficou em 80,41 para o hidrolisado e 85,08 para o meio controle, o que indica que parte dos açúcares assimilados por esta levedura foi desviada para outras vias metabólicas, resultando, por exemplo, na acumulação de biomassa.

Em suma, os testes com o hidrolisado enzimático do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino mostraram que não há diferenças significativas de fermentabilidade em comparação com meio semissintético contendo glicose e xilose puras o que aponta uma grande potencialidade do pré-tratamento empregue neste trabalho em produzir substrato pré-tratado com alta digestibilidade enzimática e hidrolisados tão fermentáveis quanto meios contendo açúcares puros.

6. Conclusões

O desenvolvimento deste projeto de pesquisa permitiu concluir que:

- O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho apresentou composição química similar à encontrada em diversos trabalhos que utilizaram a mesma matéria-prima e foi considerado satisfatório e adequado no âmbito da produção de etanol celulósico;
- O pré-tratamento com sulfito neutro se mostrou eficaz na preservação da celulose na fração sólida da reação. Contudo, com o aumento da drasticidade das condições do pré-tratamento a perda de xilanas superou a retirada de lignina e aumentou a degradação e perda dos componentes solubilizados para compostos não identificados.
- O pré-tratamento com sulfito alcalino, além de preservar a celulose quase integralmente na fração sólida, apresentou uma elevada seletividade para a solubilização da lignina que atingiu 76,7%. As xilanas foram bastante preservadas na fração sólida, tendo perdido no máximo 35,4% do seu conteúdo determinado no bagaço *in natura*, sendo uma boa parte desta perda respeitante aos grupos acetil e arabinosil.
- Ambos os processos de pré-tratamento com sulfito mostraram efetividade no enriquecimento do teor de celulose no bagaço pré-tratado assim como também uma considerável retirada de hemicelulose e lignina, ainda assim, o sulfito alcalino foi muito mais efetivo na preservação de carboidratos e na solubilização de lignina.
- O pré-tratamento com sulfito alcalino forneceu substratos pré-tratados ricos em carboidratos e contendo baixo teor de lignina o que é o ideal no contexto do bioetanol lignocelulósico, uma vez que, garante um alto rendimento, uma melhor digestibilidade com baixa carga enzimática e insignificante formação de inibidores de processos enzimáticos e fermentativos.
- Utilizando uma baixa carga enzimática, os rendimentos da hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados com sulfito alcalino aumentaram consideravelmente da condição mais branda para a condição mais severa, chegando a valores máximos de 79,91% e 70,69% para celulose e xilanas, respectivamente.

- Verificou-se uma correlação direta positiva da deslignificação e retirada de xilanas com a digestibilidade enzimática dos substratos pré-tratados. Todavia, coeficientes de determinação (R^2) relativamente baixos indicaram que a sacarificação dos polissacarídeos do bagaço pré-tratado não é explicada simplesmente pela deslignificação e retirada de xilanas.
- O fator de severidade catalítica (Log So), em comparação com o índice de severidade (Log Ro) de Overend *et* Chornet (1987) e a severidade combinada (Log Ro'), se mostrou o mais adequado quando se pretende prever ou estimar os efeitos de pré-tratamentos com sulfito alcalino sobre as proporções de lignina e de xilanas remanescentes no substrato pré-tratado. No entanto, os três modelos de severidade apresentaram uma considerável falta de correlação com os rendimentos de recuperação dos açúcares.
- Considerando o rendimento global, que integra os rendimentos das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, a condição ótima de pré-tratamento, dentro dos intervalos estudados, foi aquela que combinou o máximo de aproveitamento dos açúcares fermentescíveis presentes na matéria-prima com o mínimo de investimento energético, ou seja, 10% sulfito alcalino, 150°C por 30 a 45 min.
- A condição ótima para pré-tratamento foi melhor definida pela análise do rendimento global de recuperação de glucanas e esta decisão foi confirmada pela análise estatística, que corroborou os valores assumidos empiricamente.
- O hidrolisado enzimático do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado na condição considerada ótima não apresentaram diferenças significativas de fermentabilidade em comparação com meio semissintético contendo glicose e xilose puras o que aponta uma grande potencialidade do pré-tratamento empregue neste trabalho em produzir substrato pré-tratado com alta digestibilidade enzimática e hidrolisados tão fermentáveis quanto meios sintéticos.

Referências

- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v.57, p.67-72, 2004.
- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v.29, p.675-85, 2011.
- AITKEN, K.S.; McNEIL, M. Diversity analysis. In: HENRY, R.J.; KOLE, C. (Eds.). **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. New Hampshire: Science Publishers, p.19-42, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.
- AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion and Management**, v.50, p.1834-1840, 2009.
- ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A.; DUARTE, F.M.; NETTO, O.V.; MISSAWA, S.K.; GALZERANI, F. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v.19, n.12, p.2258-70, 2009.
- BABCOCK, L.W. **Fermentable sugar from wood**. U.S. Patent no.1825464, 1932.
- BACH, W. Fossil fuel resources and their impacts on environment and climate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.6, p.185-200, 1980.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.858-875, 2011.
- BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; CABANAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from steam explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.130, p. 278–88, 2006.
- BARNETT, J.A. The utilization of sugars by yeasts. **Adv Carbohydr Chem Biochem** v.32, p.126–228, 1976.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.; OLIVEIRA, A.; LOPES, M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v.8, p.1155-1163, 2008.
- BEDARD, R. **Power and energy from the ocean energy waves and tides: a primer**. US Electric Power Research Institute, May, 2007.
- BERNDES, G.; HOOGWIJK, M.; van den BROEK, R. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass and Bioenergy**, v.25, p.1-28, 2003.
- BOTHA, T.; von BLOTTNITZ, H. A comparison of the environmental benefits of bagasse-derived electricity and fuel ethanol on a life-cycle basis. **Energy Policy**, v.34, p.2654-2661, 2006.
- BP - British Petroleum. **Statistical review of world energy 2012**. Disponível em: <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Statistical-Review-2012/statistical_review_of_world_energy_2012.pdf> a 14 de Julho de 2013.
- BP - British Petroleum. **Statistical Review of World Energy, 2010**. BP, London, UK. Disponível em: <<http://www.bp.com/statisticalreviews>> a 30 de Julho de 2013.

- BRANDON, S.K.; EITEMAN, M.A.; PATEL, K.; RICHBOURG, M.M.; MILLER, D.J.; ANDERSON, W.F.; PETERSON, J.D. Hydrolysis of Tifton 85 bermuda grass in a pressurized batch hot water reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, n.4, p.505-512, 2008.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p.199-204, 2009.
- BRYSON, R.A. A perspective on climatic change. **Science**, v.184, p.753-760, 1974.
- CAI, Z.S.; PASZNER, L. Salt catalyzed wood bonding with hemicelluloses. **Holzforschung**, v.42, p.11-20, 1988.
- CARA, C.; RUIZ, C.; OLIVA, J.M.; SAEZ, F.; CASTRO, E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Bioresource Technology**, v.99, p.1869-1876, 2008.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, p.4754-4766, 2010.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.849-864, 2008.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v.32, p.2191-2195, 2009.
- CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.15, p.1-8, 2009.
- CEER - Conselho Europeu de Energia Renovável. **Revolução Energética - um caminho Sustentável para o Futuro de Energia Limpa**, 2006.
- CERQUEIRA, D.A.; RODRIGUES, G.; MEIRELES, C.D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.579-582, 2007.
- CHANDEL, A.K.; DA SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.11-20, 2012.
- CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochem. Biotechnology**, v.86, p.5-37, 2000.
- CHAPMAN, I. The end of Peak Oil? Why this topic is still relevant despite recent denials. **Energy Policy**, v.64, p.93-101, 2014.
- CHEN, X.; SHEKIRO, J.; ELANDER, R.; TUCKER, M. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.51, n.1, p.70-76, 2012.
- CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.105-109, 2008.
- CHIARI, L.; ZECCA, A. Constraints of fossil fuels depletion on global warming projections. **Energy Policy**, v.39, p.5026-5034, 2011.
- CHUM, H.L.; JOHNSON, D.K. BLACK, S.K.; OVEREND, R.P. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24-25, n.1, p.1-14, 1990.
- COLLINS, T.T. **Sodium sulphite liquor recovery**. US Pat. 2993753 A, 25 July 1961.

CORCORAN, B.A.; HENRY, J.C.; RICE, R.R.; RISMANI-YAZDI, H.D.; CHRISTY, A.D. Cellulosic ethanol from sugarcane bagasse using rumen microorganisms. **ASABE Annual International Meeting**, Providence, Rhode Island, USA, 2008.

COUGHLAN, M.P.; LJUNGDAHL, G. **Biochemistry and genetics of cellulose degradation**. London: Academic Press, 1988, p.11-30.

CUNHA, H.C.M. **Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré-tratado pó explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos**. 196p, 2005. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, , 2005.

DAMARTZIS, T.; ZABANIOTOU, A. Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.366-378, 2011.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987, p.7-84.

DANTAS, G.A.; LEGEY, L.F.L.; MAZZONE, A. Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.21, p.356-364, 2013.

DEMIRBAS A. Progress and recent trends in bio-fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.33, n.1, p.1–18, 2007b.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v.21, p.327-337, 2005.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v.35 p.4661-4670, 2007a.

DEMIRBAS, A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. **Energy Source B**, v.3, p.177-85, 2008

DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.258-66, 2003.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzym Microb Tech**, v.16, p.944-56, 1994.

EC - European Commission. **Establishing guidelines for the monitoring and reporting of green house gas emissions pursuant to Directive 2003/87/EC of European Parliament and of the Council**, 2004.

ECOFYS. Effects of new fossil fuel developments on the possibilities of meeting 2°C Scenarios - Final Report. Netherlands, 2012.

EIA - Energy Information Administration. **International Energy Outlook, 2010**. Washington, 2010.

EIA - Energy Information Administration. **International Energy Outlook 2012**. Washington, 2012.

EPA - Environmental Protection Agency. **Atmospheric emissions from the pulp and paper manufacturing industry**, EPA-450/1-73-002. Research Triangle Park, NC, September 1973.

EPA - Environmental Protection Agency. **Background document: acid sulfite pulping**, EPA-450/3-77-005, Research Triangle Park, NC, January 1977.

ERB, K.; HABERL, H.; PLUTZAR, C. Dependency of global primary bioenergy crop potentials in 2050 on food systems, yields, biodiversity conservation and political stability. **Energy Policy**, v.47, p.260-9, 2012.

- ESCOBAR, J.C.; LORA, E.S.; VENTURINI, O.J.; YÁÑEZ, E.E.; CASTILLO, E.F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p.1275-1287, 2009.
- 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**, v.59, p.129-136, 1997.
- ESTEVES, P.J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 93p., 2011. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, EEL/USP, Lorena, 2011.
- FAGA, B.A.; WILKINS, M.R.; BANAT, I.M. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D(5)A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Bioresource Technology**, v.101, n.7, p.2273-2279, 2010.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Food and agricultural commodities production**: Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: 13 Dezembro de 2014.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.
- FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v.74, p.201-212, 2000.
- FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; OTONI, W.C.; JOSHI, C.P. Structure, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.19, p.1-13, 2007.
- FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.339-54, 2008.
- FOUQUET, R.; PEARSON, P.J.G. Past and prospective energy transitions: insights from history. **Energy policy**, v.50, p.1-7, 2012.
- GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A. The impacts of combustion emissions on air quality and climate: from coal to biofuels and beyond. **Atmospheric Environment**, v.43, p.23-36, 2009.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.70-78, 2012.
- GÁMEZ, S.; GONZALEZ-CABRIALES, J.J.; RAMIREZ, J.A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, v.74, p.78-88, 2006.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59 p.257-268, 1987.
- GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775-800, 2010.
- GIVENS, J.E.; JORGENSEN, A.K. The effects of affluence, economic development, and environmental degradation on environmental concern: a multilevel analysis. **Organization & Environment**, v.24, p.74-91, 2011.
- GOLDEMBERG, J. The brazilian biofuels industry: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, p.1-7, 2008.
- GOMEZ, L.D.; CLARE, G.S.; MCQUEEN-MASON, J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v.178, p.473-85, 2008.

GÓMEZ, S.M.; ANDRADE, R.R.; SANTANDER, C.G.; COSTA, A.C.; MACIEL FILHO, R. Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**, v.20, p.321-326, 2010.

GOYAL, H.B.; SEAL, D.; SAXENA, R.C. Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, p.504-517, 2008.

GROUS, W.R.; CONVERSE, A.O.; GRETHLEIN, H.E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme and Microbial Technology**, v.8, p.274-80, 1986.

GRUBLER, A. Energy transitions. In **Encyclopedia of Earth**. C.J. Cleveland (ed.), Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment, Washington, DC, 2008.

GRUBLER, A.; JOHANSSON, T.B.; NAKICENOVIC, N.; PACHAURI, S.; RIAHI, K.; ROGNER, H.-H.; STRUPEIT, L. Chapter 1 - Energy Primer. In: Global energy assessment: toward a sustainable future, Vienna, Austria and Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, 2012, cap.1.

GU, F.; WANG, W.; JING, L.; JIN, Y. Sulfite-formaldehyde pretreatment on rice straw for the improvement of enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v.142, p.218-24, 2013.

GUPTA, K.K.; REHMAN, A.; SARVIYA, R.M. Bio-fuels for the gas turbine: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.2946-2955, 2010.

GWEC – Global wind energy council. **Global Wind Report 2010**. GWEC, Brussels: 2011.

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

HASSAN, M.H.; KALAM, M.A. An overview of biofuel as a renewable energy source: development and challenges. **Procedia Engineering**, v.56, p.39-53, 2013.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v.47, p.1287-1294, 2012.

HEARLE, J.W.S. A fringed fibril theory of structure in crystalline. **Journal of Polymer Science**, v.28, p.432-435, 1958.

HEITZ, M.; CAPEK-MÉNARD, E.; KOEBERLE, P.G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E.; HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HEITZ, M.; CAPEK-MÉNARD, E.; KOEBERLE, P.G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P.; TAYLOR, J.D.; YU, E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II Technology. **Bioresource Technology**, v.35, p.23-32, 1991.

HENDRICKSON, E.R.; ROBERSON, J.E.; KOOGLER, J.B. Control of atmospheric emissions in the wood pulping industry, Volume I, HEW Contract Number CPA-22-69-18, U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC, March 15, 1970.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: HENRIKSSON, G.; EK, M.; GELLERSTED, G. **Wood chemistry and wood biotechnology**. Berlin: De Gruyter, 2009, v.1, Cap.6, p.121-145.

HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. Florida: Academic Press, 1985, 679p.

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**, v.315, p.804-7, 2007.

HINDLE, B.; LUBAR, S. **Engine's of change: the american industrial revolution, 1790-1860**. Washington, D.C., Smithsonian Institution Press, 1986.

HOEL, M.; KVEMDOKK, S. Depletion of fossil fuels and the impacts of global warming. **Resource and Energy Economics**, v.18, p.115-136, 1996.

HOFSETZ, K.; SILVA, M.A. Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p.564-573, 2012.

HÖÖK, M.; Li, J.; Johansson, K.; Snowden, S. Growth rates of global energy systems and future outlooks. **Natural Resources Research**, v.21, n.1, p.23-41, 2012.

HÖÖK, M.; TANG, X. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change: a review. **Energy Policy**, v.52, p.797-809, 2013.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.602-19, 2003.

ICIDCA - Instituto cubano de pesquisa de derivados de cana-de-açúcar /GEPLACEA/PNUD. **Manual de los derivados de la caña de azúcar**. 2.ed. México, 1990.

IDREES, M.; ADNAN, A.; QURESHI, F.A. Optimization of sulfide/sulfite pretreatment of lignocellulosic biomass for lactic acid production. **BioMed Research International**, p.1-11, 2013.

IEA - International Energy Agency. **Key world energy statistics 2011**. Disponível em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key_world_energy_stats.pdf> acesso em 6 de Fevereiro de 2015.

IEA, International Energy Agency. **Key world energy statistics 2012b**. Disponível em: <<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>> acesso em 6 de Fevereiro de 2015.

IEA - International Energy Agency. **Renewables information 2012**, Paris, France, p.33, 2012a.

IEA - International Energy Agency. **World Energy Outlook 2009**. Paris, France, 2009.

IPCC - Intergovernmental panel on climate change. **Climate Change, 2007**. Fourth Assessment Report. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr.pdf> acesso em de Fevereiro de 2015.

IPCC - Intergovernmental panel on climate change/SRREN. **Special report on renewable energy sources and climate change mitigation**. Report prepared and released by the IPCC. Cambridge: Cambridge University Press, May 2011.

SANTI Jr., C.S; MILAGRES, A.M.F; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. The effects of lignin removal and drying on the porosity and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose**, v.20, p.3165-3177, 2013.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pre-treatment for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.14, p.277-87, 1998.

KADAM, K.L. Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India. **Energy Policy**, v.30, p.371-384, 2002.

KANG, S.; LI, X.; FAN, J.; CHANG, J. Hydrothermal conversion of lignin: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p.546-558, 2013.

KATAHIRA, S.; MIZUIKE, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose and cellobiosaccharide-assimilating yeast strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p.1136-43, 2006.

- KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, v.100, p.1515-23, 2009.
- KHRISTOVA, P.; KORDSACHIA, O.; PATT, R. ; KARAR, I.; KHIDER, T. Environmentally friendly pulping and bleaching of bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.23, p.131-139, 2006.
- KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; SIMMONS, B.A.; BLANCH, H.W. Techno-economic analysis of a lignocellulosic ethanol biorefinery with ionic liquid pre-treatment. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.5, p.562-569, 2011.
- KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar J.**, v.106, p.147-150, 2004.
- KNILL, C.J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.51, n.3, p.281-300, 2003.
- KONUR, O. The scientometric evaluation of the research on the production of bioenergy from biomass. **Biomass and Bioenergy**, v.47, p.504-15, 2012.
- KRALOVA, I.; SJÖBLOM, J. Biofuels-renewable energy sources: a review. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, n.3, p.409-25, 2010.
- KÜÇÜK, M.M.; DEMIRBAS, A. Biomass conversion processes. **Energy Conversion and Management**, v.38, n.2, p.151-165, 1997.
- KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.48, p.3713-3729, 2009.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.377-391, 2008.
- LALUCE, C.; SCHENBERG, A.C.G.; GALLARDO, J.C.M.; CORADELLO, L.F.C.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S.R. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol; a review. **Appl Biochem Biotechnol**, v.166, p.1908–1926, 2012.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v.81, p.33-44, 2002.
- LEE, D.; OWENS, V.N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. **Composition of herbaceous biomass feedstocks**. Brookings: South Dakota State University Publication, 2007.
- LEE, Y.-J. **Oxidation of sugarcane bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide**. 2005. Masters Thesis - Louisiana State University, 2005.
- LEFF, E. **Saber ambiental**. São Paulo: Vozes, 1998.
- LI, M.F.; FAN, Y.M.; XU, F.; SUN, R.C.; ZHANG, X.L. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: characterization of the cellulose rich fraction. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.551-9, 2010.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.449-467, 2012.
- LOH, Y.R.; SUJAN, D.; RAHMAN, M.E.; DAS, C.A. Sugarcane bagasse - the future composite material: a literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v.75, p.14-22, 2013.

- LONG, H.; LI, X.; WANG, H.; JIA, J. Biomass resources and their bioenergy potential estimation: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.26, p.344-352, 2013.
- LOVELADY, J.S.; CLINE, T.; WYNN, D.W.; VENKATESH, V. Chemical recovery in an NSSC mill: startup experience with a new process at mead's stevenson mill. **TAPPI - Pulping Conference**, v.1, 1999.
- LU, X.B.; ZHANG, Y.M.; YANG, J.; LIANG, Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering & Technology**, v.30, n.7, p.938-944, 2007.
- LUND, J.W.; FREESTON, D.H.; BOYD, T.L. Direct utilization of geothermal energy 2010 - worldwide review. **Geothermics**, v.40, n.3, p.159-180, 2011.
- LYND, L.R., VAN ZYL, W.H., MCBRIDE, J.E., LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-83, 2005.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIOUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506-577, 2002.
- MABEE, W.E.; GREGG, D.J.; ARATO, C.; BERLIN, A.; BURA, R.; GILKES, N. Updates on softwood-to-ethanol process development. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.129-132, p.55-70, 2006.
- MAGGIO, G.; CACCIOLA, G. When will oil, natural gas, and coal peak? **Fuel**, v.98, p.111-123, 2012.
- MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v.15, p.804-816, 1999.
- MASON, W.H. **Apparatus for and process of explosion fibrillation of lignocellulosic material**. U.S. Patent no. 1655618, v.1, p.618-655, 1928.
- MATTOS, L.R. **Separação dos constituintes do bagaço de cana por explosão a vapor na presença de ácido sulfúrico diluído**. 2000. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, 2000.
- McDOUGALL, G.J.E.A. Plant fibers: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.62, p.1-20, 1993.
- McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. (Eds.), **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994, p.292-324.
- MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v.27, n.2, p.395-401, 2011.
- MES-HARTREE, M.; DALE, B.E.; CRAIG, W.K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.462-468, 1988.
- MILLER, L. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MOHAI, P.; SIMÕES, S.; BRECHIN, S.R. Environmental concerns, values and meanings in the Beijing and Detroit metropolitan areas. **International Sociology**, v.25 n.6, p.778-817, 2010.
- MOISER, N.S.; HALL, P.; LADISCH, C.M.; LADISCH, M.R. Reaction kinetics, molecular action and mechanisms of cellulosic proteins. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.65, p.23-40, 1999.

MONICA, E.; GELLERSTEDT, G; HENRIKSSON, G. **Wood chemistry and biotechnology**. Berlin: Pulp and Paper Chemistry and Technology, Vol. 1. De Gruyter, 2009, p.245-270.

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p.77-93, 2013.

MOONEY, C.A.; MANSFIELD, S.D.; TOUHY, M.G.; SADDLER, J.N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v.64, p.113-119, 1998.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v.96, n.18, p.1986-1993, 2005a.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005b.

MOZAMBANI, A. E. *et al.* História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Cadernos Planalsucar, 2006, Cap.2, p.11-18.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, n.2, p.124-129, 2008.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.578-97, 2010.

NAKICENOVIC, N.; GRUBLER, A.; MCDONALD, A. **Global Energy Perspectives**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

NASA-GISS - Goddard institute for space studies. **Surface temperature analysis**. Disponível em: <http://climate.nasa.gov/key_indicators#globalTemp> acesso em 11 de Dezembro de 2013.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, n.1, p.52-68, 2011.

NISHIYAMA, Y.; SUGIYAMA, J.; CHANZY, H.; LANGAN, P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose from synchrotron X-Ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, p.14300-14306, 2003.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDEN, G. A short review on SSF: an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, p.1-14, 2008.

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

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

OVEREND, R.P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions for the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences Philos.** v. 321, p. 523-536, 1987.

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

- PANWAR, N.L.; KAUSHIK, S.C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.1513-1524, 2011.
- PEDERSEN, M.; MEYER, A.S. Lignocellulose pretreatment severity: relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v.27, n.6, 2010.
- PEDERSEN, M.; VIKSØ-NIELSEN, A.; MEYER, A.S. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to pH and catalyst type during mild thermal pretreatment. **Process Biochemistry**, v.45, n.7, p.1181-1186, 2010.
- PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R.-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v.30, p.879-903, 2012.
- PENG, F.; REN, J.L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R.C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.14, p.6305-6317, 2009.
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Ed. Amiga Digital UFRJ, 2008. Series on biotechnology, v.2, p.45.
- PETTERSEN, R.C. The chemical composition of wood. In: Rowell RM, (Ed.). **The chemistry of solid wood**. Washington, DC: American Chemical Society, 1984. Advances in chemistry series, v.207, p.115-6.
- RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 447p, 2010. Tese (Doutorado) - UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.
- RECZEY, V.K.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113-116, p.509-23, 2004.
- REVELLE, R.; BROECKER, W.; CRAIG, H.; KNEELING, C.D.; SMAGORINSKY, J. **Restoring the quality of our environment**: report of the environmental pollution panel. Washington: President's Science Advisory Committee, The White House, 1965, p.317.
- RICE, J.F.; SULLIVAN, T.R.; HELBERT, J.R. A rapid method for the determination of yeast dry weight concentration. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.38, p.142-145, 1980.
- ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p.274-279, 2012.
- RODRIGUES, R.C.; ROCHA, G.J.; RODRIGUES, D.; FILHO, H.J.; FELIPE, M.G.; PESSOA, A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v.101, n.4, p.1247-1253, 2010.
- RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T., *et al.* Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1573-86, 2011.
- ROMANI, A.; GARROTE, G.; ALONSO, J.L.; PARAJO, J.C. Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. **Bioresource Technology**, v.101, n.22, p.8706-8712, 2010.
- ROURKE, F.O.; BOYLE, F.; REYNOLDS, A. Tidal energy update 2009. **Applied Energy**, v.87, n.2, p.398-409, 2010.

RÜHL, C.; APPLEBY, P.; FENNEMA, J.; NAUMOV, A.; SCHAFFER, M. Economic development and the demand for energy: a historical perspective on the next 20 years. **Energy Policy**, v.50, p.109-116, 2012.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-91, 2003.

SAHA, B.C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. **ACS Symposium Series**, v.889, p.2-34, 2004.

SAMI, M.; IKEDA, M.; YABUUCHI, S. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.78, p.212-216, 1994.

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

SANJUAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pitch and fiber from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und weckstoff**, v.59, p.447-450, 2001.

SANTOS, M.F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M.A. O complexo agroindustrial da cana-de-açúcar no Brasil: uma discussão sobre aspectos atuais relacionados ao etanol biocombustível. **Economia & Tecnologia**, v. 24, 2011.

SANTOS, J.R.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, p.1-5, 2010.

SANTOS, V.T.O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. 2010. 101p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

SELIG, M.J.; VIAMAJALA, S.; DECKER, S.R.; TUKER, M.P.; HIMMEL, M.E. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v.23, p.1333-1339, 2007.

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

SHAFIEE, S.; TOPAL, E. When will fossil fuel reserves be diminished? **Energy Policy**, v.37, p.181-189, 2009.

SHI, X.Q.; JEFFRIES, T.W. Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a URA1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.339-45, 1998.

SILVA, C.H.C.; PULS, J.; DE SOUSA, M.V.; FILHO, E.X.F. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Reviews Microbiology**, v.30, p.114-9, 1999.

SILVA, F.T. **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. 1995.106p. Tese (Doutorado) - UNICAMP/Instituto de Química, Campinas, 1995.

SILVA, F.V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.13, n.20, p.44-57, 2012.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v.37, p.259-265, 2012.

- SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.
- SIMPSON-HOLLEY, M.; HIGSON, A.; EVANS, G. Bring on the biorefinery. **Chemical engineering**, v.795, p.46–9, 2007.
- SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v.101, p.1570-80, 2010.
- SJOSTROM, E. **Wood Chemistry. Fundamentals and applications**. San Diego: Academic press, p.130, 1993.
- SMIL, V. World history and energy. **Encyclopedia of Energy**. Manitoba: University of Manitoba, 2004, v.6.
- SNYDER, C.S.; BRUULSEMA, T.W.; JENSEN, T.L.; FIXEN P.E. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.133, p.247-266, 2009.
- SRES - **Special Report on Emissions Scenarios**. Report prepared for the Third Assessment Report, 2000. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/ipccreports/sres/emission/index.php?idp=0>> acesso em 10 de Dezembro de 2014.
- STEVENS, D.J.; WORGETTEN, M.; SADDLER, J. Biofuels for transportation: an examination of policy and technical issues. Canada: Liquid Biofuels, 2004. **IEA Bioenergy Task 39**,. Final Report 2001-2003.
- SUN, F.; CHEN, H. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. **Bioresource Technology**, v.99, p.6156-61, 2008.
- SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrates polymers**, v.56, p195-204, 2004.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p.1-11, 2002.
- SWATLOSKI, R.P.; SPEAR, S.K.; HOLBREY, J.D.; ROGERS, R.D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, n.18, p.4974–5, 2002.
- SZCZODRAK, J.; TARGONSKI, Z. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.300-3, 1988.
- SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.10, p.367-375, 1996.
- TAHERZADEH, M. **Ethanol from lignocelulósic: physiological effects of inhibitors and fermentation strategies**. Göteborg: Chalmers University of Technology, 1999.
- TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p.1621-1651, 2008.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v.2, p.472-499, 2007a.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResource**, v.2, p.707-738, 2007b.

TALEBNIA, F. **Ethanol production from cellulosic biomass by encapsulated *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. PhD thesis - Department of Chemical and Biological Engineering - Chalmers University of Technology, 2008.

TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p.364-370, 1997.

TEIXEIRA, L.H. **Mapeamento funcional em cana-de-açúcar utilizando ESTS como marcadores moleculares**. 2006. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 2006.

THAMSIRIROJ, T.; MURPHY, J.D. A critical review of the applicability of biodiesel and grass biomethane as biofuels to satisfy both biofuel targets and sustainability criteria, **Applied Energy**, v.88, p.1008–1019, 2011.

TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Adsorption of cellulase on cellulytic enzyme lignin from lodgepole pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.7771-778, 2009.

UN – United Nations. **United Nations Framework Convention on Climate Change**, 1992. Disponível em: <<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/conveng.pdf>> acesso em 30 de Julho de 2013.

VAN MARIS, A.J.A.; ABBOTT, D.A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, p.391-418, 2006.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, v.102, p.7119-7123, 2011.

VEZIROGLU, T.N.; SAHIN, S. 21st Century's energy: hydrogen energy system. **Energy Conversion and Management**, v.49, p.1820-1831, 2008.

VIJAYAVENKATARAMAN, S.; INIYAN, S.; GOIC, R. A review of climate change, mitigation and adaptation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.878- 897, 2012.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v.102, p.6254–9, 2011.

WANG, G.S.; PAN, X.J.; ZHU, J.Y.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnology Progress**, v.25, n.4, p.1086-1093, 2009.

WANG, P.Y.; SCHNEIDER, H. Growth of yeasts on d-xylulose. **Can J Microbiol** v.26, p.1165–1168, 1980. WEIL, J.; BREWER, M.; HENDRICKSON, R.; SARIKAYA, A.; LADISCH, M.R. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, n.2, p.99-111, 1998.

WILLIAMS, J.C. **History of Energy**. The Franklin Institute, April 25, 2006. Disponível em: <<http://www.fi.edu/learn/case-files/energy.html>> acesso em 24 de Julho de 2013.

WRIGHT, J.D. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Progress**, v.84, n.8, p.62-74, 1998.

WU, F.; ZHANG, D.; ZHANG, J. Will the development of bioenergy in China create a food security problem? Modeling with fuel ethanol as an example. **Renewable Energy**, v.47, p.127-34, 2012.

- XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL, M.E. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.364-71, 2009.
- XUAN, J.; LEUNG, M.K.H.; LEUNG, D.Y.C.; NI, M. A review of biomass-derived fuel processors for fuel cell systems. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p.1301-1313, 2009.
- YAN, M.F.; YANG, D.J.; DENG, Y.H.; CHEN, P.; ZHOU, H.F.; QIU, X.Q. Influence of pH on the behavior of lignosulfonate macromolecules in aqueous solution. **Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.** v.371, p.50–58, 2010.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** v.86, p.89–95, 2004.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuel. Bioprod. Bior.**, v.2, p.26–40, 2008.
- YU, Z.; JAMEEL, H.; CHANG, H.; PARK, S. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.102, p.9083–9089, 2011.
- YUKSEL, I.; KAYGUSUZ, K. Renewable energy sources for clean and sustainable energy policies in Turkey. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.4132-4144, 2011.
- ZHANG, D.S.; YANG, Q.; ZHU, J.Y.; PAN, X.J. Sulfite (SPORL) pretreatment of switchgrass for enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v.129, p.127-134, 2013.
- ZHANG, Y., CHEN, H. Multiscale modeling of biomass pretreatment for optimization of steam explosion conditions. **Chemical Engineering Science**, v.75, p.177-182, 2012.
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-81, 2006.
- ZHANG, Y.-H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.8, n.7, p.797-824, 2004.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3729-3736, 2008.
- ZHU, J.Y.; PAN, X.J.; WANG, G.S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresour Technol.**, v.100, p.2411-2418, 2009.
- ZHUANG, J.; MARCHANT, M.A.; NOKES, S. E. STROBEL, H J. Economic analysis of cellulose production methods for bio-ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v.23, p.679-687, 2007.