UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

VINÍCIUS FERNANDES NUNES DA SILVA

**Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de
resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção
de etanol celulósico**

Lorena
2009

VINÍCIUS FERNANDES NUNES DA SILVA

**Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de
resíduos agroindustriais como etapas no processo de
obtenção de etanol celulósico**

**Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Conversão de Biomassa.**

Orientador: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha

Lorena
2009

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.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Silva, Vinícius Fernandes Nunes da

Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico; orientador George Jackson de Moraes Rocha. – Lorena: 2009.

116 pág.: fig.

Dissertação (Mestre 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.

1. Biomassa vegetal (Pré-tratamento) 2. Etanol celulósico 3. Hidrólise enzimática 4. Fermentação. I. Título

620.97 - CDU

*Dedico esta dissertação aos meus pais Néelson
e Lusmarina, meus irmãos Pétersson e Stéfanni,
e aos meus avós João e Guiomar, pelo
carinho, amor e apoio constante.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela fé e coragem em sempre lutar pelos meus objetivos.

À minha família e aos amigos de Santa Fé do Sul-SP, que mesmo estando distantes me proporcionaram estímulo, apoio e confiança.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, por tornar possível a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha, pela orientação, aprendizado, paciência e principalmente pela grande amizade, desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves e à Dra. Maria Teresa Borges Pimenta, pelas grandes contribuições dadas a essa dissertação.

Ao Prof. Dr. Márcio de Paula, do Instituto de Química de São Carlos da USP, e ao Prof. Dr. Durval Rodrigues, da EEL/USP, pelo suporte nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Paulo Suzuki, pelo acompanhamento e discussão dos resultados das análises de difratometria de raios X.

À Prof. Dra Maria das Graças de Almeida Felipe e à MSc Priscila Vaz, pelo auxílio na realização dos ensaios de fermentação.

Ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pela disponibilidade de seus laboratórios na realização de uma parte dos ensaios de pré-tratamento.

À Empresa Novozymes Latin America Ltda, pelo fornecimento das enzimas utilizadas neste trabalho.

À Claudia, pelo apoio, confiança e carinho de sempre.

Aos colegas de laboratório Alessandra, Allan, André, Andréa, Carol, Fernanda Carvalho, Fernando (Pernambuco), Larissa, Luis, Marcelo, Naila, Patrícia, Priscila, Rafael, Simone, pela presença, colaboração e momentos de descontração no ambiente de trabalho.

À Cibele, José Carlos, Jussara e Osnil, pelo auxílio técnico no laboratório.

Aos colegas do Departamento de Biotecnologia, Adriana, Boutros, Bruno Guedes, Carol, Cláudio, Fernando (Budáia), Fernanda, Flávio, Germano, Guilherme, Gina, Giovanni Mafra, Josi, Juan, Juliana, Michel, Paula, Robson, Rondinelli, Sérgio, Taís, Víctor, Wagner, pela convivência e os bons momentos ao longo desta jornada.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

A utilização de resíduos agroindustriais como fontes lignocelulósicas para a obtenção de diversos insumos químicos é uma alternativa para contribuir para a valorização destes subprodutos. Neste contexto, o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos torna-se uma opção interessante para aumentar a produção deste combustível sem aumentar a área plantada das colheitas utilizadas para sua produção, já que a demanda de etanol vem aumentando cada vez mais nos últimos anos, com o objetivo de substituir o petróleo e seus derivados, contribuindo significativamente para a redução dos impactos negativos ao meio ambiente, tais como o aquecimento global provocado pela queima dos combustíveis fósseis. Para que a produção de etanol celulósico seja economicamente viável é necessário que estas fontes lignocelulósicas sejam fracionadas de forma a disponibilizar a maior quantidade de carboidratos possível para o processo de fermentação alcoólica. Neste trabalho propôs-se avaliar a sacarificação enzimática dos materiais, palha de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar e pseudocaule de bananeira, nas formas “in natura”, pré-tratada e deslignificada de forma a verificar o efeito do pré-tratamento e da deslignificação no aumento da conversão enzimática da celulose de cada biomassa vegetal. Todos os materiais lignocelulósicos foram caracterizados quimicamente nas formas “in natura”, pré-tratada e deslignificada. Análises de FTIR para cada biomassa comprovaram a alteração na estrutura química proporcionada pelo pré-tratamento e deslignificação destes materiais. O pré-tratamento com H_2SO_4 1,0% (m/v) a 120 °C por 10 min, seguido de deslignificação com NaOH 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h, ambos em reator piloto agitado de 350 L promoveu uma solubilização de 88,8 % de hemicelulose e 77,9% de lignina para a palha de cana, e uma solubilização de 79,3% de hemicelulose e 62,3% de lignina para o pseudocaule de bananeira. Já o bagaço de cana foi pré-tratado hidrotermicamente em reator de 20 L, nas condições, 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min e 195 °C/10 min, sendo que esta última condição, seguida de deslignificação com NaOH a 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h proporcionou uma solubilização de 95,8% de hemicelulose e 80,9% de lignina para este material. Os ensaios de conversão enzimática dos materiais lignocelulósicos mostraram que a conversão celulósica aumentou consideravelmente, para todos os materiais, após o pré-tratamento seguido de deslignificação, atingindo 85% de conversão para a palha de cana, 89,2% de conversão para o bagaço de cana e 61,0% de conversão para o pseudocaule de bananeira. Após as etapas de pré-tratamento e deslignificação alcalina, os materiais lignocelulósicos apresentaram uma estrutura morfológica modificada, com as células vegetais livres de células de parênquima, conforme verificado pelas análises de MEV, e com redução da cristalinidade da celulose remanescente, conforme mostrado pelas análises de Difractometria de Raios X. Ensaios de fermentabilidade dos hidrolisados celulósicos de bagaço de cana utilizando a levedura *Candida guilliermondii* mostraram uma boa resposta da levedura à produção de etanol alcançando uma concentração máxima de 20 g/L.

Palavras-chave: Biomassa vegetal (Pré-tratamento). Etanol celulósico. Hidrólise enzimática. Fermentação.

ABSTRACT

SILVA, V. F. N. **Studies of pretreatment and enzymatic saccharification of agroindustrials wastes about steps for obtention of cellulosic ethanol process.** 2009. 116 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

The use of agroindustrials residues about lignocellulosics sources to obtain many chemicals products it's an alternative to contribute for the valuation of these subproducts. In this context, the ethanol produced by lignocellulosic materials it's an interesting option for increase the production of this fuel without increase the agriculture area for production of biofuels, since the ethanol demand has increasing even more in the last years, with the objective of substitute the oil and his derivates, contribute significantly for reduce of negative impacts for environment, about the greenhouse gas impacts produced by burning of fossil fuels. For that production of cellulosic ethanol will be economic favorable it's necessary that lignocellulosics sources will be fractionates for to make it available many carbohydrates possible for alcohol fermentation processes. This work had objective to evaluate enzymatic saccharification of materials, sugar cane straw, sugar cane bagasse and pseudostem of banana, in this raw, pretreated and delignified forms, for analyze the effect of pretreatment and delignification on the increase of enzymatic saccharification of cellulose with biomass. Every lignocellulosic materials went submitted a chemical characterization in this raw, pretreated and delignified forms. FTIR analysis for each biomass confirmed the change of chemical structure challenge for pretreatment and delignification of this materials. The pretreatment with H_2SO_4 1.0% (m/v), 120 °C, 10 min, followed of delignification with NaOH 1.0% (m/v), 100 °C, 1h, both in 350 L agitated reactor, promoted a solubilization of 88.8% for hemicellulose and 77.9% of lignin for sugar cane straw, and a solubilization of 79.3% for hemicellulose and 62.3% of lignin for pseudostem of banana. The sugar cane bagasse went carried hydrothermal processing pretreatment on reactor of 20 L, in this conditions, 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min e 195 °C/10 min, although in this last condition, followed of delignification with NaOH 1.0% (m/v), 100 °C for 1h to afforded a solubilization of 95.8% for hemicellulose and 80.9% of lignin for this material. The experiments of enzymatic saccharification of lignocellulosic materials showed that cellulosic conversion increased considerably, for all materials, after pretreatment followed of delignification, attaining 85% of conversion for the sugar cane straw, 89.2% of conversion for the sugar cane bagasse and 61% of conversion for the pseudostem of banana. After pretreatments steps and alkaline delignification, the lignocellulosic materials showed changed morphologic structural, with vegetable cells lived of parenchyme cells, according to the SEM analysis, and with reduce of cellulose cristallinity remaining, according to the X Ray diffraction analysis. Experiments of fermentation of cellulosics hydrolysates of sugar cane bagasse using *Candida guilliermondii* it has showed a good reply of yeast for the ethanol production aimed the máxime concentration of 20 g/L.

Keywords: Vegetal biomass (Pretreatment). Cellulosic ethanol. Enzymatic hydrolysis. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Rotas tecnológicas para a produção de etanol (adaptado de BIOETANOL DE CANA, 2008).....	22
Figura 2.2.	Estrutura típica da biomassa da cana (BIOETANOL DE CANA, 2008).....	24
Figura 2.3.	Principais países produtores de cana-de-açúcar em 2005 (BIOETANOL DE CANA, 2008).....	25
Figura 2.4.	A: Bagaço de cana-de-açúcar (fibra) (GONÇALVES, 2008); B: Palhada – Material que fica no campo após a colheita da cana. É composto por folhas verdes, pontas do vegetal, palha e restos do caule (PESQUISA FAPESP, 2009).....	27
Figura 2.5.	Partes da bananeira, <i>Musa</i> sp (SOFFNER, 2001).....	28
Figura 2.6.	Fluxograma da geração de resíduos da bananicultura (adaptado de SOFFNER, 2001).....	30
Figura 2.7.	Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina (ZHANG, 2008).....	32
Figura 2.8.	Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....	33
Figura 2.9.	Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (adaptado de YU, LOU e WU, 2008).....	34
Figura 2.10.	Fluxograma do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).....	35
Figura 2.11.	Fluxograma do processamento das biomassas lignocelulósicas que podem ocorrer em uma biorrefinaria (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001 e ZHANG, 2008).....	37
Figura 2.12.	Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).....	39
Figura 2.13.	Modo de ação das celulasas e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose (adaptado de PITARELO, 2007).....	46
Figura 4.1.	Fluxograma de trabalho para a palha de cana-de-açúcar.....	50
Figura 4.2.	Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana-de-açúcar.....	51
Figura 4.3.	Fluxograma de trabalho para o pseudocaule de bananeira.....	52

Figura 4.4.	Foto do reator piloto em que foi realizado o pré-tratamento ácido diluído e a deslignificação alcalina da palha de cana-de-açúcar (A). Vista interna do reator agitado (B).....	53
Figura 4.5.	Foto do reator rotatório modelo REGMED AU/E-20 do Departamento de Antibióticos da UFPE, em que foi realizado o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.....	54
Figura 5.1.	Foto da palha de cana “in natura” (A), da palha pré-tratada (B) e da polpa de palha (C).....	67
Figura 5.2.	Fotomicrografias da palha de cana-de-açúcar “in natura” (A); pré-tratada (B) e deslignificada (C).....	71
Figura 5.3.	Difratogramas de raios X dos materiais: palha de cana “in natura” (—), palha de cana pré-tratada (—) e polpa bruta de palha de cana (—).....	72
Figura 5.4.	Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).....	74
Figura 5.5.	Comportamento da hidrólise enzimática da palha de cana em relação às diferentes quantidades de lignina presente (A), e à cristalinidade da celulose presente neste material lignocelulósico.....	76
Figura 5.6.	Foto do bagaço de cana “in natura” (A) e após o pré-tratamento hidrotérmico: (B) 180°C/10 min, (C) 185°C/10 min, (D) 190°C/10 min e (E) 195°C/10 min.....	77
Figura 5.7.	Rampas de aquecimento dos ensaios de pré-tratamento realizados no reator modelo REGMED AU/E-20. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.....	78
Figura 5.8.	Ajuste polinomial dos valores de rendimento do pré-tratamento do bagaço de cana de-açúcar em função da temperatura.....	79
Figura 5.9.	Fotomicrografias do bagaço de cana “in natura”, pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C por 10 min e pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C por 10 min, seguido de deslignificação com NaOH 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h.....	83
Figura 5.10.	Difratometria de raios X do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições: 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min e 195 °C/10 min e “in natura”.....	84
Figura 5.11.	Difratograma de raios X da polpa bruta de bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento : 195 °C/10 min, 190 °C/10 min, 185 °C/10 min e 180 °C/10 min.....	85
Figura 5.12.	Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).....	87
Figura 5.13.	Regressão linear dos valores de conversão enzimática da celulose em função da quantidade de lignina e hemicelulose residuais, e do índice de cristalinidade.....	90

Figura 5.14.	Fotomicrografias do pseudocaule de bananeira “in natura” (A), pré-tratado (B) e deslignificado (C).....	93
Figura 5.15.	Difratograma de raios X dos materiais: pseudocaule de bananeira “in natura” (—), pseudocaule de bananeira pré-tratado (—) e polpa bruta de pseudocaule de bananeira (—).....	94
Figura 5.16.	Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pseudocaule de bananeira “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).....	96
Figura 5.17.	Comportamento da levedura <i>Candida guilliermondii</i> durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana proveniente de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico. (Concentrações dos açúcares (g/L): (■) glicose; (●) xilose; (▲) etanol.....	99
Figura 5.18.	Número de células viáveis/mL durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana proveniente das seguintes condições de pré-tratamento hidrotérmico: RPTB 1A (■), RPTB 1B (●), RPTB 2A (▲), RPTB 2B (▼), RPTB 3A (◄), RPTB 3B (►), Controle (◆).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (adaptado de REDDY; YANG, 2005).....	31
Tabela 2.2.	Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol (adaptado de SADDLER; RAMOS; BREUIL, 1993 e SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).....	40
Tabela 4.1.	Hidrolisados celulósicos obtidos de bagaço de cana-de-açúcar proveniente das etapas de pré-tratamento hidrotérmico utilizados para o ensaio de fermentabilidade por <i>Candida guilliermondii</i>	66
Tabela 5.1.	Composição química da palha de cana “in natura”, pré-tratada e deslignificada, juntamente com o balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa.....	68
Tabela 5.2.	Solubilização dos componentes da palha de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.....	69
Tabela 5.3.	Índice de cristalinidade da palha de cana-de-açúcar “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.....	73
Tabela 5.4.	Efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar.....	75
Tabela 5.5.	Composição química e balanço de material do bagaço de cana “in natura” e após as condições de pré-tratamento pré-estabelecidas.....	80
Tabela 5.6.	Composição química e balanço de material do bagaço de cana deslignificado após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico.....	80
Tabela 5.7.	Solubilização dos componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento pré-estabelecidas.....	81
Tabela 5.8.	Solubilização total dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina.....	82
Tabela 5.9.	Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e após o pré-tratamento hidrotérmico.....	84
Tabela 5.10.	Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado após o pré-tratamento hidrotérmico.....	86
Tabela 5.11.	Efeito do pré-tratamento hidrotérmico e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	88
Tabela 5.12.	Composição química do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado, juntamente com o balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa.....	91
Tabela 5.13.	Solubilização dos componentes do pseudocaule de bananeira após as etapas de pré-tratamento ácido e deslignificação alcalina.....	91

Tabela 5.14.	Índice de cristalinidade do pseudocaule de bananeira “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.....	95
Tabela 5.15.	Efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática do pseudocaule de bananeira.....	97
Tabela 5.16.	Consumo de glicose e xilose pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> nos tempos de 28h e 48h, para hidrolisados celulósicos de bagaço de cana obtidos de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	100
Tabela 5.17.	Contagem de células por Câmara de Neubauer nos tempos 0, 28 e 48h....	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Biocombustíveis.....	21
2.1.1 Etanol – <i>definição – matérias-primas</i>	21
2.2 Cana-de-açúcar.....	24
2.2.1 Produção de cana-de-açúcar.....	25
2.2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar.....	26
2.3 Bananicultura – <i>Origem, dispersão e classificação</i>	27
2.3.1 Produção de banana.....	29
2.3.2 Resíduos provenientes da bananicultura.....	29
2.4 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos.....	30
2.4.1 Celulose.....	31
2.4.2 Hemicelulose.....	32
2.4.3 Lignina.....	33
2.4.4 Outros Compostos.....	34
2.5 Etanol de 2ª geração – <i>Biorefinaria</i>	35
2.6 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.....	38
2.6.1 Pré-tratamento ácido diluído.....	40
2.6.2 Pré-tratamento hidrotérmico.....	42
2.7 Remoção da lignina.....	44
2.8 Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos.....	45
3 OBJETIVOS.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Materiais lignocelulósicos estudados.....	49
4.2 Pré-tratamentos.....	53
4.2.1 Palha de cana-de-açúcar.....	53

4.2.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....	54
4.2.3 Pseudocaule de bananeira.....	55
4.3 Deslignificação alcalina.....	56
4.4 Hidrólise enzimática.....	58
4.5 Caracterização química dos materiais lignocelulósicos.....	59
4.5.1 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE.....	60
4.5.2 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.....	60
4.5.3 Determinação do teor de cinzas da lignina.....	61
4.5.4 Determinação do teor de cinzas totais.....	61
4.5.5 Determinação de lignina solúvel.....	61
4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural.....	63
4.5.7 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
4.5.8 Análise dos materiais lignocelulósicos por difratometria de raios X (DRX).....	64
4.5.9 Análise dos materiais lignocelulósicos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	64
4.5.10 Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado celulósico obtido a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cana submetido a diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 Pré-tratamento e deslignificação da palha de cana-de-açúcar.....	67
5.1.1 Análise morfológica da palha de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
5.1.2 Determinação da cristalinidade da palha de cana-de-açúcar por difratometria de raios X (DRX).....	72
5.1.3 Análise da palha de cana-de-açúcar por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	74
5.1.4 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.....	75
5.2 Pré-tratamento e deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar.....	77
5.2.1 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	82

5.2.2 Determinação da cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar por difratometria de raios X (DRX).....	84
5.2.3 Análise do bagaço de cana-de-açúcar por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	86
5.2.4 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	88
5.3 Pré-tratamento e deslignificação do pseudocaule de bananeira.....	90
5.3.1 Análise morfológica do pseudocaule de bananeira por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	92
5.3.2 Determinação da cristalinidade do pseudocaule de bananeira por difratometria de raios X (DRX).....	94
5.3.3 Análise do pseudocaule de bananeira por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	95
5.3.4 Hidrólise enzimática do pseudocaule de bananeira.....	97
5.4 Resultados preliminares da fermentabilidade do hidrolisado celulósico obtido a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cana submetido a diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	98
6 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICE.....	113

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a sociedade do século XXI é encontrar uma demanda crescente de energia para o transporte e os processos industriais, e prover uma matéria-prima para a indústria de modo sustentável (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). O petróleo, o gás natural e seus derivados representam 55% do consumo mundial de energia e, como combustíveis fósseis, as suas reservas são finitas, a segurança de abastecimento é problemática para muitos países que os importam e o seu uso é a principal fonte dos gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global (BIOETANOL..., 2008).

As emissões globais de dióxido de carbono (CO₂) derivadas da queima dos combustíveis fósseis atingiram em 2006 o recorde de 8,38 bilhões de toneladas, um número 20% maior do que o registrado em 2000. As emissões aumentaram anualmente 3,1% no período, mais do que o dobro da taxa de crescimento nos anos 90 (PORTAL ECODEBATE, 2008).

Diante deste cenário, o biodiesel e, principalmente o etanol, passaram a constar de forma definitiva da agenda dos governos e das políticas de praticamente todos os países. Em se tratando do etanol, sua utilização não está apenas restrita ao combustível, mas incorpora o etanol grau químico, fonte de matérias-primas para a fabricação de produtos químicos, o que leva à redescoberta da alcoolquímica.

O estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para aumento do consumo do etanol nos próximos anos, principalmente nos países desenvolvidos, requer um aumento substancial da produção de etanol e, nesse sentido, estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para o etanol, como a biomassa lignocelulósica, e a construção de biorrefinarias integradas, um conceito análogo ao das refinarias de petróleo (BASTOS, 2007).

Os materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol devido a sua grande disponibilidade e baixo custo (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007), sendo que dentre estas fontes podem-se destacar os resíduos agroindustriais como casca e palha de arroz, palha de cevada, palha de trigo, sabugo e forragem de milho, e principalmente o bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas para melhorar a digestibilidade química e enzimática da biomassa lignocelulósica para a eficiente conversão da celulose e hemicelulose em etanol. Dentre estas tecnologias pode-se destacar o baixo custo de pré-tratamentos

termoquímicos, o desenvolvimento de enzimas mais eficientes na hidrólise dos polissacarídeos e a busca por microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses com maior eficiência (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006). Entretanto, ainda não estão claras quais características da biomassa são importantes para um pré-tratamento eficiente (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Um dos grandes desafios para a obtenção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos é o fracionamento dos componentes químicos (celulose, hemicelulose e lignina) que compõem a estrutura da biomassa vegetal para que os polissacarídeos, os quais serão utilizados no processo fermentativo, não sejam degradados durante este fracionamento.

Neste trabalho foram estudadas condições de pré-tratamento em escala piloto do bagaço e da palha de cana-de-açúcar (provenientes da agroindústria sucroalcooleira), e do pseudocaule de bananeira (proveniente da bananicultura), a fim de se obter um melhor fracionamento destas biomassas e avaliar a eficiência do pré-tratamento pela conversão da celulose em glicose por meio da sacarificação enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

As preocupações referentes ao aumento da demanda energética, especialmente quanto à demanda de combustíveis para o setor de transportes, o acúmulo de CO₂ atmosférico devido à queima dos combustíveis fósseis, a segurança energética nacional aliada ao fim dos combustíveis fósseis e o desenvolvimento da economia rural são os principais motivos para a busca de fontes energéticas sustentáveis e materiais renováveis (ZHANG, 2008).

O termo biocombustível refere-se aos combustíveis líquidos ou gasosos do setor de transporte os quais são predominantemente produzidos da biomassa. Dentre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais pode-se destacar o etanol (combustível líquido), o hidrogênio e o metano (combustíveis gasosos).

Há várias razões para os biocombustíveis serem considerados como tecnologias relevantes para o desenvolvimento e industrialização dos países. Eles implicam em razões de segurança energética, preocupações ambientais e a questão socioeconômica relacionada ao setor rural (DEMIRBAS, 2007). Os biocombustíveis apresentam as seguintes vantagens: (a) podem ser facilmente obtidos a partir de fontes biomássicas abundantes e baratas, (b) seu uso permite reduzir a emissão de carbono para a atmosfera e, além disso, a produção de biomassa é potencialmente favorecida, dentro de limites e para algumas espécies, pela crescente disponibilidade de dióxido de carbono na atmosfera (BIOETANOL..., 2008) e (c) eles são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (PUPPAN, 2002; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

2.1.1 Etanol – definição – matérias-primas

O etanol, ou álcool etílico, é uma substância incolor, volátil, inflamável, totalmente solúvel em água, apresenta fórmula molecular C₂H₆O (BIOETANOL..., 2008; POLOBIO, 2009) podendo ser obtida por três maneiras gerais: por via destilatória, por via sintética e por

via fermentativa. A via destilatória não tem significado econômico no Brasil, a não ser para certas regiões vinícolas, para o controle de preço de determinadas castas de vinhos de mesa. Por via sintética, obtém-se o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, e de gases de petróleo e da hulha. Porém, a via fermentativa é a maneira mais importante e econômica para a obtenção do álcool etílico no Brasil devido principalmente ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o País.

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para a obtenção do etanol (figura 2.1). Entretanto para que seja viável economicamente é preciso considerar seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação. As matérias-primas podem ser classificadas em matérias açucaradas, agrupando cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em matérias amiláceas e feculentas, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos; e em matérias celulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (LIMA, et al; 2001).

Figura 2.1 - Rotas Tecnológicas para a produção de etanol (adaptado de BIOETANOL..., 2008).

As ações governamentais dirigidas ao etanol orientam-se inicialmente por preocupações na área de energia e combustíveis. Nesse sentido reproduzem as ações do governo brasileiro na década de 1970, quando a crise do petróleo levou à incorporação do etanol (ou álcool) em nossa matriz energética, tornando-o uma alternativa efetiva à gasolina.

Mesmo com a interrupção da trajetória virtuosa do etanol no início da década de 1990 em resposta à queda nos preços relativos do petróleo e aos problemas de natureza fiscal do governo, que eliminaram os subsídios e levaram a uma perda de espaço relativo para a gasolina, um novo ímpeto foi garantido ao etanol combustível graças aos novos veículos bicomcombustíveis (*flex fuel*) (BASTOS, 2007).

No mundo, o recente retorno aos aumentos no preço do petróleo (alcançando em 2006 aproximadamente US\$ 80,0 dólares o barril) (HAHN-HÄGERDAL et al, 2006), as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental desde a assinatura do Protocolo de Kyoto, o qual definiu mecanismos e metas para os países reduzirem as emissões de gases causadores do efeito estufa em 5,2%, entre 2008 e 2012, frente aos níveis de 1990, fizeram renascer a atenção para as fontes alternativas de energia (BASTOS, 2007).

Nesse novo cenário, as atenções voltadas para o etanol não estão mais restritas ao etanol combustível, mas incorpora o etanol como matéria-prima para obtenção de diversos produtos químicos, tais como o eteno (derivado do petróleo), o qual é matéria-prima para resinas, além de produtos hoje importados derivados do etanol, como os acetatos e o éter etílico.

No futuro, por razões econômicas, a alcoolquímica (segmento da indústria química que utiliza o álcool etílico como matéria-prima para fabricação de diversos produtos químicos) poderá substituir à petroquímica, fazendo com que o etanol assuma o lugar do petróleo como fonte de matérias-primas (BASTOS, 2007).

2.2 Cana-de-açúcar

Acredita-se que a cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia, Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Posteriormente, disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial regiões tropicais e subtropicais. A faixa de clima onde a cana-de-açúcar se adapta abrange desde latitudes 35 °N até 30 °S, sendo normalmente plantada em altitudes até 1000 metros acima do nível do mar (OLIVEIRA, 2007).

Como um dos principais produtos agrícolas do Brasil, cultivada desde a época da colonização, a cana-de-açúcar constitui um potencial gerador de energia e a grande vantagem disso é que ela é completamente renovável (OLIVEIRA, 2007). É uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana, como mostrado na figura 2.2. Todos esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare.

Figura 2.2 - Estrutura típica da biomassa da cana (BIOETANOL..., 2008).

O clima ideal para o cultivo da cana é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento (formação de brotos) e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e o acúmulo de sacarose nos colmos.

2.2.1 Produção da cana-de-açúcar

O Brasil encontra-se em uma situação bastante favorável quanto à produção da cana-de-açúcar (figura 2.3) e conseqüentemente quanto à produção de etanol, sendo que até a 2ª quinzena de novembro de 2008, aproximadamente 460 milhões de toneladas de cana foram processadas na safra 2008/09 com a produção de etanol podendo superar 24 bilhões de litros até o final da safra, na região Centro-Sul do Brasil (ÚNICA, 2008).

Figura 2.3 - Principais países produtores de cana-de-açúcar em 2005 (BIOETANOL..., 2008).

2.2.2 Bagaço e palha de cana-de-açúcar

Como consequência do aumento da produção de etanol nos últimos anos, tem-se o aumento dos resíduos agroindustriais deste processo, tais como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar.

O potencial de produção de resíduos da cana-de-açúcar (matéria-seca) representa em média 14% da massa da cana (SEABRA, 2008). Dessa forma, para cada tonelada de cana (colmos) produzida têm-se 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (novo resíduo devido à proibição da queima da palha de cana) (APTA, 2008), e segundo dados da safra 2008/2009 o Brasil está acumulando aproximadamente 130 milhões de toneladas de resíduos (palha e bagaço de cana) (ÚNICA, 2008).

A principal utilidade do bagaço de cana (figura 2.4 A) é gerar energia elétrica para a própria usina por meio de queima em caldeiras, pois além de estar presente em grande volume na usina, não apresenta um custo adicional com transporte, por exemplo. A queima de 6,5 toneladas de bagaço é capaz de gerar 1 MWh de energia (OLIVEIRA, 2007).

Quantidades de bagaço remanescentes podem ser utilizadas em inúmeros processos industriais pela separação da fibra, que serve para a fabricação de papéis/móveis, e da medula que pode ser utilizada na alimentação animal e na produção de furfural; também é utilizado em processos de compostagem (BERTONCINI, 2008).

A palhada (figura 2.4 B) deixada na superfície do solo tem importância na melhoria da sua fertilidade, por meio do retorno dos nutrientes via processo de mineralização, controle de processos erosivos e maior retenção de água, além de propiciar aumento na microbiota do solo (BERTONCINI, 2008).

Porém, devido à grande quantidade de resíduo gerada, juntamente com o bagaço de cana, têm-se um desperdício de uma importante fonte lignocelulósica para a geração de energia elétrica, biocombustíveis e fabricação de produtos como bioplásticos, carvão para siderúrgicas e até cimento. Outro problema é a fuligem liberada ao meio ambiente durante a queima da palha da cana-de-açúcar no campo, na época da colheita e pousa no chão na forma de finos flocos escuros carregando em sua composição cerca de 70 produtos químicos, prejudiciais ao ambiente pela liberação de gases que contribuem para o efeito estufa e causam sérios problemas respiratórios para a população exposta.

Figura 2.4 - **A:** Bagaço de cana-de-açúcar (fibra) (GONÇALVES, 2008); **B:** Palhada – Material que fica no campo após a colheita da cana. É composto por folhas verdes, pontas do vegetal, palha e restos do caule (PESQUISA FAPESP, 2009).

Frente a este problema, o governo do estado de São Paulo regulamentou a Lei nº 11.241 que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar sendo que até 2021 toda a área mecanizável terá 100% da queima eliminada e até 2031, toda a área não mecanizável terá 100% da queima eliminada (IMPrensa Oficial, 2003).

2.3 Bananicultura – *Origem, dispersão e classificação*

A banana é considerada uma das primeiras frutas utilizadas na alimentação humana e tem origem no continente Asiático. A dispersão desta cultura pelo mundo está ligada ao período das grandes navegações; supõe-se que os navegantes portugueses, em suas viagens, conheceram esta fruta e começaram a cultivá-la por onde passavam.

A distribuição geográfica da cultura econômica da bananeira está compreendida entre as latitudes de 25 °N e 25 °S, embora sejam encontradas até 34 °N em Israel e 30 °S em Natal, na África. Nem todas as regiões dentro dessa faixa apresentam condições favoráveis ao plantio comercial, quer por questões de temperatura, em função da altitude, quer por escassez e má distribuição de precipitação pluvial (SOFFNER, 2001).

A bananeira é uma planta perene e possui ciclo vegetativo com desenvolvimento de forma contínua e acelerada. É uma planta muito exigente em relação ao clima, principalmente em relação à temperatura e à umidade, sendo recomendado um índice pluviométrico mensal

de 100 mm e temperatura de 27 °C. A oscilação desses índices pode implicar na redução do desenvolvimento da planta. O período compreendido entre o plantio e a colheita do fruto pode oscilar de 12 a 18 meses (SCARPARE FILHO et al., 1998).

A bananeira pertence à divisão Agiospermae (= Magnoliophyta), classe Monocotyledoneae (= Lilipsida), ordem Scitaminae (= Zingiberales) e família Musaceae (CRONQUIST, 1981; SOFFNER, 2001). A família Musaceae é constituída por dois gêneros: *Musa* (bananas comestíveis) e *Ensete* (bananas silvestres). O primeiro apresenta 35 espécies e o segundo, um total de 7 espécies.

O gênero *Musa* ainda pode ser dividido em 4 subgêneros: *Australimusa*, *Rhodochlamys*, *Callimusa* e *Eumusa*. Os subgêneros *Callimusa* e *Rhodochlamys* não produzem frutos comestíveis. O subgênero *Australimusa* contém apenas uma espécie, conhecida como abacá (*Musa textilis*), que é utilizada em alguns países para extração de fibras têxteis das bainhas foliares.

No subgênero *Eumusa*, ou simplesmente *Musa*, é onde se encontram as espécies de interesse comercial (SOFFNER, 2001). As espécies de banana mais cultivadas no mundo são *Musa sapientum*, cultivar prata; e *Musa cavendishii*, vários cultivares. No Brasil as cultivares mais difundidas deste grupo são nanica e nanicão (sub grupo “Giant Cavendishii” triploide AAA). A bananeira (figura 2.5) é um vegetal herbáceo completo, típico das regiões tropicais úmidas, que possui raiz, caule subterrâneo, folhas, flores, frutos e sementes.

Figura 2.5 - Partes da bananeira, *Musa* sp (SOFFNER, 2001).

O caule, ou rizoma, é subterrâneo; nele ocorre a formação das raízes, das folhas, da inflorescência e a geração de novos rebentos ou “filhotes”. O pseudocaule é uma estirpe ou “tronco” em formato de um cilindro irregular, formado por bainhas foliares sobrepostas, tendo em seu interior o “palmito” ou coração central.

No prolongamento das bainhas foliares encontram-se as folhas. O cacho é composto pelas partes: engaço, ráquis, pencas de bananas e botão floral ou “coração”. Os tamanhos das partes da bananeira dependerão da espécie, condições climáticas e tratos culturais (SOFFNER, 2001).

2.3.1 Produção de banana

A produção mundial de banana está estimada em 64,6 milhões de t/ano, sendo a Índia o maior produtor mundial, com 13,9 milhões de t/ano, ocupando uma área de 445.000 ha cultivados (SOFFNER, 2001). O Brasil detém uma produção de aproximadamente 7,1 milhões de t/ano, com área plantada de aproximadamente 515.000 ha (FAO, 2007).

A cultura da banana está distribuída por todo o território nacional, participando com significativa importância na economia de vários estados brasileiros, podendo-se destacar as seguintes regiões produtoras: Vale do Açu (RN), Petrolina (PE), Bom Jesus da Lapa (BA), Norte de Minas Gerais, Vale do Ribeira em São Paulo e Norte de Santa Catarina (ALMEIDA, 2007).

2.3.2 Resíduos provenientes da bananicultura

Na atividade bananicultura, após a colheita da fruta, o cacho é conduzido para outros locais e as outras partes da planta, como o pseudocaule, folhas e coração, normalmente permanecem no bananal sendo utilizadas como cobertura no solo para manter a umidade, evitar a erosão e devolver nutrientes para o mesmo. Porém, elevado percentual de material é deixado no bananal, o que favorece o desenvolvimento de biodeterioradores e animais peçonhentos (SILVA, 1998).

De acordo com Soffner (2001), após a colheita da fruta, a atividade bananicultora pode gerar em matéria seca: 8 t/ha de pseudocaule, 4,7 t/ha de folha; 0,7 t/ha de engaço e 0,3 t/ha de botão floral ou coração.

A geração de resíduos da atividade bananicultora está representada na figura a seguir:

Figura 2.6 - Fluxograma da geração de resíduos da bananicultura (adaptado de SOFFNER, 2001).

2.4 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).

As biomassas lignocelulósicas incluem vários resíduos agrícolas (palhas, cascas, caules, pedúnculos), madeiras de coníferas e folhosas, resíduos de indústrias de polpa e papel, e colheitas herbáceas. A tabela 2.1, a seguir, mostra a composição de alguns lignocelulósicos.

Tabela 2.1 - Composição química de alguns materiais lignocelulósicos (adaptado de REDDY; YANG, 2005)

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
Forragem de milho	38 - 40	28	7 - 21	3,6 - 7
Fibra de coco	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45	2,7 - 10,2
Fibra de Bagaço	32 - 48	19 - 24	23 - 32	1,5 - 5
Fibra de Bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10	4,7
Palha de trigo	33 - 38	26 - 32	17 - 19	6 - 8
Palha de arroz	28 - 36	23 - 28	12 - 14	14 - 20
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19	2 - 7

Conforme observado na tabela 2.1, a composição destes materiais é muito variável; o maior componente é a celulose (35 – 50%), seguido de hemicelulose (20 – 35%) e lignina (10 – 25%) (SAHA, 2003). Cinzas, compostos fenólicos, ácidos graxos e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente destas biomassas vegetais (OLIVEIRA, 2007).

2.4.1 Celulose

A celulose é um polímero linear de anidroglicopirranose associada por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ glicosídicas (ZHANG, 2008), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero. Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares (figura 2.7), que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.7 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina (ZHANG, 2008).

As pontes de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994).

2.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, diferem substancialmente da celulose por serem amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses). As polioses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. As madeiras moles apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as madeiras duras são mais ricas em xilanas (FENGEL; WEGENER, 1989). A composição de xilanas de

gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles por (McDOUGALL et al., 1993). Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na figura 2.8.

Figura 2.8 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).

Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar grande parte de uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada do que a celulose; nos materiais lignocelulósicos, está intimamente ligada à celulose e à lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material.

2.4.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. A lignina aumenta a resistência mecânica das plantas, de tal forma que árvores de mais de cem metros podem se manter em pé (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxycinâmílicos: p-cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) (figura 2.9). A lignina é

constituída principalmente de unidades de fenilproprano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2.9 - Estruturas dos álcoois precursores da lignina: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (adaptado de YU; LOU; WU, 2008).

2.4.4 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos podem conter também uma extensa variedade de extrativos orgânicos, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais.

Os extrativos são compostos intermediários do metabolismo do vegetal; proporcionam reserva energética e proteção ao vegetal contra o ataque de microrganismos e insetos, porém têm um efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989). A biomassa vegetal também contém uma pequena quantidade de espécies inorgânicas, tais como, potássio, sódio, cálcio, etc., como resultado dos nutrientes adquiridos durante o seu crescimento (YU; LOU; WU, 2008).

2.5 O Etanol de 2ª geração – *Biorrefinaria*

A substituição dos combustíveis fósseis por uma fonte energética renovável faz com que a produção futura do etanol em larga escala seja baseada principalmente em materiais lignocelulósicos.

Há três etapas principais no processo de conversão dos materiais lignocelulósicos em etanol (figura 2.10): primeira, pré-tratamento e sacarificação enzimática da biomassa vegetal para disponibilizar os açúcares fermentáveis; segunda, fermentação dos açúcares liberados realizada por microrganismos especializados - esta etapa pode ser realizada em uma etapa combinada chamada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF – Sigla em Inglês); e terceira etapa, recuperação do etanol (processo de destilação).

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

Mesmo com tantas vantagens para a utilização de materiais lignocelulósicos visando à obtenção de etanol, ainda não é facilitada a obtenção deste biocombustível.

A hidrólise ácida diluída, utilizada para a remoção da hemicelulose, apesar de ser mais rápida e de ter tecnologia mais simples do que a hidrólise enzimática necessita de um controle da quantidade de ácido utilizada para evitar a intensa degradação da celulose e a formação de produtos indesejáveis que atuam como inibidores no processo fermentativo, além da necessidade de se trabalhar com equipamentos desenvolvidos com materiais resistentes à corrosão (KELLER, 1996; BASTOS, 2007). Por outro lado, a hidrólise enzimática dos

materiais lignocelulósicos tem sido considerada uma tecnologia promissora, pois as enzimas apresentam elevada especificidade de ação em seu substrato evitando assim a formação de produtos inibidores para o processo fermentativo (ADSUL et al., 2005; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Porém, o custo da produção das enzimas para a hidrólise da biomassa ainda é elevado, atuando como uma barreira para a viabilidade econômica desta tecnologia (HIMMEL; RUTH; WYMAN, 1999; WOOLEY et al., 1999; TAYLOR, 2008).

Atualmente muitos pesquisadores estão concentrando esforços no desenvolvimento de pré-tratamentos eficientes, capazes de disponibilizar a maior quantidade de açúcar possível (pentoses e hexoses), no desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados que possam fermentar tanto pentoses quanto hexoses, na produção de plantas geneticamente modificadas com maior quantidade carboidratos ou plantas modificadas estruturalmente para facilitar a etapa de pré-tratamento em condições amenas e na utilização de processos integrados para reduzir o número de etapas do processo e conseqüentemente reduzir a demanda energética. (DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; JEFFRIES, 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Em curto prazo os materiais lignocelulósicos serão provavelmente utilizados para a produção de combustível, calor e eletricidade; entretanto, em longo prazo, a tecnologia do bioetanol servirá de base para a produção sustentável de commodities, tais como diversos químicos e materiais, em futuras biorrefinarias, como representado na figura 2.11 (WYMAN, 2003; KAMM; KAMM, 2004; REDDY; YANG, 2005; ZHANG et al. 2007).

Figura 2.11: Fluxograma do processamento das biomassas lignocelulósicas que podem ocorrer em uma biorrefinaria (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001; ZHANG, 2008).

2.6 Pré-tratamento dos Materiais Lignocelulósicos

A eficiente redução da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos estão entre uma das mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico e para a obtenção de químicos em processos desenvolvidos em biorrefinaria (BIOMASS Research and Development Technical Advisory Committee, 2002; EERE, 2006; ZHANG et al., 2007; ZHANG, 2008).

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por vários fatores tais como o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, a umidade do lignocelulósico, a área superficial acessível (porosidade do material) (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; LAUREANO-PEREZ et al., 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Entretanto, vários pesquisadores apontam que as duas principais causas de resistência dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática são: (1) a baixa acessibilidade às fibras celulósicas (micro)-cristalinas, as quais restringem a atividade das celulasas, e (2) a presença de hemicelulose e principalmente de lignina na superfície da celulose, impedindo a ação das celulasas ao substrato (KIM; HOLTZAPPLE, 2006; ZHANG et al., 2007; ZHANG, 2008).

A quantidade variável de hemicelulose e lignina em um material lignocelulósico depende de fatores como o tipo da planta a partir da qual a biomassa é obtida, idade da colheita, etc. Isto mostra que não há nenhum método de pré-tratamento específico para diversos tipos de materiais lignocelulósicos (CLAASSEN et al., 1999).

Portanto, um processamento prévio e adequado destes materiais torna-se necessário para romper a parede celular (barreira física), bem como diminuir a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina para que as enzimas hidrolíticas possam acessar a macroestrutura da biomassa a fim de aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (figura 2.12) (MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005; HIMMEL et al., 2007).

Além disso, a etapa de pré-tratamento pode influenciar fortemente o custo da corrente do processo por determinar a toxicidade da fermentação, a taxa de hidrólise enzimática, a carga de enzima utilizada no processo, o poder de mistura dos reagentes, a concentração e a purificação dos produtos obtidos, a demanda no tratamento de resíduos, entre outras variáveis do processo. Portanto, esta etapa de processamento da biomassa vegetal necessita ser de baixo custo, sendo que deve ser evitado o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética e a intensa degradação dos materiais lignocelulósicos (WYMAN et al., 2005).

Figura 2.12: Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).

Para a etapa de pré-tratamento, vários processos têm sido propostos e desenvolvidos podendo-se destacar os processos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (SUN; CHENG, 2002). Os principais métodos são reportados na tabela 2.2.

Dentre estas técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, pode-se destacar a explosão a vapor, o hidrotérmico, AFEX e utilização de ácido diluído como métodos mais estudados e promissores no processo de obtenção de etanol a partir da biomassa vegetal (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Tabela 2.2 - Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol (adaptado de SADDLER; RAMOS; BREUIL, 1993; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008)

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Métodos combinados
Vapor	Ozonólise	Pré-tratamento por fungos (de decomposição branca, parda)	Explosão a vapor
Radiação	Hidrólise com ácido diluído (H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , H_3PO_4)	Pré-tratamento Bioorganossolv (tratado com <i>Ceriporiopsis subvermispura</i> seguido de etanólise)	Hidrotérmico
Moinho de bola	Hidrólise com ácido concentrado (H_2SO_4)		SO_2 e vapor
Moinho do tipo Martelo	Ácido Acético		NO_2 e irradiação
Barra giratória	Hidrólise alcalina ($NaOH$, $Ca(OH)_2$)		Alcalino e moinho de bolas
Umidificação	Amônia		Amônia e vapor (AFEX)
Água quente	SO_2		Explosão com CO_2
Pirólise	Deslignificação oxidativa		
Processo Organossolv			

2.6.1 Pré-tratamento ácido diluído

Dentre os tipos de pré-tratamento existentes a hidrólise utilizando ácido diluído tem sido aplicada a diversos resíduos agrícolas, empregando-se uma extensa faixa de catalisadores tais como os ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e hidrolórico (RAMOS, 2003; SEABRA, 2008). Este processo de hidrólise apresenta como maior vantagem a rápida taxa de reação, o que é facilitado pelo processo contínuo (DEMIRBAS, 2008).

O Processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos utilizando ácido diluído é conduzido sob alta temperatura e pressão, e tem um tempo de reação na faixa de segundos ou minutos, com o objetivo de solubilizar a hemicelulose, e com isso deixar a celulose mais acessível para a etapa de sacarificação enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) já que a presença da hemicelulose juntamente com a lignina reduz a eficiência desta etapa (MUSSATTO et al., 2008).

O pré-tratamento pode também ser conduzido com ácido concentrado para aumentar a solubilização da fração hemicelulósica.

Porém, além da maior solubilização de hemicelulose, o uso de ácidos concentrados necessita de intenso cuidado, pois estes reagentes são tóxicos, corrosivos, favorecem maior precipitação de lignina solubilizada, maior formação de hidroximetilfurfural e furfural (produtos de degradação da celulose e hemicelulose, respectivamente), e maior liberação de ácido acético pela desacetilação da hemicelulose, sendo que estes compostos atuam como inibidores do processo fermentativo para produção de etanol (FENGEL; WEGENER, 1989; SHEVCHENKO; BEATSON; SADDLER, 1999; LIU; WYMAN, 2003; RAMOS, 2003).

Logo, o pré-tratamento da biomassa vegetal empregando ácido diluído é bastante utilizado, pois as reações secundárias gerando produtos de degradação são menos pronunciadas do que usando o ácido concentrado e a digestibilidade do material pré-tratado correlaciona bem com a remoção da fração hemicelulósica (WYMAN, 1994; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Há primeiramente dois tipos de processos de pré-tratamento com ácido diluído: processos que trabalham a altas temperaturas (maiores que 160 °C) com fluxo contínuo para baixa carga de sólidos (5-10% (m/m)) e processos que trabalham a baixas temperaturas (menores que 160°C) em batelada para alta carga de sólidos (10-40% (m/m)) (SUN; CHENG, 2002; SAHA, 2003). Durante o pré-tratamento com ácido diluído dos materiais lignocelulósicos há hidrólise da hemicelulose em açúcares (xilose, arabinose, entre outros), os quais são solúveis em água, e há formação de um resíduo sólido rico em celulose e lignina.

O pH do hidrolisado hemicelulósico obtido do processo de pré-tratamento ácido diluído necessita ser corrigido para a sua utilização nos processos fermentativos, sem que haja inibição dos microrganismos por um pH desfavorável à sua eficiente bioconversão (SAHA, 2003).

A hidrólise com ácido sulfúrico diluído (empregando-se H₂SO₄ 0,5% a 1,5% (m/v) e temperatura acima de 160 °C) tem sido historicamente o processo preferido para aplicações

industriais, por conta do alto rendimento de açúcares a partir da hemicelulose (75-90% de xilose) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; SEABRA, 2008), e também por melhorar o processo subsequente que consiste na hidrólise enzimática da celulose (YU; LOU; WU, 2008).

Saha e Bothast (1999) avaliaram o pré-tratamento com ácido diluído e o procedimento de sacarificação enzimática na conversão de amido, celulose e hemicelulose de fibra de milho em açúcares fermentescíveis. A hemicelulose e o amido foram convertidos em açúcares simples pelo pré-tratamento com ácido diluído, e o resíduo celulósico proveniente desta etapa foi convertido em glicose utilizando enzimas comerciais.

O procedimento envolveu o pré-tratamento das fibras de milho (15% de sólidos, m/v) com ácido diluído (0,5% H_2SO_4 , v/v) a 121 °C por 1h, para separar a fração hemicelulósica, seguido de sacarificação do material pré-tratado com preparações comerciais de celulase e β -glicosidase. O rendimento de açúcares monoméricos a partir da fibra de milho apresentou-se na faixa de 85-100% do rendimento teórico. Desta forma, o pré-tratamento com ácido diluído a temperaturas relativamente baixas, para minimizar a formação de compostos inibidores, seguido de sacarificação enzimática da porção celulósica é um processo viável para a geração de açúcares fermentescíveis a partir da fibra de milho.

2.6.2 Pré-tratamento Hidrotérmico

Nas últimas duas décadas houve um grande interesse na investigação do uso de água quente, sob elevada pressão, como solvente presente no meio reacional, em processos de conversão de biomassa (YU; LOU; WU, 2008). Considerado como um dos métodos mais promissores de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, o processo hidrotérmico consiste na utilização da água sob alta temperatura e pressão (geralmente entre 180 °C a 240 °C), provocando aumento de sua força iônica (ROGALINSKI; INGRAM; BRUNNER; 2008).

A água sob elevada pressão pode penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e remover a hemicelulose. O pK_a da água é afetado pela temperatura de tal maneira que o pH da água pura passa de 7,0 (a 25 °C) para próximo de 5,0 (a 200 °C) (ALLEN et al., 2001).

Isso faz com que o pré-tratamento hidrotérmico promova a clivagem das ligações dos complexos lignina-carboidrato, com a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos,

principalmente das hemiceluloses. O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atuará como catalisador da reação da hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico).

Em temperaturas na faixa entre 180 a 220 °C e em curtos períodos de reação, além de a fração hemicelulósica poder ser dissolvida em água durante ou após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, dependendo do grau de condensação do vapor, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas com água e o grau de polimerização da celulose pode diminuir com o aumento do tempo e da temperatura de reação (BOBLETER, 1994).

Em relação ao pré-tratamento ácido diluído, o processo hidrotérmico oferece várias vantagens: não requer o uso de ácidos e, conseqüentemente, não há necessidade de se trabalhar com reatores altamente resistentes à corrosão, reduzindo o custo deste processo (LIU; WYMAN, 2003). Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico produz quantidades muito menores de resíduos por neutralização do hidrolisado.

Allen et al. (1996) relataram completa dissolução de xilana e mais de 90% de recuperação de pentosanas pelo pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de fluxo contínuo.

Petersen et al. (2009) estudaram a otimização do pré-tratamento hidrotérmico de palha de trigo para a produção de etanol. Os experimentos mostraram que as melhores condições de pré-tratamento foram de 195 °C em um tempo de 6 a 12 min, obtendo-se uma recuperação de aproximadamente 70% de hemicelulose, 94% de celulose, sendo que 89% desta celulose podem ser convertidas em etanol.

Este processo, onde a biomassa é exposta à água quente pressurizada (concentração de sólidos $\leq 20\%$) mostra-se ter potencial para produzir fibras reativas, recuperar a maior parte de pentosanas, e produzir hidrolisados que resultem em pequena ou nenhuma inibição da fermentação de glicose (LASER et al., 2002; NEGRO, et al., 2003; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Uma abordagem comum para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico é o emprego do chamado fator severidade, o qual é definido por Overend e Chornet (1987) pela equação 2.1 a seguir:

$$\log(r_o) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (2.1)$$

$$T_{ref} = 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

onde t é o tempo de residência em (min) e T é a temperatura em ($^{\circ}\text{C}$). Os resultados são geralmente apresentados como uma função de $\log(r_o)$, e as condições ótimas correspondentes a uma faixa restrita de $\log(r_o)$. Uma vez que r_o depende da temperatura e do tempo, este fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis em um dado tratamento.

O fator severidade tem sido utilizado por vários pesquisadores que trabalham com pré-tratamento hidrotérmico de diversas biomassas (BOBLETER, 1994; KABEL et al., 2007; SCHACHT; ZETZL; BRUNNER, 2008).

2.7 Remoção da Lignina

Em regra geral, para se obter uma hidrólise enzimática de um material lignocelulósico com alto rendimento em açúcares (tanto hexoses quanto pentoses), as duas principais camadas protetoras ao redor da celulose, a hemicelulose e a lignina, precisam ser removidas ou modificadas.

Do mesmo modo que a hemicelulose, a lignina também forma uma barreira física protetora ao ataque enzimático da fração celulósica, não sendo completamente removida na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico (ÖHGREN et al., 2007; PAN et al., 2005).

Existem vários métodos utilizados para a remoção de lignina das biomassas vegetais, e dentre eles estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação kraft e polpação organosolv (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Estas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos “in natura”, os quais apresentam uma estrutura morfológica bem rígida e recalcitrante, necessitando assim de condições de reação mais severas (concentração de álcali $> 10\%$ e temperatura acima de $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Por outro lado, quando o material lignocelulósico já foi submetido a um pré-tratamento que torna a lignina mais exposta e fragilizada, a técnica utilizada para remoção da lignina é a extração alcalina, que consiste do mesmo processo da polpação soda, porém em

condições de reação mais amenas (concentração de álcali no máximo 4% e temperaturas na ordem de 70 °C).

Mussatto et al. (2008) avaliaram o efeito da hemicelulose e lignina na hidrólise enzimática da fração celulósica de bagaço de malte e observaram que a razão da conversão celulósica (definida pelo rendimento de glicose + celobiose) a partir da celulignina (celulose + lignina) foi 3,5 vezes maior do que a hidrólise enzimática do lignocelulósico não pré-tratado, e foi de 4 vezes maior a partir da polpa celulósica, correspondendo a 85,6% de rendimento de glicose.

2.8 Hidrólise Enzimática de Materiais Lignocelulósicos

Após a etapa de pré-tratamento e a remoção da lignina remanescente deste processo é necessária uma etapa de hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentáveis. No processo enzimático a hidrólise da celulose é catalisada por enzimas específicas denominadas de enzimas celulolíticas ou celulasas.

Diante da heterogeneidade da estrutura da cadeia celulósica, a qual apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, a sacarificação enzimática da biomassa depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares cujo sinergismo é essencial para que todo carboidrato nela disponível seja hidrolisado (PITARELO, 2007).

As celulasas são usualmente uma mistura de diversas enzimas. Pelo menos três grupos principais de celulasas estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose (figura 2.13):

1. Endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4), a qual ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando cadeias com extremidades livres;
2. Exoglucanase ou celobiohidrolase (1,4- β -D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91.) a qual se liga nas extremidades das cadeias e gera principalmente glicose e celobiose.
3. β -glicosidase (EC 3.2.1.21), responsável por clivar a celobiose produzindo duas moléculas de glicose.

Durante a hidrólise enzimática, a celulose é degradada por celulases, produzindo açúcares redutores que podem ser fermentados por leveduras ou bactérias para produção de etanol (SUN; CHENG, 2002).

Figura 2.13 - Modo de ação das celulases e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose (adaptado de PITARELO, 2007).

O fungo *Trichoderma reesei* é o microrganismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulases. Entretanto, apresenta como desvantagem, a baixa produção de β -glicosidase, e isto restringe a conversão de celobiose em glicose proporcionando inibição da atividade das celulases pelo acúmulo de celobiose (SHEN; XIA, 2004; CORREDOR; BEAN; WANG, 2007).

Portanto, um suplemento de β -glicosidase, obtido a partir do fungo *Aspergillus sp*, por exemplo, é necessário para reduzir o efeito inibitório da celobiose nas celulases e aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (CHEN; ZHAO; XIA, 2008).

Vários pesquisadores têm realizado estudos de sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos utilizando xilanases (1,4- β -D-xilanase, EC 3.2.1.8) como um suplemento às celulases, deixando a fração celulósica mais acessível à ação das celulases proporcionando um aumento na conversão da celulose em glicose (ÖHGREN et al., 2007; PETERSEN; LARSEN; THOMSEN, 2009).

As xilanases, as quais são enzimas que tem como função degradar a cadeia principal de xilana constituinte da estrutura hemicelulósica, podem ser produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, dependendo do substrato e das condições de crescimento (TABKA et al., 2006).

3 OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar o efeito de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, e do pseudocaule de bananeira, avaliar a sacarificação enzimática da fração celulósica das biomassas após os pré-tratamentos, visando à produção de etanol a partir de celulose.

Específicos

- Caracterizar quimicamente cada uma das biomassas vegetais em sua forma “in natura”, pré-tratada e deslignificada;
- Utilizar as técnicas de difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho, após cada etapa de pré-tratamento e deslignificação alcalina das biomassas, a fim de analisar mudanças na estrutura química e morfológica dos materiais lignocelulósicos;
- Avaliar a conversão celulósica de cada biomassa vegetal estudada, após a hidrólise enzimática das mesmas nas formas “in natura”, pré-tratada e deslignificada, e com isso analisar a eficiência de cada pré-tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais lignocelulósicos estudados

No presente trabalho, foram avaliados os pré-tratamentos dos materiais: palha e bagaço de cana-de-açúcar, materiais gentilmente fornecidos pela Cia Açucareira Vale do Rosário – Orlândia – SP, e pseudocaule de bananeira, obtido de bananeira cultivar prata, gentilmente fornecido pelo Sítio Santa Helena– Lorena – SP.

A palha de cana foi colhida manualmente da lavoura de cana-de-açúcar, sendo removida diretamente dos colmos da cana e armazenada em sacos de plástico com capacidade de 50 L. As palhas, constituídas em grande maioria de folhas verdes, foram secas ao ar livre até apresentarem umidade abaixo de 10%.

O bagaço de cana foi colhido diretamente do balcão de armazenamento do mesmo. Após transporte à Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, ele foi seco ao ar livre até redução de sua umidade a valores inferiores a 10%. Por fim, o bagaço seco foi armazenado em sacos de plástico de capacidade de 50 L.

Já o pseudocaule de bananeira foi colhido na própria plantação de banana, sendo posteriormente cortado em pedaços menores e secos ao ar livre até apresentarem valores de umidades inferiores a 10%.

A seguir, são apresentados os fluxogramas de trabalho para cada biomassa estudada.

Figura 4.1 – Fluxograma de trabalho para a palha de cana-de-açúcar

Figura 4.2 – Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana-de-açúcar

Figura 4.3 – Fluxograma de trabalho para o pseudocaule de bananeira.

4.2 Pré-tratamentos

4.2.1 Palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar foi primeiramente submetida à moagem, para redução de tamanho, em um moinho do tipo martelo, sendo posteriormente pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, em escala piloto, num reator aço inox (AISI 316) equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica, agitado, com capacidade de 350 L, localizado no Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP (figura 4.4).

Figura 4.4 - Foto do reator piloto em que foi realizado o pré-tratamento ácido diluído e a deslignificação alcalina da palha de cana-de-açúcar (A). Vista interna do reator agitado (B).

As condições de reação empregadas foram as seguintes: 14,7 kg de palha (massa seca), 140 L de solução de H_2SO_4 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v) e agitação de 100 rpm. O reator foi carregado com 100 L de água e com 14,7 kg de palha (massa seca), e então iniciou-se o aquecimento. Ao atingir 90 °C foi adicionada a solução de H_2SO_4 , preparada com 20 L de água (1,4 kg de H_2SO_4) e mais 20 L de água para lavar o sistema e completar o volume. O reator foi fechado e aquecido até 120 °C, monitorando-se a temperatura a cada 10 min.

Ao atingir a temperatura de reação de 120 °C o sistema foi mantido por 10 min, sendo que após o término da reação, a palha de cana pré-tratada foi descarregada do reator e o hidrolisado hemicelulósico separado da massa de sólido obtida do pré-tratamento (celulignina) por centrifugação.

Esta massa de sólido foi lavada com água, até atingir pH neutro, sendo posteriormente pesada, a fim de se determinar o rendimento desta etapa, e reservada para caracterização química, ensaio de conversão enzimática e deslignificação alcalina com NaOH.

4.2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido, sem uma etapa prévia de moagem, a um pré-tratamento hidrotérmico realizado em um reator modelo REGMED AU/E-20, com sistema de mistura por rotação completa (360°), ajustável de 2 a 6 rpm, com capacidade de 20 L, localizado no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (figura 4.5).

Figura 4.5 – Foto do reator rotatório modelo REGMED AU/E-20 do Departamento de Antibióticos da UFPE, em que foi realizado o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.

As condições de pré-tratamento do bagaço de cana estudadas foram: 180 °C, 185 °C, 190 °C e 195 °C por 10 min sob relação sólido:líquido 1:10 e rotação de 6 rpm.

Cerca de 1 kg de bagaço seco juntamente com 10 L de água destilada foram adicionados ao reator e fechados hermeticamente. Posteriormente, a camisa de aquecimento do reator foi ligada e a temperatura e o tempo de reação foram monitorados. Após o tempo de reação a pressão foi liberada gradualmente até atingir a pressão do ambiente e a temperatura de 100 °C, visando diminuir a severidade do processo, sendo posteriormente descarregado.

O bagaço de cana pré-tratado foi lavado com 60 L de água (em porções de 20 L), até atingir pH neutro, para remoção de quantidades residuais do hidrolisado hemicelulósico, sendo em seguida mensurado para determinar o rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

Parte do material pré-tratado foi reservada para caracterização química, ensaio de conversão enzimática e o restante utilizado para a etapa de deslignificação alcalina com NaOH.

4.2.3 Pseudocaule de Bananeira

Os pedaços de pseudocaule de bananeira secos foram primeiramente submetidos à moagem, em um moinho de martelos, sendo em seguida pré-tratados com ácido sulfúrico diluído no reator aço inox (AISI 316) equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica, agitado, com volume de 350 L, do Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP.

As condições de reação foram as seguintes: 10 kg de pseudocaule de bananeira (massa seca), 100 L de solução de H₂SO₄ 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v) e agitação de 100 rpm. O reator foi carregado com 60 L de água e 10 kg de pseudocaule (massa seca), e então iniciou-se o aquecimento. Ao atingir 90 °C foi adicionada a solução de H₂SO₄, preparada com 20 L de água (1,0 kg de H₂SO₄) e mais 20 L de água para lavar o sistema e completar o volume. O reator foi fechado e aquecido até 120 °C, monitorando-se a temperatura a cada 10 min.

Ao atingir a temperatura de reação de 120 °C o sistema foi mantido por 10 min, sendo que após o término da reação o pseudocaule pré-tratado foi descarregado do reator, e o hidrolisado hemicelulósico separado do material pré-tratado por centrifugação.

O pseudocaule de bananeira proveniente deste pré-tratamento foi lavado com água até pH neutro e, em seguida, mensurado para determinação do rendimento mássico da etapa de pré-tratamento. Uma fração do pseudocaule pré-tratado foi reservada para posterior caracterização química, ensaio de conversão enzimática e deslignificação alcalina com NaOH.

Todos os rendimentos mássicos das etapas de pré-tratamento estudadas neste trabalho foram calculados utilizando a equação a seguir:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

onde: $m_{inicial}$: massa inicial seca de material lignocelulósico (g);
 m_{final} : massa final seca de material lignocelulósico (g);
 R: rendimento mássico da etapa.

A perda do componente macromolecular (celulose, hemicelulose e lignina) foi calculada pela seguinte equação:

$$P = 100 \times \left(\frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot R \cdot y_f}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left(1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (4.2)$$

onde: P: perda do componente macromolecular (%);
 M_i : massa inicial de material lignocelulósico;
 y_i : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico “in natura”;
 y_f : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico pré-tratado;
 R: rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

4.3 Deslignificação Alcalina

Para o processo de deslignificação dos materiais lignocelulósicos foi empregada a técnica de extração alcalina, sendo que, tanto para a palha de cana quanto para o pseudocaule de bananeira a reação foi realizada no mesmo reator em que se conduziu o pré-tratamento destas biomassas, ou seja, no reator piloto com volume de 350 L, do Departamento de Engenharia Química da EEL/USP.

As condições para esta reação foram as seguintes: 7,0 kg de material lignocelulósico (massa seca), 70 L de solução de NaOH 1,0% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v) e agitação de 100 rpm. O reator foi carregado com 50 L de água e 7,0 kg de material lignocelulósico (massa seca), e então iniciou-se o aquecimento. Ao atingir 90 °C foi adicionada a solução de NaOH, preparada com 10 L de água (700 g de NaOH) e mais 10 L de água para lavar o sistema e completar o volume. Em seguida o reator foi fechado e aquecido até 100 °C, monitorando-se a temperatura a cada 10 min.

Ao chegar à temperatura de 100 °C, o sistema reacional foi mantido por 1h, sendo que após o término da reação, os materiais deslignificados foram imediatamente descarregados do reator e o licor negro separado das polpas brutas por centrifugação.

As polpas celulósicas resultantes deste processo foram lavadas com água até atingir pH neutro e posteriormente mensuradas para se determinar o rendimento mássico da etapa de deslignificação pela equação 4.1. Uma fração da polpa bruta da palha de cana e do pseudocaule de bananeira foi separada para posterior realização da caracterização química e ensaio de conversão enzimática.

Já para o processo de deslignificação alcalina do bagaço de cana, as reações foram conduzidas em ampolas de aço inoxidável de 500 mL, devido à indisponibilidade de uso do reator REGMED AU/E-20 da UFPE.

As ampolas foram adicionadas em um banho com óleo, já com a temperatura desejada, e após o tempo de reação resfriadas em banho de gelo.

As condições da reação de deslignificação empregadas para o bagaço de cana foram: relação sólido:líquido 1:10 (m/v), NaOH 1% (m/v) e temperatura de 100 °C por 1h. Depois de resfriadas em banho de gelo, após o término da reação, as ampolas foram abertas e o resíduo sólido do processo de deslignificação foi filtrado sob vácuo, recolhendo-se o licor rico em lignina.

A fração sólida foi lavada com água destilada para remoção da lignina extraída, porém ainda não solubilizada, até pH neutro, a fim de não mais apresentar coloração amarelada no efluente da lavagem. Após este procedimento, a polpa bruta do bagaço de cana foi seca à temperatura ambiente e posteriormente mensurada quanto ao rendimento mássico do processo (equação 4.1). Uma fração de cada material deslignificado foi reservada para posterior análise de caracterização química e ensaio de conversão enzimática.

4.4 Hidrólise Enzimática

No presente trabalho, os ensaios de conversão enzimática foram realizados utilizando celulase comercial (Celluclast 1.5 L), suplementada com β -glicosidase (Novozym 188), ambas gentilmente doadas pela Empresa Novozymes Latin America Ltda – Araucária – PR.

As condições de reação empregadas foram: tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8, sob agitação de 100 rpm em incubadora de movimento rotatório a 45 °C por 72 h e relação sólido:líquido 1:10 (m/v). As cargas enzimáticas que foram utilizadas são de 15 FPU/g de material lignocelulósico seco, para o complexo Celluclast 1.5 L, e de 10 UI/g de material lignocelulósico seco para a enzima β -glicosidase, sendo estes valores baseados em dados comumente encontrados na literatura (WYMAN et al., 1999; BALLESTEROS et al., 2004; Cara et al., 2006). Este protocolo foi escolhido para se avaliar a sacarificação enzimática das biomassas vegetais após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.

Após o término da reação enzimática os hidrolisados foram fervidos por 5 min para cessar a atividade enzimática, sendo posteriormente filtrados em papel de filtro Whatmann n°1 e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme será descrito abaixo. Os resíduos da hidrólise enzimática foram reservados para posterior quantificação da massa residual deste processo.

A conversão enzimática da celulose foi calculada pela equação 4.3:

$$CC = \frac{m_{glicose} \times f_h}{m_{inicial} \times y_i} \times 100 \quad (4.3)$$

onde: CC: conversão enzimática da celulose;

$m_{glicose}$: massa de glicose presente no hidrolisado (g);

$m_{inicial}$: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise enzimática (g);

y_i : teor de celulose no material lignocelulósico;

f_h : fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9)

A atividade celulolítica total (FPase) foi determinada empregando-se a metodologia padrão de Mandels; Andreotti e Roche (1976). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 e 50 mg de

papel de filtro Whatmann n°1 como substrato. O meio foi incubado em um banho-maria à temperatura de 45 °C por 1 h, sendo que, a glicose liberada foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1956).

A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS, sendo o meio fervido, em seguida, por 5 min. Após o resfriamento, a absorbância em 540 nm foi lida em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25.

A atividade da enzima β -glicosidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução 0,1% (m/v) de p-NPG (para-nitrofenol β -1 $\rightarrow$ 4 glicosídeo).

O meio foi incubado em banho-maria a 45 °C por 30 min e após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10% (m/v) de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A quantidade de glicose liberada foi mensurada pela equivalência molar do p-NP (para-Nitrofenol) na clivagem do p-NPG ($1 \text{ p-NPG} \rightarrow 1 \text{ glicose} + 1 \text{ p-NP}$) e utilizando a absorvidade molar do p-NP ($\epsilon_{410\text{nm}} = 15.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

A absorbância em 410 nm foi lida no espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25.

4.5 Caracterização Química dos Materiais Lignocelulósicos

A caracterização química das amostras “in natura”, pré-tratada e deslignificada de palha de cana, bagaço de cana e pseudocaule de bananeira foi realizada empregando-se a metodologia analítica para bagaço de cana desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

Amostras de 2 g (massa seca) de material lignocelulósico (moído a 20 mesh) foram pesadas com precisão de 0,1 mg e transferidas para um béquer de 100 mL para serem tratadas com 10 mL de H_2SO_4 72%, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a $45,0 \pm 0,5$ °C por 7 min.

A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a amostra transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume de

água a 275 mL. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a uma pressão de 1,05 bar, a 121 °C.

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

4.5.1 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE

Os hidrolisados obtidos no item 4.5 e os obtidos pela hidrólise enzimática foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a 45 °C.

Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters).

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos a serem analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto.

4.5.2 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina.

4.5.3 Determinação do teor de cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente, estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2 h a 800 °C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

A massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item 4.5.2 e então se obter a massa real de lignina insolúvel.

4.5.4 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g de material lignocelulósico (base seca) em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2h a 800 °C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

4.5.5 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrolise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 N (pH final próximo a 12).

Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. As equações abaixo foram utilizadas para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - A}{B} \quad (4.4)$$

$$A_{PD280nm} = C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF} + C_F \cdot \epsilon_F \quad (4.5)$$

onde:

- C_{Lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);
- A_{T280nm} : Absorbância total do hidrolisado em 280 nm;
- $A_{PD280nm}$: Absorbância dos produtos de degradação em 280 nm;
- ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114,0 L.g⁻¹);
- $\epsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural (146,8 L.g⁻¹);
- C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);
- $C_{Furfural}$: Concentração de furfural no hidrolisado (g/L);
- A: Coeficiente linear;
- B: Coeficiente angular = Absortividade da lignina (L.g⁻¹).

Em seguida, foram obtidas as equações analíticas de determinação de lignina solúvel para cada material lignocelulósico estudado.

Equação analítica para a palha de cana:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - 0,031}{19,6}$$

Equação analítica para o bagaço de cana:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - 0,018}{23,7}$$

Equação analítica para o pseudocaule de bananeira:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{T280nm} - A_{PD280nm}) - 0,015}{19,3}$$

4.5.6 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹, à temperatura de 25 °C.

O hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi previamente diluído com água na razão de 1:5, sendo posteriormente filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,47 μm (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras, e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 μl . Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

4.5.7 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Primeiramente, as amostras dos materiais lignocelulósicos foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento metálico de 10 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV (equipamento disponível no Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP). As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras dos materiais lignocelulósicos estudados após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.

4.5.8 Análise dos materiais lignocelulósicos por difratometria de raios X (DRX)

Com o propósito de se avaliar a mudança de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, amostras dos materiais lignocelulósicos em estudo (moídos e devidamente secos) foram preparadas para a análise de difratometria de raios X, utilizando um difratômetro de raios X de marca Shimadzu, modelo XRD – 6000, com um tubo de cobre gerador de raios X com filamento de tungstênio ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg - 2θ), passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1s (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP).

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado pela equação 4.5 (CAO; TAN, 2002; THYGESEN et al., 2005):

$$I_c = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (4.5)$$

onde:

I_c : Índice de cristalinidade (%);

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

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

4.5.9 Análise dos materiais lignocelulósicos por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de se analisar mudanças na estrutura química dos materiais lignocelulósicos em estudo, provocadas pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação, foram realizadas análises de FTIR de acordo com o procedimento seguinte. Amostras dos materiais lignocelulósicos foram previamente secas em estufa a 60°C , juntamente com KBr, sendo posteriormente resfriadas por 30 min em dessecador com P_2O_5 sob vácuo. Pastilhas de KBr foram preparadas contendo 250 mg de KBr e 1,5 mg de amostra, e compactadas a uma pressão de 10 kgf.cm^{-2} sob vácuo.

O mesmo foi feito para a referência, contendo apenas KBr. Em seguida, foram medidos os espectros na região de 4000 a 400 cm^{-1} em um espectrofotômetro Spectrum One

Perkin Elmer. Foi feita a normalização dos espectros a fim de se comparar as amostras, pré-tratada e deslignificada com a amostra “in natura”, para cada material lignocelulósico.

4.5.10 Avaliação preliminar da fermentabilidade do hidrolisado celulósico obtido a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cana submetido a diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico

Embora não tenha sido proposto como objetivo deste trabalho, foi realizado o estudo da fermentabilidade do licor rico em glicose proveniente da hidrólise enzimática das frações obtidas de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana visando obter informações de fermentabilidade destes materiais.

Para os ensaios de fermentação dos hidrolisados utilizou-se a levedura *Candida guilliermondii* mantida em ágar extrato de malte a 4 °C. O inóculo foi obtido do cultivo da levedura em meio sintético, contendo glicose como fonte de carbono suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L) em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 20 mL de meio, pH inicial 5,5 sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório a 30 °C por 24 h de acordo com Narciso et al. (2009).

Os hidrolisados celulósicos, antes de serem empregados como meios de fermentação foram autoclavados por 15 min a 0,5 atm e, em seguida, suplementados com os mesmos nutrientes empregados para o inóculo, exceto a glicose, empregando-se as mesmas condições de cultivo para o inóculo, porém por um período de 48h. Foi realizado experimento controle contendo apenas glicose como fonte de carbono nas mesmas condições estabelecidas para os hidrolisados. Foram feitas análises dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a metodologia descrita no item 4.5.1, quanto à composição de glicose, xilose e etanol, nos tempos 0h, 28h e 48h. A viabilidade celular foi avaliada a partir de análise microscópica de lâmina preparada a fresco e corada com azul de metileno.

A tabela 4.1, a seguir, mostra as condições de obtenção dos hidrolisados bem como as abreviaturas utilizadas para cada um.

Tabela 4.1 – Hidrolisados celulósicos obtidos de bagaço de cana-de-açúcar proveniente das etapas de pré-tratamento hidrotérmico utilizados para o ensaio de fermentabilidade por *Candida guilliermondii*

Hidrolisados	Condições de obtenção dos hidrolisados
RPTB 1 A	Bagaço de cana pré-tratado a 195°C/10 min, não deslignificado
RPTB 1 B	Bagaço de cana pré-tratado a 195°C/10 min e deslignificado
RPTB 2 A	Bagaço de cana pré-tratado a 190°C/10 min, não deslignificado
RPTB 2 B	Bagaço de cana pré-tratado a 190°C/10 min e deslignificado
RPTB 3 A	Bagaço de cana pré-tratado a 185°C/10 min, não deslignificado
RPTB 3 B	Bagaço de cana pré-tratado a 185°C/10 min e deslignificado
Controle	Meio sintético (glicose pura)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento e deslignificação da palha de cana-de-açúcar

Após a reação de pré-tratamento da palha com solução de ácido diluído, o material foi lavado até pH neutro para remoção de resíduos de ácido sulfúrico e hemicelulose, obtendo-se um rendimento em massa de 56,8% para esta etapa.

O pré-tratamento com H_2SO_4 1% (m/v) a 120 °C por 10 min fez com que a maior parte da fração hemicelulósica fosse hidrolisada em açúcares (xilose, arabinose, entre outros), os quais foram solubilizados em água. O material pré-tratado (celulignina) (figura 5.1) apresentou um escurecimento da cor em relação material “in natura”.

Curreli et al. (2002) relataram escurecimento da palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico o que provavelmente pode estar associado à catálise ácida das ligações do complexo lignina-carboidrato, bem como pela formação de produtos da degradação de carboidratos. Após o processo de deslignificação da palha de cana, observou-se outra mudança na coloração deste material, desta vez apresentando uma cor mais clara que o material pré-tratado.

Este clareamento na cor está associado à grande quantidade de lignina removida na etapa de deslignificação (MUSSATO et al., 2006), que neste caso alcançou aproximadamente 78% (tabela 5.2).

Figura 5.1 - Foto da palha de cana “in natura” (A), da palha pré-tratada (B) e da polpa de palha (C).

Os resultados de caracterização química da palha de cana “in natura”, reportados na tabela 5.1, a seguir, mostraram que este material apresenta aproximadamente 38% de celulose, 29% de hemicelulose, 24% de lignina, 6% de extrativos e 2,4% de cinzas. Em

relação à quantidade de cinzas da palha de cana, é preciso levar em consideração que há diferentes concentrações de cinzas dependendo da localização da palha na cana.

A palha localizada próxima ao solo apresenta concentração de cinzas em torno de 7 a 8%. Já a palha proveniente do meio da cana e as folhas verdes apresentam quantidade de cinzas em torno de 2 a 3%, mostrando que a quantidade de cinzas da palha de cana analisada neste trabalho condiz com os resultados encontrados na literatura, já que a palha estudada neste trabalho consiste principalmente de folhas verdes (ICIDCA, 1999).

Observa-se também pela tabela 5.1 que a quantidade de celulose e lignina da palha de cana pré-tratada aumentou em relação à palha de cana “in natura”, indicando um aumento proporcional destas frações devido à grande solubilização da fração hemicelulósica. Este fato também é observado na composição do material deslignificado, onde há um aumento proporcional da quantidade da fração celulósica em relação à grande solubilização da lignina e também à solubilização de uma quantidade da fração hemicelulósica.

Porém, é importante ressaltar que há um rendimento de reação, tanto para a etapa de pré-tratamento quanto para a deslignificação e então verifica-se que há uma redução da quantidade de cada componente da biomassa ao longo do seu processamento.

Tabela 5.1 - Composição química da palha de cana “in natura”, pré-tratada e deslignificada, juntamente com o balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa

Componentes da Biomassa	Palha de cana “in natura” (%)	Palha de cana pré-tratada (%)	Corrigido pelo rendimento do pré-tratamento (%)	Palha de cana pré-tratada e deslignificada (%)	Corrigido pelo rendimento da deslignificação (%)
Rendimento	-	-	56,8%	-	63,1%
Celulose	38,1 ± 0,2	51,9 ± 0,1	29,5 ± 0,2	74,2 ± 0,2	26,6 ± 0,2
Hemicelulose	29,2 ± 0,3	17,0 ± 0,1	9,7 ± 0,3	9,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2
Lignina	24,2 ± 0,2	29,0 ± 0,1	16,5 ± 0,2	14,9 ± 0,2	5,3 ± 0,1
Cinzas	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1
Extrativos	5,9 ± 0,2	-	-	-	-
Total	99,8 ± 1,0	99,8 ± 0,3	-	99,2 ± 0,6	-

Memória de cálculo (pré-tratamento: $51,9 \times 0,568 = 29,5$); (deslignificação: $74,2 \times 0,568 \times 0,631 = 26,6$)

Tabela 5.2 – Solubilização dos componentes da palha de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento e deslignificação

Componentes da Biomassa	Solubilização no pré-tratamento (%)	Solubilização na deslignificação (%)	Solubilização total (%)
Celulose	22,7	9,8	30,2
Hemicelulose	66,9	66,2	88,8
Lignina	31,9	67,8	77,9

Analizando-se as frações solubilizadas da palha de cana-de-açúcar, após as etapas de pré-tratamento e deslignificação (tabela 5.2) verifica-se a solubilização de aproximadamente 67% da fração hemicelulósica obtida pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

Devido à hemicelulose apresentar caráter relativamente amorfo, grande polidispersidade e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose nativa (geralmente não ultrapassando o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcar), faz com que esta fração se torne muito mais susceptível à hidrólise no pré-tratamento ácido do que a fração celulósica (FENGEL; WEGENER, 1989; PITARELO, 2007).

Além disso, o pré-tratamento com ácido diluído tem a vantagem de não apenas solubilizar a hemicelulose, mas também de convertê-la em açúcares fermentáveis de baixo peso molecular (monômeros de xilose), o que elimina ou reduz a necessidade de se utilizar hemicelulases nos complexos enzimáticos durante a etapa de hidrólise enzimática (SAHA; BOTHAST, 1999; SAHA et al. 2005).

A partir das condições reacionais utilizadas no pré-tratamento da palha de cana obteve-se uma solubilização de 22,3% de celulose, mostrando que, além da extensa hidrólise da fração hemicelulósica, o pré-tratamento com ácido diluído também hidrolisa uma parte da celulose, sendo provavelmente grande parte de celulose amorfa ou de baixa cristalinidade tornando-se a fração celulósica remanescente mais susceptível à ação das celulasas (HODGE et al., 2008). Observa-se também que após a etapa de deslignificação deste material pré-tratado houve remoção de aproximadamente 89% de hemicelulose e 78% de lignina, o que pode refletir em uma melhora na conversão enzimática da celulose da palha de cana em glicose, já que tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo a eficiência do ataque enzimático (ÖHGREN et al., 2007).

Porém a solubilização de celulose de aproximadamente 30% no final indica que os processos de pré-tratamento e deslignificação ainda foram muito drásticos, acarretando numa perda substancial de celulose por degradação o que contribuirá para a diminuição do

rendimento global do processo de conversão de biomassa a etanol. Da mesma forma que o pré-tratamento ácido diluído não é seletivo para a hemicelulose, sendo que há degradação de celulose, o processo de deslignificação alcalina também não é seletivo para a lignina, sendo que os carboidratos, incluindo a celulose, podem ser degradados neste processo (FENGEL; WEGENER, 1989).

Nestas condições a celulose pode sofrer hidrólise alcalina e com isso ocorrer as reações de peeling, as quais são indesejáveis pelas seguintes razões: (1) a hidrólise alcalina promove a cisão da cadeia polimérica, decrescendo drasticamente o comprimento médio da cadeia; (2) nas reações de peeling, as unidades de açúcar com extremidades redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas e, além da perda de açúcares, os carboidratos removidos são convertidos em diversos ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali efetivo no licor de cozimento (BERGGREN et al., 2003; KNILL; KENNEDY, 2003). Em contra partida, a etapa de deslignificação contribuiu para se obter uma polpa bruta com alto teor de celulose (74%) e baixos teores de lignina e hemicelulose, contribuindo significativamente para a etapa de sacarificação enzimática da celulose.

5.1.1 Análise morfológica da palha de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias da palha de cana-de-açúcar “in natura”, pré-tratada e deslignificada são apresentadas na figura 5.2. Fazendo uma análise comparativa das fotomicrografias observa-se uma mudança significativa da estrutura morfológica da palha de cana-de-açúcar quando submetida aos processos de pré-tratamento e deslignificação.

Quando a palha de cana é submetida ao processo de pré-tratamento, grande parte das células vegetais, que corresponde às células de parênquima (células de formato achatado e floculoso formando uma camada sobre as fibras celulósicas), é removida. Após a etapa de deslignificação alcalina é possível observar grandes quantidades de fibras celulósicas livres de flocos de medula (células de parênquima), mostrando que a etapa de pré-tratamento seguido da deslignificação pode proporcionar uma melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subseqüentes, tais como para a conversão enzimática da celulose em glicose, no processo de obtenção de etanol celulósico.

Figura 5.2 - Fotomicrografias da palha de cana-de-açúcar “in natura” (A); pré-tratada (B) e deslignificada (C).

As fotomicrografias corroboram com as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa e com isso aumentando sua área superficial.

5.1.2 Determinação da cristalinidade da palha de cana-de-açúcar por difração de raios X (DRX)

A partir dos resultados das análises de difração de raios X da palha de cana “in natura”, pré-tratada e deslignificada (figura 5.3 e tabela 5.3), foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para cada material, de acordo com a equação 4.5.

Figura 5.3 - Difratogramas de raios X dos materiais: palha de cana “in natura” (—), palha de cana pré-tratada (—) e polpa bruta de palha de cana (—).

Tabela 5.3 – Índice de cristalinidade da palha de cana-de-açúcar “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação

Palha de cana-de-açúcar	Índice de cristalinidade (%)	* Rendimento das etapas (%)	Cristalinidade do material (Corrigido pelo rendimento das etapas) (%)
“in natura”	50,2	-	50,2
Pré-tratada	59,3	56,8	33,7
Polpa bruta	72,1	63,1	25,8

* Etapas: Pré-tratamento ácido diluído – Deslignificação alcalina.

Analisando a tabela 5.3 observa-se que o índice de cristalinidade (I_c), corrigido pelos rendimentos das etapas de pré-tratamento e deslignificação da biomassa vegetal, diminuiu de 50,2% (palha de cana “in natura”) para 33,7% (palha de cana pré-tratada) totalizando uma redução de 32,9% na cristalinidade do material.

Comparando-se o índice de cristalinidade da palha de cana “in natura” (50,2%) com o índice de cristalinidade da polpa bruta de palha de cana (25,8%), observa-se uma redução de 48,5% na cristalinidade do material.

Isso mostra que o objetivo das etapas de pré-tratamento e deslignificação é de aumentar o tamanho dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose de forma a melhorar sua conversão enzimática (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Muitos estudos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumenta após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO; TAN, 2002; ZHAO; WANG; LIU, 2008).

Porém, o índice de cristalinidade de um material lignocelulósico, o qual mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total, deve ser corrigido pelo rendimento da etapa de pré-tratamento pelo qual o material lignocelulósico é submetido. Como resultado, tem-se um índice de cristalinidade menor devido à redução da recalcitrância do material lignocelulósico, já que a cada etapa de pré-tratamento e deslignificação há um rompimento da estrutura rígida da biomassa vegetal diminuindo a barreira física ao transporte de massa (HIMMEL et al., 2007).

5.1.3 Análise da palha de cana-de-açúcar por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Análises por FTIR da palha de cana-de-açúcar “in natura”, pré-tratada e deslignificada, na região entre 4000-400 cm^{-1} , foram realizadas a fim de se avaliar mudanças na estrutura química da palha de cana proveniente das duas etapas de processamento desta biomassa vegetal (figura 5.4).

Figura 5.4 – Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).

Analisando a figura 5.4, observa-se a presença de uma intensa banda apresentando frequência de vibração em 3350 cm^{-1} e outra banda próxima com frequência de vibração em 2913, evidenciando a presença de estruturas químicas que apresentam ligações do tipo O–H e C–H, as quais apresentam frequência de vibração na região entre 3800-2700 cm^{-1} .

As principais mudanças entre o espectro da palha “in natura” para os espectros da palha pré-tratada e da polpa bruta de palha estão nas bandas de região de absorção entre 1900-1500 cm^{-1} , região característica de estruturas químicas do tipo C=O (relacionada a ácidos carboxílicos), e anéis aromáticos, respectivamente (FAIX, 1991; ZHAO; WANG; LIU, 2008). O espectro de FTIR da palha de cana “in natura” apresentou um pequeno decréscimo da banda referente ao pico 1728 cm^{-1} em relação à palha pré-tratada, porém este decaimento foi

bastante significativo no espectro da polpa bruta, o que provavelmente pode estar relacionado com a remoção da hemicelulose provocada pelo pré-tratamento da palha de cana.

Após a etapa de deslignificação alcalina, grande parte dos ácidos orgânicos presentes na fração hemicelulósica ainda remanescente do pré-tratamento foi removida, o que poderia explicar a redução do pico em 1728 cm^{-1} , característica da ligação $\text{C}=\text{O}$. Da mesma forma, o decréscimo na intensidade da banda em 1513 cm^{-1} (característica de anéis aromáticos), pode estar relacionado à remoção da lignina, devido às etapas de pré-tratamento ácido diluído seguido da deslignificação alcalina.

5.1.4 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar

Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar “in natura”, pré-tratada e deslignificada, com o objetivo de se avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na conversão de celulose em glicose (tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar

Palha de cana-de-açúcar	Condição do processo	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)
“in natura”	-	$7,4 \pm 0,2$	$7,7 \pm 1,3$
Pré-tratada	H_2SO_4 1% (m/v), 120 °C, 10 min	$55,1 \pm 0,2$	$51,4 \pm 3$
Polpa bruta	NaOH 1% (m/v), 100 °C, 1h	$105,5 \pm 0,4$	$85,0 \pm 0,5$

Analisando a tabela 5.4, observa-se que após a etapa de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído a conversão de celulose obtida foi de 51,4%, com uma concentração de glicose de 55,1 g/L no hidrolisado, sendo estes valores muito superiores aos obtidos pela sacarificação enzimática da palha de cana “in natura”, os quais atingiram 7,7% de conversão celulósica e 7,4 g/L de concentração de glicose no hidrolisado. Após a sacarificação enzimática da polpa bruta da palha de cana, a concentração de glicose chegou a 105,5 g/L, com uma conversão de 85,0% de celulose, mostrando que a remoção da hemicelulose e posteriormente da lignina aumentam consideravelmente a conversão de celulose para a palha de cana.

Diversos autores têm mostrado que a redução do conteúdo de hemicelulose e lignina favorecem a hidrólise enzimática da fração celulósica (HSU, 1996; LIAO et al., 2005; ÖHGREN et al., 2006).

Tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma barreira física contra o ataque enzimático à celulose, sendo a lignina um dos principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (BERLIN et al., 2005), pois as celulases adsorvem irreversivelmente à superfície da lignina permitindo apenas que pequenas quantidades destas enzimas sejam adsorvidas na celulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; PALONEN et al., 2004).

Os resultados obtidos corroboraram com os relatados na literatura evidenciando que a remoção destes componentes pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação provoca uma extensa mudança na estrutura morfológica da biomassa lignocelulósica (conforme observado nas fotomicrografias) tornando-a mais acessível ao contato com as enzimas celulolíticas e proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão de biomassa lignocelulósica em glicose e conseqüentemente em etanol.

A figura 5.5 apresentada a seguir ilustra o comportamento da hidrólise enzimática da palha de cana em relação às diferentes quantidades de lignina presentes neste material lignocelulósico (A), como também em relação à cristalinidade da celulose da palha de cana (B). Observa-se que a conversão enzimática aumenta consideravelmente à medida que a quantidade de lignina e a cristalinidade da celulose da palha de cana diminuem, sendo os valores submetidos a um ajuste polinomial.

Figura 5.5 – Comportamento da hidrólise enzimática da palha de cana em relação às diferentes quantidades de lignina presente (A), e à cristalinidade da celulose presente neste material lignocelulósico (B).

5.2 Pré-tratamento e deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

Após a etapa de pré-tratamento para a remoção da fração hemicelulósica observa-se um escurecimento do bagaço de cana pré-tratado em relação ao “in natura” (figura 5.6), da mesma forma em que foi observado para a palha de cana.

Figura 5.6 – Foto do bagaço de cana “in natura” (A) e após o pré-tratamento hidrotérmico: (B) 180°C/10 min, (C) 185°C/10 min, (D) 190°C/10 min e (E) 195°C/10 min.

Observa-se nas fotos da figura 5.6 que quanto maior é a temperatura utilizada no pré-tratamento, maior é a abertura dos “pacotes de fibras”, tornando-se o material mais cominuído.

As rampas de aquecimento até as temperaturas desejadas e o posterior resfriamento após as reações foram descritos para cada condição de pré-tratamento estabelecida, com a finalidade de se calcular a severidade do processo, conforme observados pela figura 5.7.

O fator severidade obtido para cada condição de pré-tratamento estabelecida para o bagaço de cana-de-açúcar, juntamente com os valores de solubilização das frações deste material lignocelulósico, são abordados na tabela 5.7.

Figura 5.7 – Rampas de aquecimento dos ensaios de pré-tratamento realizados no reator modelo REGMED AU/E-20. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.

Após a reação de pré-tratamento nas seguintes condições estabelecidas, o bagaço de cana foi lavado com água, até pH neutro, para remoção de hemicelulose residual que poderia estar impregnada nas fibras, sendo que após a secagem foram determinados os seguintes rendimentos: 62,1%, para a condição 180 °C/10 min; 55,5%, para a condição 185 °C/10 min; 51,7%, para a condição 190 °C/10 min e 49,6% para a condição 195 °C/10 min. Estes valores foram submetidos a um ajuste polinomial, conforme apresentado no gráfico da figura 5.8.

Figura 5.8 – Ajuste polinomial dos valores de rendimento do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar em função da temperatura

As tabelas 5.5 e 5.6 mostram os resultados de caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e após as etapas de pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina. Analisando a tabela 5.5, observa-se que a composição química do bagaço de cana “in natura” apresenta quantidades um pouco menores de hemicelulose (25,9%) e lignina (22,1%) do que a palha de cana (29,2% de hemicelulose e 24,2% de lignina), porém possui em torno de 42,3% de celulose, enquanto que para a palha de cana foram observados 38,1% de celulose.

Após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico e de deslignificação alcalina o bagaço de cana foi caracterizado quimicamente quanto às frações constituintes desta biomassa, sendo estes valores corrigidos pelo rendimento das etapas (tabelas 5.5 e 5.6).

Tabela 5.5 - Composição química e balanço de material do bagaço de cana “in natura” e após as condições de pré-tratamento pré-estabelecidas

Componentes	Bagaço de cana “in natura”	Condições de pré-tratamento do bagaço de cana							
		180°C/10 min		185°C/10 min		190°C/10 min		195°C/10 min	
Rendimento	-	-	*62,1%	-	*55,5%	-	*51,7%	-	*49,6%
Celulose	42,8 ± 0,3	54,3 ± 0,3	33,7 ± 0,3	58,8 ± 0,7	32,5 ± 0,7	60,8 ± 0,9	31,4 ± 0,9	63,4 ± 1,1	31,4 ± 1,1
Hemicelulose	25,9 ± 0,3	15,4 ± 0,2	9,6 ± 0,2	15,1 ± 0,4	8,4 ± 0,4	8,9 ± 0,4	4,6 ± 0,4	5,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Lignina	22,1 ± 0,2	26,2 ± 0,1	16,3 ± 0,1	24,8 ± 0,1	13,8 ± 0,1	24,9 ± 0,7	12,9 ± 0,7	28,5 ± 1,2	14,1 ± 1,2
Cinzas	1,4 ± 0,1	4,1 ± 0,6	2,5 ± 0,6	1,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0	5,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Extrativos	6,1 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	98,3 ± 1,0	100,0 ± 1,2	-	100,0 ± 1,2	-	100,0 ± 2,1	-	99,9 ± 1,5	-

* Valores de caracterização química do bagaço de cana, corrigidos pelos rendimentos das etapas de pré-tratamento.

Tabela 5.6 – Composição química e balanço de material do bagaço de cana deslignificado após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico

Componentes	Deslignificação do bagaço de cana pré-tratado – Condições: NaOH 1,0% (m/v), 100°C por 1h, provenientes dos pré-tratamentos a:							
	180°C/10 min		185°C/10 min		190°C/10 min		195°C/10 min	
Rendimento	-	*75,1%	-	*74,4%	-	*68,6%	-	*59,7%
Celulose	65,3 ± 0,6	30,5 ± 0,6	68,5 ± 0,1	28,3 ± 0,1	73,1 ± 0,6	25,9 ± 0,6	79,2 ± 0,6	23,5 ± 0,6
Hemicelulose	12,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1	9,9 ± 0,2	4,1 ± 0,2	7,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Lignina	19,8 ± 0,7	9,2 ± 0,7	18,8 ± 1,3	7,8 ± 1,3	17,3 ± 0,9	6,1 ± 0,9	14,2 ± 0,3	4,2 ± 0,3
Cinzas	2,9 ± 0,9	1,4 ± 0,9	2,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	2,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	3,6 ± 0,4	1,1 ± 0,4
Total	100,3 ± 2,3	-	99,2 ± 0,8	-	100,1 ± 1,6	-	100,7 ± 1,5	-

* Valores de caracterização química do bagaço de cana deslignificado, corrigidos pelos rendimentos das etapas de pré-tratamento e deslignificação.

Tabela 5.7 – Solubilização dos componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento pré-estabelecidas

Solubilização dos componentes após o pré-tratamento	Condições de pré-tratamento do bagaço de cana			
	180°C/10 min	185°C/10 min	190°C/10 min	195°C/10 min
Fator Severidade	4,5	4,9	5,0	5,4
Celulose	21,2%	23,8%	26,6%	26,5%
Hemicelulose	63,1%	67,6%	82,2%	88,7%
Lignina	26,4%	37,7%	41,8%	36,0%

Analizando as frações solubilizadas após as condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (tabela 5.7) observa-se que quanto maior é a severidade do pré-tratamento, maior é a quantidade de hemicelulose removida, sendo alcançados 88,7% de solubilização para a condição de 195°C/10 min.

Em processos de pré-tratamento hidrotérmico conduzidos a elevadas temperaturas, o tempo de aquecimento do reator pode ser relativamente longo em comparação com a duração da reação na temperatura pré-estabelecida, proporcionando uma solubilização pronunciada da fração hemicelulósica durante a fase de aquecimento (CARRASCO; ROY, 1992).

Pela tabela 5.7, verificou-se também um ligeiro aumento na solubilização de uma parte da fração celulósica, chegando a aproximadamente 26,6% entre 190 e 195°C/10 min, e também solubilização de uma fração da lignina do bagaço de cana-de-açúcar, alcançando 41,8% em 190°C/10 min.

Vários resíduos agrícolas têm apresentado comportamentos diferentes quanto ao aumento da susceptibilidade da hidrólise da fração celulósica, alcançando até 50% de degradação da celulose em experimentos realizados a temperaturas na faixa de aplicação para o pré-tratamento hidrotérmico, variando entre 150-230°C aproximadamente (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999). Porém, fatores como a relação sólido/líquido e o tempo de reação empregado são importantes para o controle da degradação da fração celulósica evitando a perda de rendimento no processo de conversão enzimática da fração celulósica em glicose para a obtenção de etanol.

O processo de solubilização da lignina pelo pré-tratamento hidrotérmico envolve a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, solubilizando os fragmentos de lignina de baixo peso molecular. Em um processo subsequente (etapa mais lenta) pode haver repolimerização da lignina na presença de ácidos orgânicos liberados pelo pré-tratamento hidrotérmico formando produtos de condensação insolúveis. Para uma dada temperatura, a

fração de lignina solubilizada aumenta com o tempo de reação alcançando um valor máximo, e depois diminui (HEITZ et al., 1991).

Como resultado do pré-tratamento hidrotérmico, o material resultante desta etapa apresentou melhor susceptibilidade para a deslignificação alcalina, como pode ser observado nas tabelas 5.6 e 5.8.

Tabela 5.8 – Solubilização total dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina

Componentes da Biomassa	180°C/10min	185°C/10min	190°C/10min	195°C/10min
Celulose	28,8%	33,9%	39,4%	45,2%
Hemicelulose	77,9%	84,2%	90,3%	95,8%
Lignina	58,2%	64,9%	72,2%	80,9%

A deslignificação com NaOH 1,0% (m/v) a 100°C por 1h possibilitou a solubilização de grande quantidade de lignina alcançando aproximadamente 81% para o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da condição de pré-tratamento hidrotérmico a 195°C/10 min. Porém, uma quantidade significativa da fração celulósica foi solubilizada chegando a aproximadamente 45% para a mesma condição de pré-tratamento do bagaço de cana. O fato do pré-tratamento hidrotérmico ter proporcionado grande solubilização da fração hemicelulósica, solubilização de fragmentos de lignina de baixo peso molecular promovendo a redução da recalcitrância do material lignocelulósico, aumentou a área superficial disponível da celulose, promovendo uma extensa degradação deste polímero no processo de deslignificação alcalina do bagaço de cana proveniente do pré-tratamento com maior severidade.

5.2.1 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Analisando as fotomicrografias do bagaço de cana “in natura” (figura 5.9 A) e após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico a 195°C/10 min (figura 5.9 C) observa-se que o pré-tratamento promoveu uma fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico, mas com grande quantidade de flocos de medula (células de parênquima).

Após a etapa de deslignificação alcalina do bagaço pré-tratado hidrotermicamente a 195°C/10 min (figura 5.9 E), verifica-se que as fibras estão bem mais nítidas e bem mais

acessíveis à atuação das enzimas para uma melhor conversão enzimática da fração celulósica. As fotomicrografias do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotêrmicamente a 180°C/10 min, 185°C/10 min, 190°C e deslignificado após cada condição de pré-tratamento encontram-se no apêndice desta dissertação.

Figura 5.9 – Fotomicrografias do bagaço de cana “in natura”, pré-tratado hidrotêrmicamente a 195 °C por 10 min e pré-tratado hidrotêrmicamente e deslignificado com NaOH 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h.

5.2.2 Determinação da cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar por difração de raios X

Os resultados de cristalinidade do bagaço após o pré-tratamento hidrotérmico são reportados na figura 5.10.

Figura 5.10 – Difratograma de raios X do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições: 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min, 195 °C/10 min e “in natura”.

Tabela 5.9 – Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e após o pré-tratamento hidrotérmico

Bagaço de cana-de-açúcar	Índice de cristalinidade (%)	Rendimento do pré-tratamento (%)	Cristalinidade do material (corrigido pelo rendimento do pré-tratamento) (%)
“in natura”	52,4	-	52,4
Pré-tratado: 180 °C/10 min	59,4	62,1	36,9
Pré-tratado: 185 °C/10 min	65,1	55,5	36,1
Pré-tratado: 190 °C/10 min	72,1	51,7	37,3
Pré-tratado: 195 °C/10 min	70,3	49,6	34,9

De acordo com os resultados mostrados na tabela 5.9 evidencia-se que o pré-tratamento hidrotérmico favoreceu a redução da cristalinidade do bagaço de cana, quando

comparado com este material na forma “in natura”. A cristalinidade reduziu a valores muito próximos para as quatro condições estudadas no pré-tratamento pelo qual o bagaço de cana foi submetido, atingindo aproximadamente 30% de redução, sendo este valor similar ao valor de redução da cristalinidade obtido pelo pré-tratamento ácido diluído da palha de cana (33%).

Analisando os resultados de cristalinidade do bagaço de cana deslignificado após o pré-tratamento hidrotérmico, presentes na figura 5.11 e tabela 5.10, observa-se que a redução de cristalinidade, em termos percentuais, deste material comparado com o bagaço de cana “in natura” foi crescente, sendo obtidos os seguintes valores: 31,6%, 30,1%, 25,1% e 21,8%, proveniente das condições de pré-tratamento a 180°C/10 min, 185°C/10 min, 190°C/10 min e 195°C/10 min, respectivamente.

Figura 5.11 – Difratograma de raios X da polpa bruta de bagaço de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento: 195°C/10 min, 190°C/10 min, 185°C/10 min e 180°C/10 min.

Tabela 5.10 – Índice de cristalinidade do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado após o pré-tratamento hidrotérmico

Bagaço de cana-de-açúcar deslignificado após pré-tratamento a:	Índice de cristalinidade (%)	Rendimento do pré-tratamento (%)	Rendimento da deslignificação (%)	Cristalinidade do material (corrigido pelo rendimento do pré-tratamento e deslignificação) (%)
180 °C/10 min	67,8	62,1	75,1	31,6
185 °C/10 min	72,8	55,5	74,4	30,1
190 °C/10 min	70,9	51,7	68,6	25,1
195 °C/10 min	73,7	49,6	59,7	21,8

Este fato comprova os efeitos favoráveis proporcionados pelo pré-tratamento hidrotérmico, que dentre os quais estão o aumento da área superficial disponível, causado pela fragmentação da lignina, remoção de grande parte da fração hemicelulósica e aumento do volume dos poros dos materiais lignocelulósicos; mudanças na microestrutura, incluindo perda de cristalinidade, desfibracão e desfibrilação, também mencionados por outros autores (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999).

Bobleter (1994) relatou também em seu trabalho que, para a solubilização da hemicelulose, no pré-tratamento hidrotérmico, são requeridas temperaturas mais elevadas do que no pré-tratamento ácido diluído, sendo a hemicelulose facilmente solubilizada a partir de 180 °C, promovendo também solubilização de uma parte da lignina. Isto mostra que o pré-tratamento hidrotérmico respondeu muito bem à redução de cristalinidade das biomassas lignocelulósicas.

Estes fatores favorecem a etapa de deslignificação alcalina, resultando em grande redução da cristalinidade da celulose.

5.2.3 Análise do bagaço de cana-de-açúcar por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 5.12, a seguir, mostra os espectros de FTIR normalizados em $1921,68\text{ cm}^{-1}$. As principais diferenças apresentadas entre os espectros do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, bagaço de cana pré-tratado a $195^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ e bagaço de cana deslignificado encontram-se nas bandas de região de absorção entre $1500\text{ e }1900\text{ cm}^{-1}$, região característica

de estruturas químicas do tipo C=O (relacionada a ácidos carboxílicos), e anéis aromáticos, respectivamente.

Figura 5.12 – Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).

Observa-se que após a etapa de pré-tratamento, para solubilização da fração hemicelulósica, a quantidade de celulose e lignina aumenta em proporção à retirada da hemicelulose. Logo, a banda referente ao pico em 1513 cm^{-1} , característica de anéis aromáticos aumenta, evidenciando o aumento da quantidade de lignina no bagaço de cana pré-tratado. Após a etapa de deslignificação alcalina observa-se uma redução da banda referente ao pico em 1513 (referente a anel aromático), o que provavelmente está associado à remoção da lignina. Outra banda importante para a visualização do pré-tratamento é a referente ao pico em 1728 cm^{-1} , a qual corresponde a ligações do tipo C=O, presente nos ácidos orgânicos constituintes da estrutura hemicelulósica.

Quando a hemicelulose é removida pela etapa de pré-tratamento, há uma redução do pico em 1728^{-1} , sendo este praticamente removido após a etapa de deslignificação alcalina. Os espectros de infravermelho do bagaço de cana pré-tratado nas demais condições estudadas:

180°C/10 min, 185°C/10 min, 190°C/10 min e após a etapa de deslignificação alcalina estão reportados no apêndice desta dissertação para consulta, visto estes resultados terem apresentado comportamento muito próximo aos do espectro aqui reportado.

5.2.4 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, pré-tratado e deslignificado, com o objetivo de se avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico e da deslignificação alcalina na conversão de celulose, sendo os resultados apresentados na tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Efeito do pré-tratamento hidrotérmico e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Material	Condição do Pré-tratamento	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)
Bagaço de cana “in natura”	-	8,3 ± 0,2	6,0 ± 0,3
Bagaço de cana pré-tratado	180°C/10min	39,2 ± 0,5	37,4 ± 0,5
	185°C/10min	42,5 ± 0,4	40,8 ± 1,8
	190°C/10min	57,6 ± 0,6	56,9 ± 0,7
	195°C/10min	66,8 ± 1,3	69,2 ± 2,6
Polpa bruta de bagaço de cana	180°C/10min	63,1 ± 0,5	73,0 ± 0,7
	185°C/10min	71,6 ± 0,8	78,5 ± 0,6
	190°C/10min	74,5 ± 0,5	82,3 ± 0,6
	195°C/10min	86,0 ± 0,4	89,2 ± 2,2

Analisando a tabela 5.11, observa-se que após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico a máxima conversão de celulose obtida (para a condição de pré-tratamento: 195°C/10 min) foi de 69,2%, com uma concentração de glicose de 66,8 g/L no hidrolisado, sendo estes valores muito superiores aos obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana “in natura”, os quais atingiram 6,0% de conversão celulósica e 8,3 g/L de concentração de glicose no hidrolisado.

Foi observado na tabela 5.7 que, à medida que a severidade do pré-tratamento aumenta da condição de 180°C/10 min até 195°C/10 min, maiores são: a solubilização da fração hemicelulósica, alteração na estrutura da celulose (principalmente em relação à sua característica físico-química) a qual ficou mais acessível à atuação das enzimas celulolíticas e mudança na estrutura química da lignina, com a liberação de fragmentos de lignina de baixa massa molar presentes no hidrolisado obtido do pré-tratamento, conforme também relatado por (PETERSEN; LARSEN; THOMSEN, 2009). Todos estes fatores refletiram diretamente em um aumento da conversão celulósica em glicose, como pode ser observado pelo aumento na concentração de glicose no hidrolisado enzimático, mostrado na tabela 5.11.

Verificou-se também que, o bagaço de cana proveniente da etapa de pré-tratamento hidrotérmico a 195°C/10 min quando deslignificado com NaOH 1,0% (m/v) a 100°C por 1h, apresentou melhor conversão enzimática da celulose que os demais materiais pré-tratados e deslignificados. Provavelmente este material apresentou uma estrutura de lignina mais fácil de ser removida, pequena quantidade de hemicelulose na fibra (3,7% - tabela 5.7) e uma fração celulósica com menor grau de polimerização e mais acessível à ação do complexo celulolítico, indicando que há uma melhora significativa da conversão enzimática da celulose após a etapa de pré-tratamento e também de deslignificação, fato já relatado por outros autores (RAMOS; NAZHAD; SADDLER, 1993; ÖHGREN et al., 2007; MUSSATTO et al., 2008).

As correlações obtidas a partir dos dados de hemicelulose e lignina residuais no bagaço após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, bem como o índice de cristalinidade corrigido pelos rendimentos em função do rendimento de conversão enzimática da fração celulósica presentes foram submetidos a uma regressão linear sendo os resultados mostrados no gráfico da figura 5.13.

Figura 5.13 – Regressão linear dos valores de conversão enzimática da celulose em função da quantidade de lignina e hemicelulose residuais, e do índice de cristalinidade.

5.3 Pré-tratamento e deslignificação do pseudocaule de bananeira

Após a reação de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em escala piloto, o pseudocaule foi lavado até pH neutro para remoção de resíduos de ácido e hemicelulose que poderiam estar impregnados sobre a fibra da biomassa lignocelulósica, obtendo-se posteriormente um rendimento de 59,2%. Por se tratar de uma biomassa lignocelulósica nunca antes trabalhada neste grupo de pesquisa, foram utilizados os métodos analíticos empregados para palha e bagaço de cana, para a caracterização química das frações presentes no pseudocaule de bananeira.

Analisando a tabela 5.12, a seguir, observa-se que o pseudocaule de bananeira apresenta um teor de cinzas bem maior do que a palha e o bagaço de cana-de-açúcar. Para alguns autores, geralmente a bananeira e a maioria das plantas fibrosas utilizadas na produção de celulose possuem elevados teores de cinzas e de substâncias solúveis em água fria, em água quente e em NaOH 1,0%, e menores teores de lignina e holocelulose (celulose e hemicelulose), em relação às madeiras folhosas (SILVA, 1998; CORDEIRO et al., 2004).

Tabela 5.12 - Composição química do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado, juntamente com o balanço de material após cada etapa de processamento da biomassa

Componentes da Biomassa	Pseudocaule “in natura” (%)	Pseudocaule pré-tratado (%)	Corrigido pelo rendimento do pré-tratamento (%)	Pseudocaule pré-tratado e deslignificado (%)	Corrigido pelo rendimento do pré-tratamento e deslignificação (%)
Rendimento	-	-	59,2%	-	74,8%
Celulose	46,9 ± 0,9	55,8 ± 0,3	33,0	75,5 ± 0,1	33,4
Hemicelulose	17,3 ± 0,4	12,0 ± 0,5	7,1	8,1 ± 0,2	3,6
Lignina	18,7 ± 0,3	27,1 ± 0,2	16,0	15,9 ± 0,2	7,0
Cinzas	9,2 ± 0,0	6,0 ± 0,1	3,6	1,4 ± 0,1	0,6
Extrativos	4,9 ± 0,0	-	-	-	-
Total	97,0 ± 1,6	100,9 ± 1,1	-	100,9 ± 0,6	-

A maioria dos constituintes minerais existentes nas bananeiras está relacionada aos aspectos fisiológicos do vegetal, pois esses elementos são importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Além disso, no processo de caracterização química do pseudocaule de bananeira “in natura”, foram observados picos, durante a análise de cromatografia líquida de alta eficiência, referentes a compostos não identificados pelos padrões de carboidratos utilizados para a caracterização química das biomassas lignocelulósicas estudadas neste trabalho.

Estudos já realizados de caracterização química do pseudocaule de bananeira mostraram que esta biomassa apresenta como constituintes da sua fração de carboidratos: manose e galactose (SILVA, 1998), além de glicose, xilose e arabinose, estes comumente encontrados em palha e bagaço de cana.

Analizando a tabela 5.13, verificou-se que após a etapa de pré-tratamento com H₂SO₄ 1,0% (m/v), a 120 °C, por 10 min, a remoção de hemicelulose foi próxima a 60%. Da mesma forma que a palha de cana, o pré-tratamento ácido diluído proporcionou a remoção de boa parte da fração hemicelulósica e aumentou a exposição da celulose à digestão enzimática.

Tabela 5.13 – Solubilização dos componentes do pseudocaule de bananeira após as etapas de pré-tratamento ácido e deslignificação alcalina

Componentes da Biomassa	Solubilização no pré-tratamento (%)	Solubilização na deslignificação (%)	Solubilização total (%)
Celulose	29,6	1,2	28,7
Hemicelulose	58,9	49,5	79,3
Lignina	14,2	56,1	62,3

Pelo fato da bananeira apresentar baixo teor de lignina deveria favorecer a etapa de deslignificação. Entretanto, para a remoção desta lignina são necessárias cargas de álcali relativamente altas, o que provavelmente pode explicar a pequena quantidade de lignina extraída do pseudocaule de bananeira, neste ensaio, chegando a 62,3%.

A perda global de celulose chegou a 28,7%, sendo este valor próximo ao valor referente à perda de celulose no pré-tratamento ácido diluído da palha de cana, o qual alcançou aproximadamente 30%, mostrando que este pré-tratamento também foi muito drástico para o pseudocaule de bananeira, proporcionando uma perda de rendimento global no processo de conversão de celulose em etanol.

5.3.1 Análise morfológica do pseudocaule de bananeira por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado são apresentadas na figura 5.14. Analisando a fotomicrografia A, referente ao pseudocaule “in natura”, observa-se uma estrutura bastante fibrosa recoberta por células vegetais com a presença de grande quantidade de pequenas esferas recobrindo a superfície das fibras.

Cordeiro et al. (2006) encontraram pequenos elementos minerais sobre as fibras de diversas frações da bananeira, pela análise de microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a grande quantidade de cinzas presentes nesta biomassa lignocelulósica. Silva (1998) realizou uma minuciosa caracterização dos elementos minerais presentes nas fibras do pseudocaule de bananeira e verificou a presença de potássio, magnésio, silício e cálcio como os principais constituintes inorgânicos do pseudocaule e das frações fibrosas da bananeira, sendo o potássio e o silício elementos bastante abrasivos. As pequenas esferas visualizadas na fotomicrografia 5.14 A, provavelmente podem ser de elementos minerais, já que esta fotomicrografia corresponde ao pseudocaule “in natura”.

Figura 5.14 - Fotomicrografias do pseudocaule de bananeira “in natura” (A), pré-tratado (B) e deslignificado (C).

Pode-se deduzir que após o pré-tratamento ácido diluído houve remoção de células de parênquima, elementos de vasos e substâncias solúveis como taninos, substâncias pécicas, gomas e materiais mucilaginosos localizados no interior dessas células (figura 5.14 B). Após a etapa de deslignificação, as fibras celulósicas apresentaram-se mais soltas e livres de células floculosas de parênquima, permitindo melhor atuação das enzimas celulolíticas (figura 5.14 C).

5.3.2 Determinação da cristalinidade do pseudocaule de bananeira por difração de raios X

A partir dos resultados das análises de difração de raios X do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado (figura 5.15 e tabela 5.14), foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para cada material, de acordo com a equação 4.5. Pelos resultados obtidos observa-se uma redução de cristalinidade de 26,3% em relação ao pseudocaule “in natura”, sendo que após a etapa de deslignificação alcalina totalizou-se uma redução de 37% da cristalinidade do pseudocaule em relação ao material inicial.

Figura 5.15 - Difratograma de raios X dos materiais: pseudocaule de bananeira “in natura” (—), pseudocaule de bananeira pré-tratado (—) e polpa bruta de pseudocaule de bananeira (—).

Tabela 5.14 – Índice de cristalinidade do pseudocaule de bananeira “in natura” e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação

Pseudocaule de bananeira	Índice de cristalinidade (%)	Rendimento das etapas* (%)	Cristalinidade do material (corrigido pelo rendimento das etapas (%))
“in natura”	43,0	-	43,0
Pré-tratado	53,6	59,2	31,7
Polpa bruta	61,3	74,8	27,1

* Etapas: Pré-tratamento ácido diluído – Deslignificação alcalina.

O pseudocaule de bananeira apresentou menor redução da cristalinidade total, proporcionado pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação, quando comparado com a palha e o bagaço de cana. Provavelmente as condições empregadas para o pré-tratamento e a deslignificação do pseudocaule não foram suficientes para proporcionar uma alta redução da recalcitrância deste material, visto ser uma biomassa que apresenta maior dificuldade em se remover a lignina, devido sua composição apresentar grandes quantidades de extrativos, cinzas, e lignina de difícil extração.

5.3.3 Análise do pseudocaule de bananeira por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizadas análises de FTIR do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado, na região entre 4000-400 cm^{-1} , a fim de se avaliar mudanças na estrutura química do pseudocaule proveniente das duas etapas de processamento deste material lignocelulósico (figura 5.16).

Analizando os espectros de infravermelho, os quais foram normalizados em 1490,91 cm^{-1} para comparação com o pseudocaule “in natura”, observa-se a presença de uma banda intensa apresentando frequência de vibração em 3350 e outra banda próxima com frequência de vibração em 2913, evidenciando a presença de estruturas químicas que apresentam ligações do tipo O–H e C–H, as quais apresentam frequência de vibração na região entre 3800-2700 cm^{-1} , conforme relatado por Zhao; Wang e Liu (2008).

As principais mudanças observadas entre os espectros do pseudocaule de bananeira “in natura”, pré-tratado e deslignificado estão nas bandas de região de absorção entre 1900-1500 cm^{-1} , região que abrange grupos funcionais como C=O (os quais estão presentes em

ácidos carboxílicos como ácido acético, ácido glucurônico), e anéis aromáticos (os quais estão presentes na estrutura da lignina), respectivamente.

Figura 5.16 – Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do pseudocaule de bananeira “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).

O espectro de FTIR do pseudocaule de bananeira apresentou um comportamento diferente do esperado pelo proposto pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação. Observa-se pelo espectro, na banda referente ao pico em 1728 cm^{-1} , característica da ligação $\text{C}=\text{O}$, a presença de um “ombro” maior no material pré-tratado do que no material “in natura”, indicando a possibilidade de oxidação de algum composto presente na composição química do pseudocaule.

Após a etapa de deslignificação alcalina verificou-se uma redução do pico em 1728 cm^{-1} devido à solubilização da fração hemicelulósica que ainda estava presente na fibra pré-tratada do pseudocaule, porém quando se observou a banda referente ao pico em 1513 cm^{-1} , típico de anel aromático, verificou-se um aumento desta banda desde o material “in natura” até o material deslignificado. Este fato pode estar relacionado à liberação e posterior condensação de compostos aromáticos componentes desta biomassa, os quais possuem baixa massa molecular e foram detectados nesta região do espectro, sendo denominados por vários autores como “pseudolignina” (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 1999). Este fato corrobora com os altos teores de lignina encontrados nas análises químicas desta biomassa vegetal.

5.3.4 Hidrólise enzimática do pseudocaule de bananeira

Amostras de pseudocaule de bananeira nas formas “in natura”, pré-tratado e deslignificado foram submetidas a ensaios de sacarificação enzimática a fim de avaliar o efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na conversão da celulose (tabela 5.15).

Os resultados obtidos mostraram que o pseudocaule de bananeira “in natura” apresentou uma conversão da celulose de 15,2%, sendo um valor quase duas vezes maior do que a conversão da celulose da palha de cana “in natura”. Este fato provavelmente ocorreu devido o pseudocaule de bananeira apresentar uma estrutura bastante fibrosa, com maior quantidade de celulose e menores quantidades de hemicelulose, lignina, além de apresentar menor índice de cristalinidade do que a palha de cana, sendo estes fatores importantes para uma eficiente conversão enzimática da celulose.

Tabela 5.15 – Efeito do pré-tratamento ácido diluído e da deslignificação alcalina na sacarificação enzimática do pseudocaule de bananeira

Pseudocaule de bananeira	Condição do processo	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)
“in natura”	-	33,11 ± 0,5	15,2 ± 0,7
Pré-tratado	H ₂ SO ₄ 1% (m/v), 120 °C, 10 min	37,1 ± 0,2	32,3 ± 0,7
Polpa bruta	NaOH 1% (m/v), 100 °C, 1h	74,4 ± 0,1	61,0 ± 0,2

Quando o pseudocaule de bananeira pré-tratado com ácido diluído foi submetido ao ensaio conversão enzimática da celulose, obteve-se um valor de 32,3% de conversão, e para a conversão de celulose da polpa bruta de pseudocaule um valor de 61,0%.

Observa-se que o pré-tratamento do pseudocaule de bananeira foi bastante severo; por se tratar de um material bastante fibroso, já nesta etapa a perda de celulose alcançou aproximadamente 30%. Além disso, quantidades relativamente elevadas de hemicelulose e lignina, ainda presentes na polpa do pseudocaule de bananeira (20,7% e 37,7%, respectivamente), provavelmente são responsáveis pela menor conversão de celulose, quando comparado com a quantidade de hemicelulose e lignina presentes na polpa de palha de cana (11,2% e 22,2%, respectivamente), mostrando a importância da remoção destas frações para o

aumento da conversão enzimática da celulose, conforme relatado por diversos autores (ÖHGREN et al., 2007).

De forma geral, estes resultados são satisfatórios para os testes de conversão enzimática de uma biomassa que possui uma estrutura química bem diferenciada da palha e do bagaço de cana, os quais já se trabalham neste grupo de pesquisas há mais tempo.

5.4 Resultados preliminares da fermentabilidade do hidrolisado celulósico obtido a partir da sacarificação enzimática do bagaço de cana submetido a diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico

Os gráficos da figura 5.17 apresentam o comportamento da levedura *Candida guilliermondii* durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos por sacarificação enzimática do bagaço de cana após diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 5.17 - Continua...

Figura 5.17 – Continuação...

Figura 5.17 – Comportamento da levedura *Candida guilliermondii* durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana proveniente de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico. (Concentrações dos açúcares (g/L): (■) glicose; (●) xilose; (▲) etanol.

Analisando os gráficos da figura 5.17 observa-se uma similaridade quanto ao consumo da glicose e à produção de etanol pela levedura, independentemente das condições de pré-tratamento empregadas, exceto para a condição RPTB 3B. Observa-se nesta figura que a levedura consome preferencialmente a glicose em relação à xilose.

O fato da glicose ser uma hexose, fonte de carbono universal, metabolizada por todos os microrganismos, e presente em maior quantidade no hidrolisado justifica o consumo

preferencial desta, conforme já constatado anteriormente em trabalho utilizando esta mesma levedura (SENE et al., 1998). Verifica-se que já nas primeiras 28h o consumo de glicose foi superior a 97% conforme podemos verificar na tabela 5.16, exceto para a condição RPTB 3B. Quanto à xilose, esta foi parcial e lentamente assimilada para todas as condições de pré-tratamento empregadas (figura 5.17), sendo que seu máximo consumo (92,4%) ocorreu para a condição RPTB 3A coincidente ao esgotamento da glicose (tabela 5.16), mostrando a necessidade das células em buscar outra fonte de carbono para sua sobrevivência.

Com relação à produção de etanol verifica-se ainda na figura 5.17 que a máxima concentração de etanol produzida (20,5 g/L) ocorreu após 28h, para o hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana proveniente do pré-tratamento hidrotérmico na condição 195°C/10 min e deslignificado com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1h. Esta condição coincidiu com aquela na qual se obteve maior solubilização das frações hemicelulose e lignina, sendo estes dados apresentados anteriormente na tabela 5.8. Verificou-se também pela figura 5.17 que, exceto para o hidrolisado proveniente da condição RPTB 3B, o etanol foi assimilado pela levedura, conforme já verificado anteriormente (ARRUDA; FELIPE, 2009).

Tabela 5.16 – Consumo de glicose e xilose pela levedura *Candida guilliermondii* nos tempos de 28h e 48h, para hidrolisados celulósicos de bagaço de cana obtidos de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico

Hidrolisados	(%) consumo de glicose nos tempos		(%) consumo de xilose nos tempos		concentração de etanol (g/L) nos tempos	
	28h	48h	28h	48h	28h	48h
RPTB 1A	98,8	98,5	29,9	33,6	15,5	11,7
RPTB 1B	97,7	98,9	37,2	40,9	20,5	15,5
RPTB 2A	98,9	99,1	25,4	77,4	17,6	9,9
RPTB 2B	98,9	99,2	33,3	53,6	18,2	11,9
RPTB 3A	99,1	100	40,1	92,4	13,2	9,3
RPTB 3B	51,4	94,9	17,6	30,5	5,3	14,5
Controle	24,6	33,6	-	-	8,3	6,8

O comportamento da levedura durante o cultivo em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono (figura 5.17) foi diferente do observado com o cultivo nos hidrolisados devido à necessidade de maior tempo de assimilação deste açúcar e à formação de etanol.

Devido ao fato de que estes ensaios são preliminares não foi possível encontrar uma justificativa para este comportamento.

Em relação ao número de células viáveis, verificou-se um aumento da quantidade de células em todos os hidrolisados utilizados, à medida que se aumenta o tempo de fermentação, como pode ser visualizado a seguir pelo gráfico da figura 5.18.

Figura 5.18 – Número de células viáveis/mL durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana proveniente das seguintes condições de pré-tratamento hidrotérmico: RPTB 1A (■), RPTB 1B (●), RPTB 2A (▲), RPTB 2B (▼), RPTB 3A (◄), RPTB 3B (►), Controle (◆).

Observa-se também um aumento considerável no número de células, em 48h de fermentação, para as condições RPTB 2A e RPTB 3A, sendo que estas condições são as que apresentaram menores concentrações de etanol no meio prevalecendo uma preferência das células à produção de biomassa celular do que à produção de etanol (tabelas 5.16 e 5.17).

Tabela 5.17 – Contagem de células por Câmara de Neubauer nos tempos 0, 28 e 48h

Hidrolisados	Contagem de células por Câmara de Neubauer (células/mL)		
	0h	28h	48h
RPTB 1A	$8,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$5,28 \times 10^8$
RPTB 1B	$4,58 \times 10^7$	$2,89 \times 10^8$	$5,08 \times 10^8$
RPTB 2A	$8,08 \times 10^7$	$2,41 \times 10^8$	$8,65 \times 10^8$
RPTB 2B	$7,7 \times 10^7$	$1,85 \times 10^8$	$4,73 \times 10^8$
RPTB 3A	$5,5 \times 10^7$	$2,98 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
RPTB 3B	$6,3 \times 10^7$	$2,38 \times 10^7$	$2,58 \times 10^8$
Controle	$6,13 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$

6 CONCLUSÕES

- Os valores da composição química da palha e do bagaço de cana estão de acordo com os valores apresentados na literatura. Já a caracterização química do pseudocaule de bananeira deve ser melhor aprimorada a fim de evitar a condensação de compostos aromáticos, os quais são detectados como lignina.
- De maneira geral, a análise dos materiais lignocelulósicos por difração de raios X mostrou uma redução da cristalinidade da celulose após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, corroborando com o aumento da conversão enzimática após estas etapas.
- A análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura comprova a grande alteração na estrutura morfológica destas biomassas após a ação do pré-tratamento e da deslignificação alcalina, deixando as fibras celulósicas mais acessíveis à sacarificação enzimática.
- A técnica de espectroscopia no infravermelho comprovou a intensa solubilização da hemicelulose após o pré-tratamento (identificado nos espectros pela redução da banda referente à ligação C=O, característica de ácidos orgânicos presentes na estrutura da hemicelulose) e também a remoção da lignina proporcionada pela deslignificação alcalina (identificado nos espectros pela redução da banda referente ao anel aromático, característico da estrutura da lignina).
- O pré-tratamento ácido diluído, seguido de deslignificação alcalina proporcionou uma solubilização total, para a palha de cana, de 88,8% de hemicelulose e 77,9% de lignina, alcançando uma conversão enzimática de celulose de 85%. Quanto ao pseudocaule, a solubilização total obtida foi de 79,3% para a hemicelulose e de 62,3% para a lignina, alcançando uma conversão enzimática de 61% da fração celulósica.
- O pré-tratamento hidrotérmico na condição 195 °C/10 min, seguido de deslignificação alcalina, proporcionou uma solubilização total de 95,8% de hemicelulose e 80,9% de lignina, resultando em uma conversão enzimática de 89,2%.

- A sacarificação enzimática da fração celulósica da palha e do bagaço de cana, e do pseudocaule de bananeira, aumenta significativamente após as etapas de pré-tratamento e deslignificação.
- A glicose obtida pela sacarificação enzimática da celulose é muito bem assimilada pela levedura *Candida guilliermondii* para a produção de etanol.

REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v 62, p. 6-10, 2005.
- ALLEN, S. G.; KAM, L. C.; ZEMANN, A. J.; ANTAL, M. J. Fractionation of sugar cane with hot compressed liquid water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.35, p.2709-2715, 1996.
- ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL JR.; LASER, M.; LYND, R. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.40, p.2934-2941, 2001.
- ALMEIDA, C. A. **Banana: mercado atual e perspectivas do setor**. - Disponível em: http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/Palestra_banana.pdf 2007. Acesso em 28 de outubro de 2009.
- ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Role of Glycerol Addition on Xylose-to-Xylitol Bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v.58, p.274-278, 2009.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, p.1843-1848, 2004.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e Biorrefinarias**, 2007. Disponível em <http://www.bndes.gov.br>. Acesso em 06 de dezembro de 2008.
- BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖM, M. Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.255-264, 2003.
- BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D.; SADDLER, J. Weak lignin-binding enzymes - a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p.163-170, 2005.
- BERTONCINI, E. I. In: Workshop: ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DEAÇÚCAR. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar, 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em 17 de agosto de 2008.
- BIOETANOL de cana, 2008. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org>. Acesso em 12 de dezembro de 2008.
- Biomass Research and Development Technical Advisory Committee, 2002. **Roadmap for Biomass Technologies in the United States**. Disponível em: <http://www.brdisolutions.com/pdfs/FinalBiomassRoadmap.pdf>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.
- BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Prog. Polymer Science**, v. 19, p.797-841, 1994.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1291-1296, 2002.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v.41, p.423-429, 2006.

CARRASCO, F.; ROY, C. Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. **Wood Science and Technology**, v.26, n.3, p.189-208, 1992.

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

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydrate Polymers**, v.71, p.411-415, 2008.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; LÓPEZ CONTRERAS, A. M.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 741-755, 1999.

CONVERSE, A. O.; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In: **IEA/BIOFOR - WORKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS**, 1994.Ottawa. Canadá.

CORDEIRO, N.; BELGACEM, M. N.; TORRES, I. C.; MOURA, J. C. V. P. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. **Industrial Crops and Products**, v.19, p.147-154, 2004.

CORDEIRO, N.; OLIVEIRA, L.; BELGACEM, M. N.; FARIA, H.; MOURA, J. V. C. P. Surface modification of banana-based lignocellulose fibres. In: MITTAL, K.L. (Ed.), **Contact Angle, Wettability and Adhesion Utrecht, The Netherlands: USP, 2006**. v.4, p.1-19.

CORREDOR, D. Y.; BEAN, S.; WANG, D. Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Sorghum Bran. **Cereal Chemistry**, v.84, p.61-66, 2007.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1261 p.

CURRELI, N.; AGELLI, M.; PISU, B.; RESCIGNO, A.; SANJUST, E.; RINALDI, A. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.37, p.937-941, 2002.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.33, p.1-18, 2007.

DEMIRBAS, A. Products from Lignocellulosic Materials via Degradation Processes. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**. v. 30, p. 27-37, 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.258-266, 2003.

EERE (Office of Energy Efficiency and Renewable Energy and Office of Science), 2006. **Biomass Research and Development Board**. Disponível em: <http://www.eere.energy.gov/>. Acesso em 15 de fevereiro de 2009.

FAIX, O. Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. **Holzforschung**, v.45, p.21-27, 1991.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2007. **Production and Crops**. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em 11 de março de 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

GONÇALVES, A. R. In: Workshop: PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA. Painei IV: Fracionamento do bagaço e palha da cana visando aos novos desafios para obtenção de etanol, 2008. Disponível em <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em 14 de setembro de 2008.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v.57, p.191-202, 1999.

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

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.141-146, 2006.

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

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

HEITZ, M.; CAPEK-MÉNARD, E.; KOEBERLE, P. G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E.; JAULIN, L.; 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.

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

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.358-364, 1999.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v.315, p.804-807, 2007.

HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v.99, p.8940-8948, 2008.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: **HANDBOOK on Bioethanol: Production and Utilization**. Washington: Taylor & Francis, 1996. p.179-188.

ICIDCA - Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. **Manual de derivados**. Habana, Cuba: ICIDCA, 1999.

IMPRESA OFICIAL, 2003. **Decreto nº 47.700, de 11 de março de 2003**. Disponível em <http://www.imprensaoficial.com.br>. Acesso em 25 de janeiro de 2009.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.1-7, 2006.

KABEL, M. A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.98, p.2032-2042, 2007.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.137–145, 2004.

KELLER, F. A. Integrated bioprocess development. In: **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**, Wyman C.E. (Editor). Washington: Taylor & Francis, 1996. Capítulo 17, p. 381-394.

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

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.281–300, 2003.

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.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E.. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1081–1099, 2005.

LIAO, W.; WEN, Z.; HURLEY, S.; LIU, Y.; LIU, C.; CHEN, S. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1017–1030, 2005.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, v.3, 2001.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.42, p.5409–5416, 2003.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.6, p.21-33, 1976.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v.15, p.804–816, 1999.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.426–432, 2007.

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, F.; WEYERS, J. D. B. R.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.62, p.1-20, 1993.

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

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.101-105, 2002.

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, 2005.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; ROCHA, G. J. M.; ROBERTO, I. C. Optimum operating conditions for brewer's spent grain soda pulping. **Carbohydrate Polymers**, v.64, p.22-28, 2006.

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

NARCISO, G. V.; SIMIONATO, K. P.; ARRUDA, P. V.; SENE, L.; FELIPE, M. G. A. Palha de Sorgo: Biomassa Lignocelulósica Potencial para Utilização em Bioprocessos que envolvem o Aproveitamento da Fração Hemicelulósica. In: **SINAFERM – SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 2009, Natal. **Anais**, Rio Grande do Norte: UFRN, 2009.

NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; CABAÑAS, A.; BALLESTEROS, M. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105, p.87-100, 2003.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v.98, p.2503-2510. 2007.

OLIVEIRA, F. M. V. **Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol**. 2007. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2007.

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**, v.321, p.523–536, 1987.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v.107, p.65–72, 2004.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.1069-1079, 2005.

PESQUISA FAPESP, 2008. **Aproveitamento total**. Revista Pesquisa Fapesp edição nº 154. Disponível em: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/arq/r/pt/>. Acesso em 13 de março de 2009.

PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.834-840, 2009.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 142p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

POLOBIO, 2009. **Biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.polobio.esalq.usp.br/biocombustiveis.html>. Acesso em 01 de fevereiro de 2009.

PORTAL ECODEBATE, 2008. **Queima de combustíveis fósseis no mundo cresce e eleva risco de aquecimento**. Disponível em <http://www.ecodebate.com.br/2008/04/11/>. Acesso em 29 de novembro de 2008.

PUPPAN, D. Environmental evaluation of biofuels. **Periodica Polytechnica Ser Soc Man Sci** v.10, p.95-116, 2002.

RAMOS, L. P.; NAZHAD, M. M.; SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.821-831, 1993.

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

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.22-27, 2005.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T.; CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1997, Curitiba. **Anais**, Curitiba: UFPR, 1997, v.5.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.54-63, 2008.

SADDLER, J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. **Biotechnology in Agriculture Series**, v.9, p.73-91, 1993.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and Enzymatic Saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.76, p.65-77, 1999.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.40, p.3693-3700, 2005.

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

SCARPARE FILHO, J. A.; MINAMI, K.; KLUGE, R. A.; TESSARIOLI NETO, J. Estudo do primeiro ciclo produtivo da bananeira “ nanicão” (*Musa* sp.) desenvolvida a partir de diferentes tipos de muda. **Scientia Agricola**, v.55, p.86-93, 1998.

SCHACHT, C.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. From plant material to ethanol by means of supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v.46, p.299-321, 2008.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, n.2, v.24, p.247-251, 2001.

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. 2008. 298p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

- SENE, L.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. **Journal of Basic Microbiology**, v.38, p.61-69, 1998.
- SHEN, X. L.; XIA, L. M. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v.39, p.1363-1367, 2004.
- SHEVCHENKO, S. M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.867-876, 1999.
- SILVA, A. G. **Utilização do pseudocaule de bananeira para produção de celulose e papel**. 1998. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.661-671, 2009.
- SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v.98, p.3000-3011, 2007.
- SOFFNER, M. L. A. P. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira**. 2001. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”/USP, Piracicaba, 2001.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1 – 11, 2002.
- TABKA, M. G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.897-902, 2006.
- TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v.36, p. 4406-4409, 2008.
- THYGESSEN, A.; ODDERSHEDE, J.; LILHOLT, H.; THOMSEN, A. B.; STAHL, K. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. **Cellulose**, v.12, p.563-576, 2005.
- ÚNICA, 2008. **Moagem de cana 2008/09 supera safra anterior já na primeira quinzena de novembro**. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em 12 de dezembro de 2008.
- YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. **Energy & Fuels**, v.22, p.46-60, 2008.
- WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**. v.160, p.3-11, 1988.
- WOOLEY, R.; RUTH, M.; GLASSNER, D.; SHEEJAN, J. Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. **Biotechnology Progress** v.15, p.794-803, 1999.
- WOOLEY, R.; RUTH, M.; SHEEHAN, J.; IBSEN, K.; MAJDESKI, H.; GALVEZ, A. **Lignocellulosic biomass to ethanol—Process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis—Current and futuristic scenarios**. Golden Colorado, USA. National Renewable Energy Laboratory, 1999. 130pp. Report No. TP-580-26157.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p.3-16, 1994.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.24, p.189-226, 1999.

WYMAN, C. E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnology Progress** v.19, p.254–262, 2003.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1959 – 1966, 2005.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, J. R.; ELANDER, R.; LASER, M; HIMMEL, M; MCMILLAN, J. D; LYND, L. R. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering** v.97, p.214–223, 2007.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.367–375, 2008.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p.950-956, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Fotomicrografias do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente nas condições: 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min e deslignificado com NaOH 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h, após cada condição de pré-tratamento.

Figura A1. Fotomicrografias do bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente a 180 °C/10 min (A) e deslignificado após este pré-tratamento (B); pré-tratado a 185 °C/10 min (C) e deslignificado após este pré-tratamento (D); pré-tratado a 190 °C/10 min (E) e deslignificado após este pré-tratamento (F).

APÊNDICE B – Espectros de infravermelho do bagaço de cana “in natura”, pré-tratado hidrotêrmicamente nas condições: 180 °C/10 min, 185 °C/10 min, 190 °C/10 min e deslignificado com NaOH 1,0% (m/v) a 100 °C por 1h, após cada condição de pré-tratamento.

Figura B1. Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).

Figura B2. Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).

Figura B3. Espectros na região do Infravermelho com Transformada de Fourier do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” (—) e após as etapas de pré-tratamento (—) e deslignificação (—).