# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

NAILA RIBEIRO MORI

Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-deaçúcar: pré-tratamentos e conversão biotecnológica não convencionais

> Lorena - SP 2015

## NAILA RIBEIRO MORI

## Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-deaçúcar: pré-tratamentos e conversão biotecnológica não convencionais

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

Orientador: Dr. Adilson Roberto Gonçalves

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP Dezembro, 2015 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

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

Mori, Naila Ribeiro Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar: pré-tratamentos e conversão biotecnológica não convencionais / Naila Ribeiro Mori; orientador Adilson Roberto Gonçalves - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015. 198 p.

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

1. Pré-tratamento hidrotérmico. 2. Ultrassom. 3. Explosão a vapor. 4. Bagaço. 5. Palha. I. Título. II. Gonçalves, Adilson Roberto, orient.

Dedico essa tese aos meus pais Romilde e Oswaldo, ao meu irmão Rodrigo e à minha avó D. Alice (in memorian) por todo incentivo e amor.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que sempre me deu forças, discernimento e coragem para enfrentar os desafios e provações ao longo desta minha trajetória.

Aos meus pais, Romilde e Oswaldo e ao meu irmão Rodrigo (futuro médico da família) por todo o incentivo, pelas broncas, brigas, risadas e conselhos que foram de fundamental importância para que esta caminhada fosse mais leve. Agradeço também à minha avó (e que foi minha segunda mãe), D. Alice. Vó, mesmo ausente fisicamente, sempre senti a senhora ao meu lado, guiando e protegendo meus passos. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Dr. Adilson Roberto Gonçalves, principalmente pela oportunidade me dada há nove anos na iniciação científica, confiando que aquela menina tímida e de poucas palavras fosse capaz de desenvolver, continuar e concluir os desafios propostos. Muito obrigada pela confiança, pelas conversas, conselhos e por toda a ajuda!

Ao pessoal da UFPE, do Departamento de Engenharia Química, por permitir a utilização do reator REG MED e dos laboratórios.

À Dr<sup>a</sup>. Renata Bura pela supervisão e pelos ensinamentos, além de permitir o estágio e a utilização de seus laboratórios em Seattle, na Universidade de Washington. Agradeço também aos companheiros do BBL Group, em especial, aos queridos Chang Dou, Dr<sup>a</sup>. Shannon Ewanick e Mandana Ehsanipour pelo apoio e amizade.

Aos técnicos Jussara Silva, Zé Moreira, Bento e Cibele Rosa pelas análises, auxílios e amizade. E em especial ao José Carlos, o temido Zé Cobrinha, por todo o auxílio na execução dos experimentos e, principalmente, pela amizade, pelas caronas e marmitas.

Ao Dr. George Jackson pelos ensinamentos valiosos, confiança e amizade.

Aos meus companheiros de laboratório/grupo, Luís Ricardo e Regininha (meus "pais" científicos que muito me ensinaram), e todos aqueles que passaram pelo GCBM e pelo DEBIQ durante esses meus nove anos de grupo. Obrigada pelo divertido convívio! Em especial, agradeço a amizade dos companheiros GCBM, Rafael Cândido, Patrícia Miléo e Priscila Maziero. A ajuda, a amizade e o carinho de vocês foram fundamentais.

A todos os alunos de IC e pré-IC que pude "orientar" e ajudar de alguma forma. Com vocês, eu não só ensinei como aprendi muito. Agradeço, especialmente, minhas "amigas-irmãs" e ex-alunas, Karen Chagas, Susane Castro e Juliana Souza. Amo vocês!

Em especial, agradeço a Dr<sup>a</sup>. Maria da Rosa Capri pelas oportunidades, pelos auxílios, pelas conversas e pela amizade e carinho incondicionais! Agradeço à sua aluna e minha amiga, Meriene Gandara, pela ajuda nas análises do MEV. MUITO OBRIGADA!!!

À FAPESP pela bolsa de Doutorado e bolsa BEPE concedidos e apoio financeiro.

"Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."

Marthin Luther King

#### **RESUMO**

MORI, N. R. Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar: prétratamentos e conversão biotecnológica não convencionais. 2015. 198p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Devido às crises ocorridas no setor petroleiro, além do interesse em reduzir a emissão de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), vários países buscam o desenvolvimento de novos combustíveis. Atualmente, mais de 80% da frota de veículos no Brasil rodam ou somente com etanol ou com uma mistura de etanol e gasolina. Desta forma, o bioetanol é considerado um combustível renovável alternativo com grande potencial para substituir os combustíveis oriundos do petróleo. Para atender a crescente demanda de etanol, sem competir com áreas cultiváveis voltadas para produção de alimentos, fontes de materiais lignocelulósicos podem ser utilizadas com o intuito de se aproveitar a fração celulósica para obtenção de açúcar fermentável para produção de bioetanol. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito de tecnologias de pré-tratamento (convencionais e não convencionais) dos subprodutos sucroalcooleiros (bagaço e palha de cana), seguida ou não de uma etapa de deslignificação, sobre a conversão enzimática da celulose de cada biomassa vegetal, além de testar e avaliar o efeito que a mistura das duas biomassas (antes do pré-tratamento), em diferentes proporções, pode causar na produção de etanol 2G. Em uma primeira parte do trabalho, a palha de cana foi submetida ao pré-tratamento hidrotérmico e ao pré-tratamento por ultrassom, seguido de uma etapa de deslignificação alcalina. Para o pré-tratamento hidrotérmico, foram testadas três temperaturas (160, 170 e 180°C) nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min para cada temperatura. Para o teste com ultrassom, os experimentos foram conduzidos em três meios diferentes (ácido, alcalino e meio aquoso - controle) nos tempos de 1 a 30 minutos para cada condição. As amostras pré-tratadas por ultrassom e pelo método hidrotérmico foram deslignificadas com solução de NaOH 1%(m/v) por 1 hora. Após pré-tratamento e deslignificação, os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados empregando Celluclast 1.5L (15 FPU/g de amostra) e ß-Glucosidase (12,5 UI/g de amostra). A condição de pré-tratamento hidrotérmico mais promissora para a palha foram a 170°C por 10 min, mostrando que a palha não necessita de tratamentos mais severos para obter uma maior digestibilidade no processo de hidrolise enzimática. Já o método por ultrassom provocou o aumento da recalcitrância do material lignocelulósico tanto para o agente deslignificante como para as celulases. Em uma segunda parte do trabalho, palha e bagaco de cana foram pré-tratados por explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub> nas seguintes condições para cada biomassa: 190, 195 e 200°C, por 5 min e 3% de SO<sub>2</sub> (m/m). Após encontrar a condição ideal para ambas biomassas (190°C, 5 min, 3% SO<sub>2</sub>), três proporções diferentes de misturas de palha e bagaço foram testadas: 90% de palha / 10% de bagaço, 90% bagaço / 10% de palha e 50% de palha / 50% de bagaço e estas misturas foram prétratadas na condição otimizada. Em todas as etapas, a hidrólise enzimática foi realizada. Observou-se que a recuperação mais elevada de açúcar foi encontrada na amostra 50% bagaço/50% palha. Curiosamente, quando comparado com uma biomassa tratada isoladamente, todas as três misturas apresentam uma maior recuperação de açúcar.

**Palavras-chave**: Pré-tratamento hidrotérmico. Ultrassom. Explosão a vapor. Bagaço. Palha. Misturas de biomassa.

### ABSTRACT

MORI, N. R. Cellulosic ethanol from sugarcane straw and bagasse: non-conventional pretreatments and biotechnological conversion. 2015. 198p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Due to the crises in the oil sector, in addition to interest in reducing the emission of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), many countries seek to develop new fuels. Currently, over 80% of the vehicle fleet in Brazil only run on ethanol or a mixture of ethanol and gasoline. Thus, bioethanol is considered an alternative renewable fuel with great potential to replace petroleum derived fuels. To meet the growing ethanol demand, without competing with cultivable areas focused on food production, lignocellulosic materials sources can be used in order to take advantage of the cellulosic fraction to obtain fermentable sugar for bioethanol production. In this study, the objective was to evaluate the effect of pretreatment technologies (conventional and unconventional) of sugar and alcohol byproducts (bagasse and straw) followed or not by a delignification step on the enzymatic conversion of each biomass, besides test and evaluate the effect that mixing of the two biomasses (before pretreatment), in different proportions, can cause in the production of 2G ethanol. In the first part of the study, sugarcane straw was submitted to the hydrothermal pre-treatment and pre-treatment by ultrasound, followed by an alkaline delignification step. For the hydrothermal pretreatment, three temperatures were tested (160, 170 and 180°C) in the times of 10, 20, 30, 40 and 50 min for each temperature. For the test with ultrasound, the experiments were conducted in three different environments (acid, alkaline and aqueous medium - control) in the times of 1-30 minutes for each condition. The pretreated by ultrasound and by hydrothermal method samples were delignified with NaOH solution 1% (w/v) for 1 hour. After pre-treatment and delignification, the enzymatic hydrolysis assays were performed using Celluclast 1.5L (15 FPU/g of substrate) and  $\beta$ -glucosidase (12.5 IU/g of substrate). The hydrothermal pretreatment condition most promising for the straw was at 170°C for 10 min, showing that the straw doesn't require more severe treatments to obtain a higher digestibility of the enzymatic hydrolysis process. Yet the ultrasound method led to increased recalcitrance of lignocellulosic material for both the delignificant agent as for cellulases. In a second part of the study, straw, and bagasse were pre-treated by steam explosion catalyzed by SO<sub>2</sub> under the following conditions for each biomass: 190, 195 and 200°C for 5 min and 3% of  $SO_2$  (m/m). After finding the optimal condition for both biomasses (190°C, 5 min, 3%) SO<sub>2</sub>), three different ratios of mixtures of straw and bagasse were tested: 90% straw / 10% bagasse, 90% bagasse / 10% straw and straw 50% / 50% bagasse and these mixtures were pretreated in the optimized condition. At all stages, the enzymatic hydrolysis was carried out. It was observed that the higher sugar recovery was found in the sample 50% bagasse / 50% straw. Interestingly, when compared with a treated biomass separately, all three blends exhibit a greater sugar recovery.

**Keywords:** Hydrothermal pretreatment. Ultrasound. Steam explosion. Bagasse. Straw. Mixture of biomass.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produtividade agrícola por idade de corte em toneladas/há
Figura 2: Estrutura morfológica da parede celular vegetal
Figura 3: Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica35
Figura 4: Representação da estrutura linear da celulose
Figura 5: Representação da estrutura de um arabinometilglucuronoxilana
Figura 6: Esquema estrutural dos precursores da lignina
Figura 7: Representação de uma macromolécula de lignina do tipo G (coníferas)40
Figura 8: Fluxograma representativo das etapas para produção de etanol de segunda
geração utilizando bagaço e palha como matéria-prima41
Figura 9: Modelo esquemático de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar44
Figura 10: Esquema do efeito do pré-tramento em materiais lignocelulósicos45
Figura 11: Esquema da reação mostrando a competição entre a despolimerização das
ligações $\beta$ -O-4 da lignina e a repolimerização envolvendo uma estrutura de lignina com um
carbono aromático reativo
Figura 12: Formação de 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico e fórmico e
produtos de condensação provenientes da degradação de hexoses. As pentoses são
degradas a furfural o qual pode sofrer condensação especialmente com os fragmentos de
lignina solubilizados
Figura 13: Representação esquemática da celulase65
Figura 14: Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação das celulases:
endoglucanases (endos), exoglucanases de terminais redutores (exosR), exoglucanases de
terminais não redutores (exosNR) e β-glucosidases67
Figura 15: Representação esquemática de alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática
da celulose. (1) Inibição das enzimas exoglucanases e $\beta$ -glucosidases por seus produtos
(celobiose e glicose, respectivamente); (2) Impedimento estérico das celulases à celulose
pela presença de hemicelulose; (3) Impedimento estérico das celulases à celulose pela
presença de lignina; (4) Adsorção não produtiva da enzima à lignina; (5) desativação das
enzimas por desnaturação térmica e/ou por cisalhamento por agitação excessiva70
Figura 16: Fluxograma operacional dos processos de pré-tratamento realizado para a palha
de cana
Figura 17: Fluxograma operacional do processo de pré-tratamento realizado para a palha e
bagaço de cana73

Figura 18: Reator REG MED modelo AU/E 20
Figura 19: Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação
de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar
Figura 20: Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação
de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar
Figura 21: Banho de ultrassom modelo USC 2800 da UNIQUE utilizado para o pré-
tratamento79
Figura 22: Reator de explosão a vapor
Figura 23: Palha de cana in natura e amostras pré-tratadas hidrotermicamente98
Figura 24: Correlação entre rendimento e fator de severidade (Log de (Ro))100
Figura 25: Correlação entre fração hemicelulósica solubilizada e o fator de severidade do
pré-tratamento hidrotérmico104
Figura 26: Correlação entre fração celulósica solubilizada e o fator de severidade do pré-
tratamento hidrotérmico105
Figura 27: Correlação entre fração de lignina solubilizada e o fator de severidade do pré-
tratamento hidrotérmico105
Figura 28: Razão de lignina solúvel/insolúvel em função da severidade do pré-tratamento.
Figura 29: Difratograma da palha pré-tratada hidrotermicamente em todas as condições.
Figura 30: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 160°C nos
tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min (aumento de 200x)110
Figura 31: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 170°C nos
tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x)111
Figura 32: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 180°C nos
tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x)112
Figura 33: Difratograma das polpas pré-tratadas hidrotermicamente117
Figura 34: Microscopias das polpas de palha in natura e pré-tratadas hidrotermicamente a
160°C nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min (aumento de 200x)120
Figura 35: Microscopias das polpas palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a
170°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x)
Figura 36: Microscopias das polpas palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a
180°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x)

Figura 37: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na conversão enzimática.
Figura 38: Fotos da palha de cana in natura e pré-tratada por ultrassom134
Figura 39: Difratograma das amostras pré-tratadas por ultrassom e da palha in natura139
Figura 40: Microscopias das palhas in natura e pré-tratadas em meio alcalino e ácido
(aumento de 200x)
Figura 41: Microscopias das palhas in natura e pré-tratadas em meio controle (aumento de
200x)
Figura 42: Difratograma das polpas pré-tratadas por ultrassom148
Figura 43: Micrografias de polpa de palha in natura e pré-tratada por ultrassom (aumento
de 200x)
Figura 44: Micrografias de polpa de palha in natura e pré-tratada por ultrassom (aumento
de 200x)152
Figura 45: Amostras pré-tratadas de palha e bagaço de cana: (A) bagaço tratado a 190 °C;
(B) bagaço tratado a 195 °C; (C) bagaço tratado a 200 °C; (D) palha tratada a 190 °C; (E)
palha tratada a 195 °C; (F) palha tratada a 200 °C156
Figura 46: Correlação entre rendimento e fator de severidade para cada reação e para cada
biomassa161
Figura 47: Relação entre severidade e solubilização dos componentes do bagaço pré-
tratado
Figura 48: Relação entre severidade e solubilização dos componentes da palha pré-tratada.
Figura 49: Perfil da conversão enzimática das amostras pré-tratadas por explosão a vapor.
Figura 50: Recuperação total de açúcares antes e após a etapa de conversão enzimática. 164
Figura 51: Amostras pré-tratadas por explosão a vapor: (A) 100% palha; (B) 100% bagaço;
(C) mistura 90% palha / 10% bagaço; (D) mistura 90% bagaço / 10% palha; (E) mistura
50% palha / 50% bagaço166
Figura 52: Conversão enzimática para a palha, bagaço e todas as misturas após pré-
tratamento
Figura 53: Recuperação total de açúcar antes e após a etapa de conversão enzimática172
Figura 54: Microscopias da palha e do bagaço pre-tradado (aumento de 200x)173
Figura 55: Microscopias das misturas de biomassas pré-tratadas (aumento de 200x) 174

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de biomassas com potencial para produção de etanol de
segunda geração
Tabela 2: Comparação entre as hidrólises com ácido diluído e enzimática. 62
Tabela 3: Condições de pré-tratamento hidrotérmico de palha de cana-de-açúcar. 75
Tabela 4: Condições adotadas para a realização do pré-tratamento por ultrassom
Tabela 5: Composição dos hidrolisados hemicelulósicos. A quantidade e cada componente
está expressa em g.L <sup>-1</sup> ( $\pm 0,01$ )94
Tabela 6: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares
solubilizados nos hidrolisados96
Tabela 7: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares
solubilizados nos hidrolisados97
Tabela 8: Composição química do material pré-tratado hidrotermicamente e da palha in
natura e valores dos rendimentos de cada reação
Tabela 9: Perda/Solubilização de cada componente para cada reação. 101
Tabela 10: Seletividade entre hemicelulose/celulose e lignina/hemicelulose. 102
Tabela 11: Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do
parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose
Tabela 12: Composição química das palhas pré-tratadas hidrotermicamente após a
deslignificação
Tabela 13: Solubilização dos componentes da palha de cana pré-tratada após
deslignificação (%)
Tabela 14: Diminuição da cristalinidade de polpa de palha de cana pré-tratada
hidrotermicamente
Tabela 15: Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente
e das respectivas amostras pré-tratadas deslignificadas obtidas125
Tabela 16: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom em meio
ALCALINO. A quantidade de cada componente está expressa em g/L (± 0,01)128
Tabela 17: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom em meio
ÁCIDO. A quantidade de cada componente está expressa em g/L (± 0,01)128
Tabela 18: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom
(CONTROLE). A quantidade de cada componente está expressa em g/L (± 0,01) 128

Tabela 19: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO ALCALINO). A quantidade de cada componente está expressa em g/L ( $\pm$  0,01). Tabela 20: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO ÁCIDO). A quantidade de cada componente está expressa em g/L (± 0,01)......130 Tabela 21: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO CONTROLE). A quantidade de cada componente está expressa em g/L ( $\pm 0.01$ ). Tabela 22: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos acúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio Tabela 23: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio Tabela 24: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ÁCIDO. Tabela 25: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ÁCIDO. Tabela 26: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio Tabela 27: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio Tabela 28: Composição química da palha in natura e da palha pré-tratada por ultrassom em Tabela 29: Solubilização dos componentes após tratamento por ultrassom......137 Tabela 30: Diminuição da cristalinidade das palhas pré-tratadas por ultrassom. ......140 Tabela 31: Composição Química da palha in natura e das palhas pré-tratadas por ultrassom submetidas à deslignificação......145 Tabela 32: Solubilização por componente após pré-tratamento e etapa de deslignificação. 

Tabela 33: Diminuição da cristalinidade das polpas obtidas149
Tabela 34: Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas por ultrassom e das
respectivas polpas obtidas153
Tabela 35: Composição química do licor hemicelulósico obtido após pré-tratamento da
palha e do bagaço157
Tabela 36: Concentração de furfural, HMF, ácido acético, lignina solúvel e fenólicos
contidos no hidrolisado hemicelulósico157
Tabela 37: Composição química da palha e bagaço in natura e do material pré-tratado por
E.V
Tabela 38: Determinação do rendimento e fator de severidade para cada condição 160
Tabela 39: Solubilização/perda por componente após pré-tratamento por explosão a vapor
catalisado por SO <sub>2</sub> 161
Tabela 40: Composição química do licor hemicelulósico obtido após pré-tratamento da
palha, do bagaço e misturas167
Tabela 41: Concentração de furfural, HMF, ácido acético, lignina solúvel e fenólicos
contidos no hidrolisado hemicelulósico167
Tabela 42: Composição química das biomassas sem pré-tratamento169
Tabela 43: Composição química das biomassas após pré-tratamento169
Tabela 44: Solubilização por componentes e rendimentos de cada reação. 170

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Energia e Sustentabilidade	
2.2 Palha e bagaço de cana: resíduos da indústria sucroalcooleira	
2.3 Características estruturais dos materiais lignocelulósicos	
2.3.1 Celulose	
2.3.2 Hemicelulose	
2.3.3 Lignina	
2.3.4 Outros Compostos	40
2.4 Produção de Etanol de 2ª Geração (2G)	40
2.5 Pré-tratamento de matérias lignocelulósicos: etapa crucial no processo de proc	lução de
bioetanol	44
2.5.1 Explosão a vapor	48
2.5.1.1 Explosão a vapor catalisado por SO <sub>2</sub>	51
2.5.1.2 Severidade	53
2.5.2 Hidrotérmico	55
2.5.3 Ultrassom	57
2.6 Etapa de deslignificação	59
2.7 Hidrólise de materiais lignocelulósicos	60
2.7.1 Hidrólise Ácida	62
2.7.2 Hidrólise Enzimática	64
2.7.3 Sinergismo: mecanismo de atuação das enzimas celulolíticas	66
3. OBJETIVOS	71
3.1 Gerais	71
3.2 Específicos	71
4. MATERIAIS E MÉTODOS	72
4.1 Pré-tratamento hidrotérmico	74
4.2 Pré-tratamento por ultrassom	78
4.3 Pré-tratamento por Explosão a vapor catalisado por SO2	79
4.4 Deslignificação Alcalina	81
4.5 Rendimento de reação e perdas de componentes macromoleculares	81
4.6 Hidrólise Enzimática	

4.7 Análises químicas
4.7.1 Composição química dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por via hidrotérmica
e por ultrassom e das respectivas polpas84
4.7.2 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE85
4.7.3 Determinação de lignina insolúvel em ácido86
4.7.4 Determinação do teor de cinzas presentes na lignina insolúvel
4.7.5 Determinação de lignina solúvel86
4.7.6 Determinação de furfural de hidrometilfurfural87
4.7.7 Composição química dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por explosão a
vapor catalisada por SO <sub>2</sub> 87
4.7.7.1 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural88
4.7.7.2 Determinação de cinzas
4.7.7.3 Determinação de fenólicos totais
4.8 Caracterização física dos materiais lignocelulósicos
4.8.1 Difração de Raios-X90
4.8.1.1 Interpretação dos resultados de Difração de Raios - X90
4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV92
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar
5.1.1 Análise dos hidrolisados hemicelulósicos
5.1.2 Composição química da palha submetida ao pré-tratamento hidrotérmico98
5.1.3 Análises Físicas
5.1.3.1 Difração de Raios-X da palha após pré-tratamento hidrotérmico106
5.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas hidrotermicamente
5.1.4 Deslignificação Alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente
5.1.4.1 Caracterização química das amostras deslignificadas113
5.1.5Análises físicas
5.1.5.1 Difração de Raios-X das palhas pré-tratadas deslignificadas
5.1.5.2 Microscopia eletrônica de varredura das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e
deslignificadas119
5.1.6 Digestibilidade enzimática da palha pré-tratada e após deslignificação123
5.2 Pré-tratamento por ultrassom
5.2.1 Análise do hidrolisado hemicelulósico127

5.2.2 Composição química das amostras pré-tratadas por ultrassom134
5.2.2 Análises Físicas
5.2.2.1 Difração de Raios X das amostras pré-tratadas
5.2.2.2 Microscopia eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas por ultrassom 141
5.2.3 Deslignificação Alcalina143
5.2.3.1 Composição química das palhas pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas 143
5.2.4 Análises físicas
5.2.4.1 Difração de Raios – X das palhas pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas148
5.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas por ultrassom o
deslignificadas150
5.2.5 Digestibilidade Enzimática das amostras pré-tratadas por ultrassom e deslignificada
5.3 Pré-tratamento por explosão a vapor catalisada por SO <sub>2</sub> 155
5.3.1 Otimização das condições de pré-tratamento para palha e bagaço de cana155
5.3.1.1 Composição química do licor hemicelulósico e da celulignina155
5.3.1.2 Conversão enzimática e recuperação total de açúcares
5.3 Misturas de bagaço e palha de cana-de-açúcar165
5.3.1 Composição química do licor hemicelulósico e do substrato sólido após pré
tratamento
5.3.2 Conversão Enzimática e Recuperação total de açúcares para as misturas de biomassa
5.3.3 Análise Física
6. CONCLUSÃO
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS
REFERÊNCIAS

### 1. INTRODUÇÃO

A demanda global por energia continua a aumentar e, por isso, espera-se que as emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) atinjam novos recordes, chegando a, aproximadamente, 31 Gt em 2035 (IPCC, 2013). A necessidade de adaptação às alterações climáticas e as crescentes preocupações com relação à segurança energética são os principais impulsionadores de muitos países pertencentes à Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) que incentivam o crescimento da energia renovável (HO et al., 2014). Nesse cenário atual, a energia renovável contribui com cerca de 13% do consumo da energia global, sendo que, aproximadamente, 10% corresponde à bioenergia (HO et al., 2014).

O termo bioenergia refere-se à energia contida em sólidos, líquidos ou produtos gasosos derivados de matéria-prima biológica (biomassa) (IEA, 2010). Nesta categoria estão incluídos os biocombustíveis para transporte, produtos que geram eletricidade e calor (como por exemplo, cavacos ou pellets de madeira), bem como o biogás produzido por meio de processamento biológico dos resíduos industriais (IEA, 2013).

Biocombustíveis para transporte representam a maior fração da produção mundial de bioenergia. O bioetanol é considerado um combustível renovável alternativo com amplo potencial para substituir combustíveis derivados de petróleo e com virtuosa capacidade para redução significativa de emissão dos gases do efeito estufa (LEE; LAVOIE, 2013).

As tecnologias de primeira geração produzem etanol a partir de culturas de alimentos com alto teor de açúcar (cana) ou amido (milho). O bioetanol (ou etanol de Segunda Geração) é produzido a partir de biomassa não alimentar, incluindo os resíduos de colheita de produção florestal (arbustos, folhas secas, cavacos de madeira, etc) ou resíduos agroindustriais (palha de arroz, casca de café, palha de trigo, sorgo, bagaço de cana, etc) (GUPTA et al., 2014; SIMS et al., 2010). Estes últimos são os mais cotados para desenvolver o papel principal dentro das biorrefinarias (STAR-COLIBRI, 2011).

Estima-se que somente os EUA têm potencial para produzir mais de 1,3 bilhões de toneladas (base seca) de biomassa por ano (REDDY; YANG, 2005). Segundo Zhang (2008), um bilhão de toneladas de biomassa seca produz entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico. No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas, fornecendo uma enorme quantidade de subprodutos, sendo os principais o bagaço e a

palha. Estima-se que durante o processamento da cana são gerados, anualmente, aproximadamente 160 milhões de toneladas de bagaço e palha, o que os tornam interessantes, considerando o baixo custo de matéria-prima e o desenvolvimento sustentável (MAZIERO, 2013).

É sabido que grande parte do bagaço gerado é aproveitado como fonte de energia dentro das próprias usinas que, atualmente, já se tornaram autossuficientes em geração de vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço. Ainda assim, sabe-se que nem todo bagaço nessas usinas é queimado e, também, existem usinas que não contém cogeração de energia. Estas são minorias, porém um grande volume de bagaço pode ser acumulado nos pátios das usinas, gerando problemas como a disposição do material e o risco de incêndio.

Já a palha de cana apresenta grande potencial para geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico. No estado de São Paulo, maior produtor do país, mais da metade da área plantada de cana-de-açúcar é colhida mecanicamente (AGRO, 2011). E, em médio prazo, praticamente 100 % dos canaviais terá a colheita mecanizada, pois em São Paulo a legislação ambiental criou leis, definindo cronograma para que a queima da colheita seja abolida definitivamente. Desta forma, a disponibilidade de palha e bagaço nas usinas de açúcar e álcool tem impulsionado vários grupos de pesquisa a desenvolver tecnologias que visem ao seu aproveitamento mais racional.

A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial por combustíveis. As técnicas de pré-tratamento da biomassa têm como objetivo desestruturar a parede celular liberando os polissacarídeos com fonte de açúcares fermentescíveis de forma eficiente e economicamente viável. Os açúcares presentes na palha e no bagaço de cana-de-açúcar encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) e são recobertos por uma macromolécula (lignina), formando a microfibrila celulósica.

Devido à sua interação intermolecular e completa ausência de água na estrutura da microfibrila, a celulose apresenta estrutura bastante recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (FENGEL; WEGENER, 1989).

Sendo assim, a etapa de pré-tratamento ainda é considerada a etapa crucial para desencadear a produção de etanol a partir de biomassa. É a etapa determinante para viabilizar a tecnologia de obtenção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, isto

porque esta etapa define o rendimento e o custo o qual os carboidratos de celulose e hemicelulose podem ser convertidos a etanol (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008).

Sabe-se que a viabilização de obtenção de etanol a partir de biomassa está diretamente relacionada em obter as condições otimizadas de processamento, principalmente da etapa de desestruturação da fibra. Muitos estudos de variações de parâmetros de processo vêm sendo realizados, porém estudos relacionados a influência das reações e condições adotadas para modificação da biomassa ainda é pouco explorada. Neste trabalho foram estudados três tipos de pré-tratamentos (hidrotérmico, explosão a vapor catalisado com  $SO_2$  e ultrassom), com o intuito de compreender como cada pré-tratamento e cada parâmetro avaliado interage com a biomassa, uma vez que a compreensão destas interações pode favorecer a escolha dos parâmetros ideais ou mais adequados para o processamento.

Além disso, sabe-se que mesmo com tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas (ZHENG et al., 2009; SUN; CHENG, 2002; ZHAO et al., 2008). O rendimento líquido da conversão da celulose em glicose livre e, a seguir, em etanol ainda pode ser desfavorável. Tornar os rendimentos mais favoráveis possibilitará o melhor aproveitamento dessa rica matériaprima natural encontrada na palha e no bagaço de cana-de-açúcar, atualmente desperdiçada ou utilizada de forma menos nobre. Muitas vezes, mesmo otimizando os processos de prétratamentos, o rendimento final ainda pode não ser satisfatório.

Assim, com o intuito de investigar maneiras de melhorar a recuperação de açúcares no processo de obtenção de etanol, além de avaliar a otimização do processo de um dos pré-tratamentos avaliados neste trabalho (explosão a vapor catalisado por dióxido de enxofre) para cada biomassa (palha e bagaço de cana) este trabalho avaliou a possibilidade de misturar essas biomassas, em diferentes proporções, antes da etapa de pré-tratamento, uma vez que são duas matérias-primas de composições química diferentes, e que podem atuar de forma sinérgica, segundo estudos preliminares, melhorando assim o rendimento final em açúcares fermentáveis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Energia e Sustentabilidade

Com a globalização da crescente demanda por energia, a escassez de energia é um problema comum em todo mundo. Prevê-se que o crescimento da produção de petróleo e gás, hoje facilmente acessíveis, não irá coincidir com a taxa de demanda projetada para o período compreendido entre 2040 e 2050, uma vez que o nível de demanda por petróleo aumentará de 85 Mb.dia<sup>-1</sup> em 2008 para 105 Mb.dia<sup>-1</sup> em 2030 e, concomitantemente, o número de veículos aumentará para 1,3 milhões em 2030 e para 2 bilhões em 2050 (BRADSHAW, 2010; BALAT, 2011).

Além disso, a queima destes combustíveis é responsável por 82% das emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um dos principais gases relacionados com o efeito estufa (WILDERER, 2009). Segundo dados da International Energy Agency (IEA – Key Statistics, 2009), em 14 anos houve um aumento de aproximadamente 54% nas emissões de gases estufas relacionados com o uso de combustíveis fósseis, o que torna o uso destes combustíveis cada vez mais insustentável. Além dos impactos negativos relacionados com a segurança energética.

A segurança energética é comumente definida como fornecimento confiável e adequado de energia a preços razoáveis. Este fornecimento confiável e adequado está relacionado com um fornecimento ininterrupto que satisfaça plenamente as necessidades da economia global. Uma vez que estes saldos tendem ao negativo em questão de anos, devido à iminente escassez das reservas de petróleo, à instabilidade dos preços, juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental, há um grande interesse em explorar e estudar outras fontes alternativas de energia (RABELO et al., 2011).

Entre as diversas fontes de energias renováveis, a biomassa é vista como a mais interessante por várias razões. A principal delas é que a bioenergia pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região que a utiliza, além de os recursos estarem frequentemente disponíveis no próprio local e o investimento de capital para a conversão em energia ser baixo (PANDEY et al., 2011). Além do mais, a energia proveniente de biomassa pode desempenhar uma função importante na redução das emissões de gases do efeito estufa, já que a biomassa é formada a partir de  $CO_2$  e  $H_2O$ , aproveitando a energia solar. Assim, o Brasil e muitos outros países reduziriam ainda mais as emissões de dióxido de carbono, resultando em muitas vantagens em relação ao Protocolo de Kyoto.

Biocombustíveis para transporte representam a maior fração da produção mundial de bioenergia. O bioetanol é considerado um combustível renovável alternativo com amplo potencial para substituir combustíveis derivados de petróleo e com virtuosa capacidade para redução significativa de emissão dos gases do efeito estufa (LEE; LAVOIE, 2013). O etanol obtido do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração) é, até o momento, o único combustível com capacidade de atender à crescente demanda mundial por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente. Deve-se considerar que as emissões gasosas com a queima do etanol são da ordem de 60% menores se comparadas às emissões da queima da gasolina, sendo ainda que o do  $CO_2$  emitido é reabsorvido pela própria cana (CHU, 2012).

Atualmente, o etanol é produzido praticamente a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas, cana-de-açúcar e milho, respectivamente (MENDU et al., 2012). Porém, há um grande esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento dos componentes dos materiais lignocelulósicos, caso dos resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e resíduos de milho) e resíduos florestais (pó e restos de madeira), assim como o capim elefante para produção de etanol combustível (etanol de segunda geração) (CHU; MENDU et al., 2012).

O mais abundante recurso biológico renovável da terra é a biomassa lignocelulósica. Dependendo da localidade, há variação da fonte lignocelulósica que será utilizada para a produção do bioetanol e outros produtos químicos. Por exemplo, em 2007, uma destilaria foi montada na Índia para produção de etanol de segunda geração a partir do sorgo doce, utilizando como matéria-prima lignocelulósica o sorgo doce (BALAT, 2012). Em algumas partes da Europa, particularmente a França e Itália, uvas tornaram-se uma matéria-prima para produção de etanol combustível a partir de resíduos gerados na produção do vinho. No Japão, tem sido proposto a utilização da palha de arroz. O etanol pode ser eficientemente produzido a partir de amidos, como a mandioca. Nigéria e Gana estão estabelecendo plantas de etanol a partir de mandioca. Primeira usina de etanol de mandioca em grande escala do mundo foi construída em Guangxi (China) por COFCO em 2007, com uma produção anual capacidade de 200.000 toneladas (LIU, 2010).

No caso do Brasil, os resíduos agroindustriais são os grandes destaques como fonte lignocelulósica para a produção de etanol 2G, sendo que dentre as opções existentes, a palha e o bagaço de cana-de-açúcar são os mais estudados e apontados como os mais promissores.

#### 2.2 Palha e bagaço de cana: resíduos da indústria sucroalcooleira

A cana de açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, que se estabeleceu há cerca de 6.000 a.C. na Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, e que posteriormente disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial regiões tropicais e subtropicais (SILVA, 2009b). A canade-açúcar foi introduzida no Brasil em 1532 e sempre teve importância destacada na economia do país (CONAB, 2015).

O país não é só o maior produtor da cultura, seguido por Índia e China, como também o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar. Responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo, o país deve ter redução na sua produção este ano em 2,5% (CONAB, 2015). Apesar de pouco mais de 50% da produção estar concentrada em São Paulo, a cultura é cultivada em todas as regiões do país (UNICA, 2015).

A cana-de-açúcar é semi perene e expressa um bom desenvolvimento em solos onde há boa aeração, boa drenagem, o que exige solos com profundidade superior a um metro. O desenvolvimento da cana se deve em dois ciclos. O primeiro ciclo da cultura é chamado de cana-planta, ou seja, quando a cultura ainda não teve o primeiro corte. O período da cana-planta pode ser de 12 ou 18 meses, conforme a variedade.

Após o primeiro corte encerra-se o ciclo da cana-planta e se inicia o ciclo da canasoca. Neste ciclo o período passa a ser de 12 meses para todas as variedades. A cultura tem como característica ser semi perene porque permite vários cortes, sem a necessidade de replantio, porém a cada safra é necessária a aplicação de insumos agrícolas de forma que a cultura continue com patamares de produtividades vantajosos. Quanto maior o número de corte, menor é a resposta da cultura à aplicação desses insumos, o que faz com que em determinado momento seja necessária a renovação desses canaviais (ALENCAR, 2012). A queda na produtividade agrícola em função de um maior número de cortes pode ser observada na Figura 1 a seguir:



Figura 1: Produtividade agrícola por idade de corte em toneladas/há.

O Brasil deverá produzir até o final da safra 2014/2015, aproximadamente, 642,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em pouco mais de 9 milhões de hectares. A estimativa é que sejam produzidos 36,36 milhões de toneladas de açúcar e 28,66 bilhões de litros de etanol (2,53% a mais do que os 27,96 bilhões de litros da safra anterior 2013/2014), sendo que 11,80 bilhões de litros serão de álcool anidro e 16,86 bilhões de litros serão de álcool hidratado (CONAB, 2015).

Ao produzir álcool e açúcar, o processamento da cana gera vários resíduos agrícolas, como a palha, o bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuárias. Para cada tonelada de cana produzida são gerados 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (LABAT; GONÇALVES, 2008; SAAD et al., 2008). Sendo assim, o esperado para esta safra é que sejam gerados 89,9 milhões de toneladas de cada resíduo.

Grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Atualmente, elas já são autossuficientes em vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço e algumas já até possuem termoelétricas acopladas, gerando energia adicional para as concessionárias elétricas da região. Quantidades de bagaço remanescentes podem ser utilizadas em inúmeros processos industriais pela separação da fibra, que serve para a fabricação de papéis/móveis, ainda que em pequena escala, e da

Fonte: CONAB, 2015.

medula que pode ser utilizada na alimentação animal e na produção de furfural; o bagaço pode também ser utilizado em processos de compostagem (ALENCAR, 2012).

Outro resíduo que vem anualmente aumentando no setor sucro-alcooleiro é a palha de cana. O grande problema da palha de cana é a fuligem liberada no meio ambiente durante a queima da palha no campo, na época da colheita, e pousa no chão na forma de finos blocos escuros. Mais de 70 produtos químicos já foram identificados na fumaça resultante das 21 queimadas, sendo que muitos desses produtos são tóxicos ou têm ação cancerígena (MORIYA, 2007a). Devido a estes problemas gerados pela queimada, em 19 de setembro de 2002, o Estado de São Paulo criou a Lei nº 11.241, que dispõe a eliminação gradativa da queima da cana. Em 11 de março de 2003, ela foi regulamentada pelo decreto nº 47.700, que apresenta, em seu artigo 2º, a tabela de eliminação gradativa do atual processo de cultivo, o qual deverá ser totalmente substituído por colheita mecânica até 2031 (SÃO PAULO, 2011).

Além disso, o canavial é um reservatório de carbono, pois as plantas retiram  $CO_2$  do ar e o armazenam na forma de compostos orgânicos. Parte desse carbono encontra-se no palhiço (palha e pedaços de caule seco) e é lançado novamente na atmosfera quando se faz a queima do canavial como prática de pré-colheita. Na medida em que a energia dessa queima possa ser aproveitada em substituição daquela proveniente de combustíveis fósseis, haveria uma contribuição na redução do  $CO_2$  atmosférico, ou seja, seria criado um crédito de carbono de acordo com o protocolo de Kyoto. A Lei de Queimadas no Estado de São Paulo, desta forma, traz grande incentivo para o aproveitamento da palha na geração de energia.

Entretanto, com a eliminação total da prática de queima da palha, haverá um excedente de biomassa, que em longo prazo provocaria problemas como a mudança no estoque de carbono do solo. Necessariamente, segundo Cerri (2009), parte da palha gerada no processo de colheita deve permanecer sobre o solo como forma de prevenir a erosão, mas 60 % da palha deve ser removida do campo para evitar a formação dos chamados colchões de palha, que a longo prazo pode causar a infertilidade do solo além do aumento do estoque de carbono.

Considerando-se a necessidade de aumento de produção para suprir a demanda futura de etanol e a disponibilidade de bagaço e de palha nas usinas sucroalcooleiras, diversos grupos de pesquisa trabalham no desenvolvimento de tecnologias que garantam um aproveitamento racional dessas duas fontes de biomassa para a produção de etanol, visando aumentar a produtividade do setor. Mas para um melhor entendimento dessa aplicação, é necessário um conhecimento mais detalhado sobre as características químicas desses materiais lignocelulósicos, as quais serão vistas a seguir.

#### 2.3 Características estruturais dos materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais lignocelulósicos, como a palha e bagaço de cana, 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 micro-organismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (SARKAR et al., 2012). A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa, conforme mostrado na Tabela 1.

Biomassa Vegetal	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Tabela 1: Composição química de biomassas com potencial para produção de etanol de segunda geração.

Fonte: ROCHA et al., 2011; SANTOS et al., 2012.

Na parede celular, as fibrilas elementares estão separadas umas das outras por uma camada de hemiceluloses, formando as microfibrilas, que são envolvidas em uma matriz de lignina, constituindo a parede celular (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose, hemicelulose e lignina se organizam, na parede celular, formando diferentes camadas denominadas parede primária (P) e secundária (S1, S2 e S3). As diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido vegetal, como pode ser visualizado na Figura 2 a seguir.





Fonte: adaptado (STICKLEN, 2008).

A parede primaria é a primeira camada a ser depositada durante o desenvolvimento da célula, seguida da formação das paredes secundárias S1, S2 e S3. Nestas regiões as microfibrilas de celulose possuem distintas orientações em relação ao eixo longitudinal da célula. A parede mais espessa é a S2, na qual as microfibrilas de celulose estão orientadas de forma quase paralela ao eixo axial da célula. As fibrilas de celulose próximas ao lúmen da célula correspondem à camada terciária e estão orientadas quase perpendicularmente ao eixo da célula (FENGEL; WEGENER, 1989).

A deposição da lignina ocorre após a conclusão da formação dos polissacarídeos na matriz da camada S2, então, inicia-se a lignificação da parede secundária. A maior parte da lignina é depositada quando a celulose e a hemicelulose são depositadas na camada S3, e é encontrada, em maior quantidade na camada S2, porém na lamela média ela se encontra

em maior concentração (SAKA; GORING, 1985; BAUCHER et al., 1998; DONALDSON, 2001).

A matriz amorfa de hemicelulose e lignina, que envolve as fibras de celulose, (Figura 3) agem como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).



Figura 3: Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.

Fonte: adaptado (KONDO, 1997).
Desta forma, devido às características recalcitrantes da biomassa vegetal, faz-se necessária as etapas de separação dos constituintes do material lignocelulósico.

#### 2.3.1 Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, no entanto, existem também vários outros tipos de organismos que produzem celulose como as ascídias (tunicados), os oomicetos ("fungos protistas") e alguns outros protistas e também bactérias do gênero *Acetobacter*. Ela é um polímero linear formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose, na forma de piranose, unidas por meio de ligações  $\beta$ -(1-4) glicosídicas (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). O tamanho da cadeia molecular é normalmente especificado como grau de polimerização (DP), ou seja, o número de resíduos de glicose que formam a cadeia, e a sua variação está entre 7.000 e 15.000 para celulose de origem vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989).

Duas unidades de glicose adjacentes são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxila no carbono 1 e 4. Como pode ser observado na Figura 4 a posição  $\beta$  da hidroxila no carbono 1 faz com que o resíduo de glicose subsequente fique de cabeça para baixo em relação ao anterior, ou seja, a configuração  $\beta$  impõem uma rotação de 180° em unidades de glicose alternadas. Sendo assim, a unidade que se repete ao longo da cadeia de celulose é um resíduo de celobiose ao invés do resíduo de glicose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009; FENGEL; WEGENER, 1989). Duas ligações de hidrogênio entre resíduos de glicose adjacentes – entre as hidroxilas dos carbonos 6 e 2 e entre o oxigênio do carbono 5 e a hidroxila do carbono 3 (Figura 4) – estabilizam a ligação glicosídica e tornam a estrutura rígida. Existem também ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. Estas ligações intermoleculares estão localizadas entre as hidroxilas dos carbonos 6 e 3 e são responsáveis pela formação de estruturas supramoleculares, resultantes da agregação das cadeias em fibrilas cristalinas elementares de 36 cadeias de celulose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Figura 4: Representação da estrutura linear da celulose.



Fonte: adaptado (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

## 2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são carboidratos intimamente associados com a celulose na parede celular. Diferentemente da celulose, elas podem ser formadas por cinco anidro-açúcares neutros, as hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose e as pentoses D-xilose e L-arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de grupos acetila, ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira (Figura 5). Sendo assim, elas são classificadas de acordo com o principal açúcar da cadeia do polímero, como por exemplo: xilana (xiloses ligadas por ligação  $\beta$  – (1,4) ou mananas (manoses ligadas também por ligação  $\beta$  – (1,4) (FENGEL; WEGENER, 1989; JØRGENSEN; KRISTENSEN, 2007).

As cadeias moleculares das hemiceluloses são muito mais curtas que as da celulose, apresentando um DP variando de 100 até cerca de 200 unidades de açúcares. Outra diferença é a presença de grupos laterais e ramificações em alguns casos (FENGEL; WEGENER, 1989). As hemiceluloses podem se apresentar tanto na forma de homopolímeros (exemplo: xilana, formado por xilose) ou heteropolímeros (exemplo: glucomanana, formado por glicose e manose). Seu teor varia de acordo com o tipo de material lignocelulósico. As folhosas, por exemplo, contêm mais hemicelulose que as coníferas; entretanto, pode-se admitir um valor médio de cerca de 20% (FERRAZ, 2004).



Figura 5: Representação da estrutura de um arabinometilglucuronoxilana.

Fonte: adaptado (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

#### 2.3.3 Lignina

A incorporação da lignina na parede celular dos vegetais permitiu que estes pudessem conquistar a superfície terrestre, já que ela aumenta as propriedades mecânicas de tal forma que plantas grandes como as árvores com alturas maiores do que 100 metros podem permanecer na posição vertical (FENGEL; WEGENER, 1989). Ela é o constituinte não-carboidrato mais abundante da madeira, que preenche os espaços entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses (BERLIN et al., 2005; EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Ela tem a função de conferir rigidez à parede celular, servir como um cimento unindo células diferentes em um tecido (lamela média), atribuir um caráter hidrofóbico à parede celular além de protegê-la contra a degradação enzimática (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A lignina é polimerizada a partir de três monômeros chamados monolignóis, são eles: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Eles são derivados fenilpropano, com diferenças no número de metoxilas ligadas ao anel. Os álcoois coniferílico e sinapílico apresentam uma e duas metoxilas ligadas ao anel aromático, respectivamente, enquanto que o álcool p-cumarílico nenhuma, como islustrado na Figura 6 (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Figura 6: Esquema estrutural dos precursores da lignina.



Fonte: adaptado (PLANT, 2012).

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não conhecida completamente. A proporção dos precursores das ligninas varia entre as diferentes espécies de plantas e a razão entre eles tem sido usada com propósitos taxonômicos. As ligninas de folhosas, também chamadas de madeiras duras apresentam em sua composição além de grupos guaiacila, proporções mais elevadas de grupos siringila, enquanto as ligninas de madeiras mole (coníferas) são mais ricas em grupos guaiacila. Como conseqüência desta diferença química, as ligninas de folhosas são menos condensadas e mais susceptíveis à conversão química e biológica que as ligninas de coníferas. As ligninas de gramíneas, tais como bagaço de cana e bambu, apresentam ainda grupos p-cumarilas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Além disso, a lignina é capaz de formar ligações covalentes com algumas hemiceluloses, incluindo ligações éter ou éster entre a unidade de lignina e a hidroxila ou grupo carboxílico do carboidrato ou seu derivado (Figura 7). Por exemplo, ligações benzil éster com o grupo carboxila do ácido 4-O-metil-D-glucurônico na glucuronoxilana. Ligações éter mais estáveis, também conhecidas como complexos lignina carboidrato, podem ser formadas entre a lignina e resíduos de arabinose ou galactose presentes em xilanas e mananas. Em geral, plantas herbáceas, como as gramíneas, têm um menor conteúdo de lignina, enquanto que coníferas têm o maior conteúdo deste componente (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010).



Figura 7: Representação de uma macromolécula de lignina do tipo G (coníferas).

Fonte: adaptado (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

## 2.3.4 Outros Compostos

Os materiais lignocelulósicos contêm também pequenas quantidades de compostos fenólicos, proteínas, cinzas inorgânicas, amido e ácidos graxos. Essas substâncias possuem um papel importante na proteção contra pragas e no metabolismo das plantas, mas não têm uma contribuição positiva aos processos de conversão de biomassa e sim um efeito inibitório (FENGEL; WEGENER, 1989).

## 2.4 Produção de Etanol de 2ª Geração (2G)

Bioetanol pode ser produzido a partir de uma grande variedade de carboidratos, sejam mono, di ou polissacarídeos. Monossacáridos (por exemplo, xilose, glucose, frutose) consistem em açúcares simples, representados pela fórmula molecular geral (CH<sub>2</sub>O)n Pentoses e hexoses são os monossacáridos mais comuns na natureza, considerando o fato, por exemplo, que a glicose é a forma de açúcar pertencente ao metabolismo de organismos animais e vegetais. Muitas vezes, os açúcares são transportados na forma de dissacarídeos em vegetais. Os polissacáridos são compostos por subunidades semelhantes (monômeros), como, por exemplo, o amido e a celulose, que são compostos por monômeros de glicose. Os polissacarídeos devem ser hidrolisados em dissacarídeos e/ou monossacarídeos antes do processo fermentativo para produção de etanol (BAEYENS et al., 2015).

Atualmente, grande parte da produção de etanol é proveniente da cana-de-açúcar (Brasil) e do milho (Estados Unidos), porém, em médio prazo será inviável atender à crescente demanda de etanol com as tecnologias correntes (CHENG; TIMILSINA, 2011). A biomassa lignocelulósica pode ser considerada como matéria-prima para produção de etanol celulósico a médio e longo prazo, devido ao seu baixo custo e elevada disponibilidade (LIMAYEM; RICKE, 2012). Mas, por outro lado, a obtenção de etanol a partir de material lignocelulósico não é tão simples como aquele gerado a partir de materiais ricos em açúcar ou amido. Uma vez que o material de alimentação é fornecido à planta de etanol, ele precisa ser cuidadosamente armazenado e condicionado para evitar a fermentação devido à contaminação bacteriana (KITAMAKI et al., 2013). Além disso, a conversão do material lignocelulósico envolve outras etapas, como ilustra o a fluxograma a seguir (Figura 8):



Figura 8: Fluxograma representativo das etapas para produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço e palha como matéria-prima.

Fonte: adaptado (DIAS et al, 2009).

O fluxograma anterior ilustra simplificadamente as etapas requeridas para a produção de etanol celulósico, sendo que as principais para conversão biotecnológica são: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação. A etapa de pré-tratamento ainda é considerada a crucial para desencadear a produção de etanol a partir de biomassa. Vários pesquisadores vêm estudando sobre esta etapa para diversos tipos de resíduos lignocelulósicos. Por exemplo, Taniguchi et al., (2010) e Chen et al., (2011) produziram etanol a partir de palha de arroz, Han et al., (2010) e Ibrahim et al., (2011) a partir de palha de trigo, Diaz et al., (2011) a partir de talos de girassol e, Martín et al., (2002) e Silva et al., (2011) a partir de bagaço de cana. Entretanto, o custo de alguns tipos de pré-tratamentos e a baixa densidade do material lignocelulósico ainda torna antieconômico a produção de etanol a partir da biomassa vegetal. Atualmente o custo de produção de etanol lignocelulósico ainda é muito maior que o da gasolina e, significativamente maior que o etanol de cana-de-açúcar ou de milho (CHENG; TIMILSINA, 2011).

Para superar as barreiras (custos) de produção de etanol lignocelulósico, mais pesquisas necessitam serem desenvolvidas em diversas as áreas, entre elas (CHENG; TIMILSINA, 2011; BAEYENS et al., 2015):

- Matérias-primas: os materiais lignocelulósicos podem ser geneticamente modificados para conterem um teor menor de lignina e maior de celulose e, assim, reduzir a severidade do pré-tratamento acarretando na diminuição de custos.
- Pré-tratamento: as tecnologias atuais de pré-tratamento empregam altas temperaturas e pressões, que resultam num elevado custo de operação. Prétratamentos com baixa temperatura e custo estão sendo desenvolvidos como uma tecnologia mais promissora para produção de etanol de segunda geração.
- Custo das enzimas: embora o custo das celulases tem sido reduzido significativamente nas últimas décadas, ele ainda é considerado elevado em comparação com as amilases. Microrganismos que tem elevada eficiência de geração de enzimas celulolíticas precisam ser mais explorados para viabilizar os processos de conversão enzimática de celulose.
- Fermentação de glicose e xilose: a glicose é o principal produto da hidrólise enzimática da celulose, enquanto a xilose é o principal produto da hidrólise da hemicelulose. A fermentação de glicose a etanol é uma tecnologia consolidada, mas converter xilose em etanol ainda é bastante complicada.

Existem alguns esforços no desenvolvimento de microrgnaismos geneticamente modificado (leveduras ou bactérias) que podem converter eficientemente tanto a glicose como a xilose em etanol, porém há necessidade de mais pesquisas para consolidar essa tecnologia. A conversão da celulose aproveita somente um terço da biomassa, enquanto com a conversão associada da hemicelulose permitiria empregar mais um terço do material lignocelulósico, tornando mais viável economicamente a produção de etanol de segunda geração.

Além do etanol celulósico, pode-se ainda produzir outros bioprodutos de interesse comercial, aproveitando cada fração da matéria-prima. Este é conceito de biorrefinaria: integração dos processos de conversão de biomassa e equipamentos para produzir combustíveis, energia e produtos químicos a partir da biomassa. O conceito de biorrefinaria é análogo à de refinarias de petróleo, que produzem combustíveis múltiplos e produtos provenientes do petróleo (NREL, 2009).

Ao produzir múltiplos produtos, uma biorrefinaria pode tirar vantagem dos diferentes componentes da biomassa e produtos intermediários e maximizar o valor derivado da matéria-prima da biomassa. A biorrefinaria pode, por exemplo, fornecer um ou vários produtos de baixo volume, mas de alto valor agregado, produtos de baixo valor, mas de alto volume como, por exemplo, combustível líquido, geração de eletricidade e calor de processo para seu próprio uso. Os produtos de alto valor contribuem para aumentar os lucros, e os de baixo valor, como os combustíveis satisfazem as necessidades energéticas nacionais, a produção de energia e reduzem custos. Além disso, em termos de ecoeficiência, a biorrefinaria demonstra melhor desempenho ambiental, principalmente no potencial de aquecimento global, devido à fixação do  $CO_2$  durante a fermentação ácida. (NREL, 2009).

A seguir, a Figura 9 representa um modelo esquemático de uma biorrefinaria da cana-de-açúcar.



Figura 9: Modelo esquemático de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

Fonte: MAZIERO, 2013.

# 2.5 Pré-tratamento de matérias lignocelulósicos: etapa crucial no processo de produção de bioetanol

Independente do uso dessas frações é necessário um processamento preliminar para separá-las, em particular a lignina, que pode ser considerada a principal barreira física que torna as fibras desses materiais cimentadas entre si. A separação dos principais componentes macromoleculares do bagaço e da palha, por exemplo, poderia levar parte desse resíduo para a produção de compostos químicos, como açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, furfural, fenóis e outros compostos aromáticos, de valor econômico maior que o da biomassa bruta, os quais poderiam ser obtidos através de processos químicos, bioquímicos, físicos ou combinações entre estes (MOSIER et al., 2005a).

Desta forma, o pré-tratamento é a primeira etapa da bioconversão de lignocelulósicos a etanol, que tem por finalidade alterar e remover os componentes responsáveis por dificultar o acesso da enzima, na etapa de hidrólise, ao substrato, neste caso a celulose, como mostra a Figura 10. Como consequência há um aumento do rendimento da hidrólise enzimática e da quantidade de açúcares fermentáveis.



Figura 10: Esquema do efeito do pré-tramento em materiais lignocelulósicos.

Fonte: adaptado (SANTOS et al., 2012).

Estudos têm mostrado que o pré-tratamento é a etapa de maior significância, e determinante para viabilizar a tecnologia de obtenção de bioetanol a partir de lignocelulósicos, isto porque esta etapa define o rendimento e o custo o qual os carboidratos de celulose e hemicelulose podem ser convertidos a etanol (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008).

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos sem nenhum pré-tratamento é extremamente lenta e resulta em rendimentos inferiores a 20% do valor teórico (CARA et al., 2006; JIN; CHEN, 2006; LYND et al., 2002; MONIRUZZAMAN, 1996; SILVA et al., 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). O complexo lignocelulósio é composto por uma matriz de celulose e lignina unidas pelas cadeias de hemicelulose. Sob o processo de pré-tratamento, essa matriz com características recalcitrantes é decomposta com o intuito de diminuir a cristalinidade da celulose e, consequentemente, aumentar a fração de celulose amorfa, que é a forma susceptível ao ataque de reagentes químicos e enzimáticos (SANCHEZ; CADORNA, 2008). Essa desestruturação das fibras possibilita a hidrólise rápida do material, com rendimentos mais elevados em açúcares em sua forma monomérica (fermentescíveis) (WYMAN; YANG, 2009).

Além da cristalinidade, outros fatores interferem na digestibilidade (ou hidrólise) de uma determinada biomassa lignocelulósica: grau de polimerização da celulose, porosidade do material (área superficial acessível), presença da lignina, heterogeneidade da biomassa e presença de hemicelulose (GUPTA; VERMA, 2015).

Em teoria, o processo de pré-tratamento ideal deverá proporcionar desagregação da estrutura do material lignocelulósico, fornecendo um substrato mais facilmente hidrolisável pelas enzimas celulolíticas, além de evitar a formação de produtos de degradação de açúcares e compostos inibidores aos microrganismos da fermentação, ter um custo operacional e de capital reduzido (MOSIER et al., 2005; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Ele deverá ser efetivo para uma grande variedade de materiais lignocelulósicos e permitir obter frações dos componentes da biomassa que possam ser aproveitados como, por exemplo, a geração de lignina de alto valor agregado, elevando a eficiência de utilização integral da biomassa. Além disso, o impacto do pré-tratamento no custo das etapas posteriores de recuperação de produto também deve ser levado em consideração (AGBOR et al., 2011; MOSIER et al., 2005).

Muitos métodos de pré-tratamento têm sido estudados ou estão ainda em fase de desenvolvimento. É difícil avaliar e comparar as tecnologias de pré-tratamento devido aos diversos custos de pré- e pós-processamento, o capital de investimento, a recuperação dos reagentes químicos e os sistemas de tratamento dos resíduos (GUPTA; VERMA, 2015). Entretanto, como parte integrante de um sistema industrial o biorefinaria, uma análise de balanço de massa pode ser usada para validar a eficiência de um processo para uma dada matéria-prima (AGBOR et al., 2011).

Os tipos de pré-tratamento dependem do material utilizado e da finalidade proposta de utilização das frações lignocelulósicas, podendo ser basicamente:

Físicos: os principais passos para a produção de etanol a partir dos resíduos agroindustriais são as combinações de métodos como moer ou lascar. Estes métodos reduzem a cristalinidade da celulose e melhoram e eficiência no momento do downstream (SUN; CHENG, 2002). Moagem úmida, moagem a seco, moagem por compressão ou no moinho de bolas vibratório são exemplos de pré-tratamentos físicos. A potência aplicada para a trituração/moagem mecânica da biomassa depende do tamanho de partícula inicial e final, do teor de umidade e da natureza dos materiais lignocelulósicos escolhidos para a etapa subsequente. Smith et al., 1991 e Weil et al., 1994 utilizaram métodos de moagem diferenciados (moagem por compressão, por atrito e utilização de moinho criogênico) em diferentes

biomassas como álamo, palha de trigo e de aveia, antes de submeter cada material ao tratamento por explosão a vapor, com o intuito de avaliar qual método seria mais eficiente com relação a custo-benefício, eficiência na moagem, etc. Várias tecnologias físicas vêm sendo desenvolvidas para a separação apenas do componente não-celulósico da matriz celulósica (ou seja, a lignina) para tornar a celulose mais acessível a hidrólise enzimática (MOSIER et al., 2005). Além da moagem, outros pré-tratamentos físicos vêm sendo amplamente estudados como o hidrotérmico, irradiação por micro-ondas, irradiação por ultrassom, pirólise e extrusão. Entretanto, os processos físicos em geral, são muito caros e que exigem mais insumos energéticos e, pensando em um processo em alta escala (produção comercial), dificilmente seria empregado (GUPTA; VERMA, 2015).

- Químicos e físico-químicos: várias tecnologias estão sendo desenvolvidas com relação aos pré-tratamentos químicos e físico-químicos. Há vários tipos, porém os mais estudados são geralmente os que envolvem a utilização de reagentes como hidróxido de sódio (para a remoção majoritariamente de lignina), ácido perclórico, ácido peracético, ácido sulfúrico, fosfórico e clorídrico (principalmente para remoção de hemicelulose), além de solventes orgânicos (GUPTA; VERMA, 2015; MARTINEZ et al., 2005). Porém, a maior resistência que existe em relação ao uso destes reagentes químicos é a preocupação com custo total da bioconversão da biomassa celulósica (GUPTA; VERMA, 2015). Shenoy et al., 2011 mostrou que dentre os tratamentos químicos, o pré-tratamento por ácido sulfúrico diluído é o mais estudado e o mais popular. Porém, há outros tipos que ganham destaque como o tratamento por explosão a vapor (catalisado ou não), AFEX (Ammonia Fiber Explosion), Cadoxen, etc (PRASAD et al., 2007).
- Biológicos: o processo de pré-tratamento biológico consiste na utilização de microrganismos como fungos de degradação (ou podridão) branca, parda e branda para a decomposição do complexo celulósico, liberando a celulose para a etapa subsequente de hidrólise enzimática (SARKAR et al., 2012; SUN; CHENG, 2002; PRASAD et al., 2007). Os fungos de degradação branca degradam todos os componentes dos lignocelulósicos, e fungos causadores de podridão parda degradam principalmente os polissacarídeos. Os fungos causadores de podridão branca apresentam dois comportamentos distintos: alguns degradam todos os componentes da parede celular vegetal simultaneamente, enquanto outros atacam preferencialmente a lignina nos estágios iniciais de colonização. Fungos causadores

de podridão branca e parda pertencem à classe dos basidiomicetos, sendo que os ascomicetos e os deuteromicetos são classificados como fungos causadores de podridão branda, que também são capazes de degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades muito inferiores aos basidiomicetos (PRASAD et al., 2007); FENGEL; WEGENER, 1989). As vantagens deste tipo de tratamento são a não utilização de reagentes químicos e baixo consumo de energia uma vez que não há necessidade de grandes suportes mecânicos (BALAT; BALAT, 2008). Como desvantagens têm-se a baixa taxa de hidrólise e baixos rendimentos, o que impede, de fato, a implementação (BALAT; BALAT, 2008). Zang et al., (2007) reportou que fungos de degradação branca foram efetivos para pré-tratar colmos de bambo em baixa temperatura (25°C). Este tipo de pré-tratamento possui baixos custos e é um processo favorável ao meio ambiente para liberar açúcares da matriz celulósica. Singh et al., (2010) reportou que o fungo Aspergillus terreus removeu 92% de lignina. Desta forma, comparado aos processos físicos e químicos que requerem muita energia e reagentes químicos para a remoção da lignina, o pré-tratamento biológico seria uma boa alternativa.

Apesar de existir diversos tipos/métodos de pré-tratamento, nenhum deles ainda atingiu um desenvolvimento suficiente para ser técnica-economicamente viável em escalas comerciais. Em alguns casos, um método é utilizado para aumentar a eficiência do outro, por exemplo, uma etapa de moagem pode ser empregada para melhorar o pré-tratamento por explosão a vapor em função da redução do tamanho do material lignocelulósico. Além do mais, a seleção do método de pré-tratamento deverá ser compatível com o método de hidrólise da celulose. Um pré-tratamento alcalino não é indicado caso a hidrólise do lignocelulósico seja feito por via ácida (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

Neste trabalho, foram escolhidos 3 tipos/métodos de pré-tratamento para estudo: explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub>, hidrotérmico e ultrassom.

#### 2.5.1 Explosão a vapor

O processo de explosão a vapor foi primeiramente desenvolvido por Mason (1926) e posteriormente por Babcock (1932), duas patentes pioneiras na área. Mason (1926) descreveu na sua patente um equipamento conhecido atualmente como "pistola de Mason". Este equipamento permite o contato de um vapor saturado com cavacos ou raspas de madeira em um curto intervalo de tempo seguido de uma rápida descompressão. Babcock (1932) demonstrou que esse equipamento também pode ser utilizado para a extração de açúcares fermentecíveis.

Atualmente, o processo de explosão a vapor tem sido considerado um processo mais próximo do tecnicamente e economicamente viável para o pré-tratamento de biomassa para a produção de insumos químicos, combustíveis, alimentos e polímeros (BALLESTEROS et al., 2006). A explosão a vapor permite a recuperação de grande parte dos componentes dos materiais lignocelulósicos, minimizando a sua degradação e, além disso, a técnica provou ser efetiva para uma grande variedade de materiais lignocelulósicos, incluindo madeiras dura, mole e gramíneas (SAAD, 2010).

A explosão a vapor acontece da seguinte maneira: o vapor penetra no material lignocelulósico e condensa, formando água líquida a altas temperaturas dentro das fibras. Após a descompressão, esta água que está em equilíbrio com o vapor a alta pressão, é rapidamente evaporada gerando literalmente uma explosão no interior das fibras. Esta explosão, por sua vez, proporciona a desestruturação e desagregação das fibras, além disso, nas regiões de alta densidade de celulose amorfa ocorre a ruptura da fibra (MASON, 1926; BABCOCK, 1932).

Além do efeito de desestruturação das fibras, a técnica de explosão a vapor também provoca a ruptura das ligações químicas dos componentes da biomassa. Isto ocorre devido à temperatura elevada do meio, superando a energia de ativação das reações. Dessa forma, os efeitos da explosão a vapor na estrutura dos materiais lignocelulósicos podem ser: a clivagem das ligações do complexo lignina-carboidrato; a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses, uma vez que os grupos acetil presentes na hemiceluloses são convertidos em ácido acético e atuam como catalisador na degradação dos polissacarídeos; o amolecimento e a clivagem extensiva das ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 da lignina, causando a fragmentação da mesma em subunidades de baixa massa molecular e diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose (OVEREND; CHORNET, 1987). A extensão de cada reação depende das condições de tempo, temperatura e presença e concentração de catalisadores.

Durante a explosão a vapor reações quase que simultâneas de despolimerização e repolimerização ocorrem na lignina devido à acidez gerada durante o tratamento (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007). Os dois tipos de reação são, em tese, originados de um intermediário comum, um íon carbônio (C<sup>+</sup>), conforme ilustrado na Figura 11 o qual é formado a partir da estrutura de álcool benzílico da lignina.

Figura 11: Esquema da reação mostrando a competição entre a despolimerização das ligações β-O-4 da lignina e a repolimerização envolvendo uma estrutura de lignina com um carbono aromático reativo.



Fonte: LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007.

O intermediário pode reagir promovendo a clivagem das ligações nas ligações β-O-4 clivando a lignina. No entanto, qualquer anel aromático adjacente com um carbono eletricamente mais negativo pode competir pelo íon carbônio, formando ligações carbonocarbono estáveis e acarretando na repolimerização da lignina. Uma forma eficiente de eliminar as reações de repolimerização é por meio da adição de um composto eliminador do íon carbônio, como por exemplo, um fenol reativo como o 2-nafitol. A supressão das reações de repolimerização da lignina pode acarretar em uma maior uniformidade e facilidade de extração da lignina de baixo peso molecular (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007). Em condições elevadas de tempo, temperatura e presença e concentração de catalisadores os açúcares como glicose e xilose gerados durante o processo de pré-tratamento podem sofrer desidratação, gerando 5- hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente (Figura 12) Estes compostos são inibidores de fermentação e devem ser removidos, ao menos parcialmente, do hidrolisado para viabilizar a fermentação da xilose.

Figura 12: Formação de 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico e fórmico e produtos de condensação provenientes da degradação de hexoses. As pentoses são degradas a furfural o qual pode sofrer condensação especialmente com os fragmentos de lignina solubilizados.



Fonte: adaptado (FENGEL; WEGENER, 1989).

#### 2.5.1.1 Explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub>

O uso de catalisadores no pré-tratamento a vapor aumenta a seletividade das reações de hidrólise dos polissacarídeos, propicia a redução da temperatura e do tempo de pré-tratamento e conseqüentemente melhora o rendimento de sacarificação. A recuperação dos açúcares das hemiceluloses pode, portanto, ser parcialmente atribuído à maior estabilidade das pentoses em soluções ácidas, com estabilidade máxima na faixa de pH de 2,5 a 3,5 (PARAJÓ et al., 1995a).

Excoffier et al., (1991), conseguiu recuperar 70% das hemiceluloses de madeira de álamo na forma de xilose, em pré-tratamentos a vapor catalisados com SO<sub>2</sub> a temperaturas de 217°C por 2 min e, quando as condições de pré-tratamento foram aumentadas para 225°C, foi possível obter um rendimento de 70% em glucose após 24h de hidrólise enzimática. O uso de catalisador ácido durante o pré-tratamento a vapor causa um substancial decréscimo no grau de polimerização (DP) da celulose (MILLER et al., 1989). Vários autores (VIGNON et al., 1995; SAWADA et al., 1995; BURA et al., 2012; EWANICK; BURA, 2012; EWANICK, 2011) têm postulado reduções no grau de polimerização durante a hidrólise ácida de materiais celulósicos como, por exemplo, algodão, madeiras duras e moles, palha de trigo e bagaço de cana.

Uma grande variedade de catalisadores ácidos encontra-se reportado na literatura, como o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (EXCOFFIER et al., 1991; BROWNELL; SADDLER, 1984; SAN MARTIN et al., 1995), o dióxido de enxofre ( $SO_2$ ) (LOMAX et al., 1994; RAMOS et al., 1992a), o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) (DESCHAMPS et al., 1996) e ácido nítrico ( $HNO_3$ ) (SADDLER et al., 1982). Entretanto, existem também alguns trabalhos que utilizam a impregnação alcalina, sendo o NaOH (FOX et al., 1989; SCHULTZ et al., 1984) e NH<sub>3</sub> os principais reagentes (HOLZAPPLE et al., 1991).

Durante o pré-tratamento por explosão a vapor sem catalisadores, a água pode atuar como um ácido catalítico (BAUGH et al., 1988; WEIL et al., 1997). Como explicado anteriormente, os grupos acetil da hemicelulose são clivados durante o processo e ácido acético é formado, favorecendo reações de auto hidrólise (RAMOS, 2003). Porém, o pH do meio não é suficientemente baixo, fazendo com que essas reações sejam menos intensas e lentas para a maioria das aplicações. Por este motivo, a adição de catalisadores ácidos é necessária para aumentar a eficácia do pré-tratamento (RAMOS, 2003; SCHÜTT et al., 2011; SCHÜTT et al., 2013). A introdução de dióxido de enxofre gasoso como catalisador ácido permite menores tempos de residência além de menores temperaturas de pré-tratamento, reduzindo custos energéticos (BURA et al., 2012).

Não obstante, há várias desvantagens a utilização de SO<sub>2</sub> como catalisador no processo de pré-tratamento. Algumas das desvantagens são:

- SO<sub>2</sub> é poluente que causa forte impacto na saúde do homem (EPA, 2010);
- Riscos na manipulação no momento da impregnação do gás;
- O SO<sub>2</sub> é rapidamente solubilizado em água e facilmente forma ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>); o SO<sub>2</sub> também pode ser oxidado a ácido sulfúrico na presença de oxigênio ou convertido em enxofre elementar ou tiossulfato na ausência de oxigênio, formando um meio extremamente ácido. Sendo assim, é inevitável a etapa de neutralização deste meio antes das etapas de fermentação e hidrólise enzimática, aumentando custos (SWADDLE, 1990; BROWNELL et al., 1988);

- Compostos sulfurosos gerados a partir da introdução de SO<sub>2</sub> no prétratameto pode ter efeito sobre o pH e sobre a composição do hidrolisado e dos sólidos pré-tratados, podendo influenciar negativamente os microrganismos durante a fermentação. Estes compostos incluem sulfitos, que mostraram efeito inibidor sobre a crescimento de *S. cerevisiae* (PILKINGTON et al., 1988; GARDNER et al., 1993). Além disso, o sulfureto também pode ser tóxico para muitos micróbios (CHEN et al., 2008);
- Corrosão do reator (WANG et al., 2009);

Mesmo com as desvantagens apresentadas, o método de pré-tratamento por explosão a vapor utilizando como catalisador o SO<sub>2</sub> é ainda muito estudado. Essas desvantagens podem ser amenizadas ou ainda pode haver a combinação de pré-tratamentos (por exemplo, refino seguido de explosão a vapor) com o intuito de diminuir ou eliminar a utilização de SO<sub>2</sub>. Porém, muitos fatores devem ser levados em consideração, como, por exemplo, o custo-benefício, custo energético e rendimento total (WANG et al., 2009; EWANICK; BURA, 2012). Além disso, segundo Brownell e Saddler (1987), dentre todos os catalisadores ácidos que poderiam ser utilizados, o SO<sub>2</sub> foi o composto que apresentou uma distribuição uniforme no momento da impregnação da biomassa e o dióxido de enxofre residual foi facilmente reciclado no processo. Portanto, o uso de SO<sub>2</sub> como catalisador apresenta grande potencial para a produção de bioetanol.

### 2.5.1.2 Severidade

Vários parâmetros influenciam na qualidade do material processado e na formação de subprodutos. Os mais importantes são: temperatura (T), tempo de residência (t) e acidez.

Outros fatores que provavelmente também influenciam são: design do reator, pureza dos reagentes, umidade do material a ser processado e pressão do sistema (SENDELIUS, 2005). Com o objetivo de facilitar a comparação de diferentes condições de pré-tratamento, Overend; Chornet (1987) combinaram os parâmetros temperatura (T) e tempo (t) em uma única grandeza, chamada fator de severidade (definido como Ro), e considerando que a cinética da reação seja de primeira ordem, desenvolveram a Equação 1 a seguir:

$$\log(R_o) = \log\left[t \cdot \exp\left(\frac{(T-100)}{14,75}\right)\right] \tag{1}$$

O emprego desta equação permite identificar o quão severo é o pré-tratamento e como estas condições podem alterar, por exemplo, a despolimerização da celulose. Além disso, Chum; Johnson; Black (1990) evidenciou a importância da acidez do meio, sobre a severidade do pré-tratamento, e adicionaram a variável pH a equação (1) e denominaram a Equação (2) de severidade combinada (CS - combined severity), conforme mostrado abaixo:

$$CS = \log(R_o) - pH \tag{2}$$

A inserção do termo pH a fórmula da severidade possui um papel importante uma vez que permite a comparação de diferentes pré-tratamentos com uma maior representatividade. Por exemplo, utilizando mesmos parâmetros de temperatura e tempo de processo, porém utilizando ácido diluído, com pH aproximadamente 2, e outro apenas agua, com pH em torno de 6, sabe-se que o resultado final entre ambos será diferente, isso porque devido à presença de ácido, primeiro caso, há uma aceleração da clivagem de açúcares e também de formação de produtos de desidratação uma vez que a presença de ácido catalisa estas reações. Considerando-se apenas a Equação 1, ambos os pré-tratamentos apresentariam a mesma severidade, porém subtraindo o valor de pH observa-se que o pré-tratamento ácido é mais severo que o hidrotérmico, nas mesmas condições de tempo e temperatura

Tipicamente, um pré-tratamento conduzido em baixa severidade pode levar à um fracionamento incompleto da biomassa vegetal, enquanto um de alta severidade pode resultar em uma desconstrução mais completa da biomassa, com melhor solubilidade da hemicelulose e maior fragmentação da lignina. Entretanto, em alta severidade pode haver formação de compostos indesejáveis (HMF, furfural, etc) em maior concentração, que

serão prejudiciais nas etapas subsequentes de hidrólise e fermentação, levando a baixos rendimentos (SENDELIUS, 2005).

## 2.5.2 Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração e também para a produção de biogás tem ganhado grande destaque e importância nos últimos anos (CHANDRA et al., 2012). A água, sobre alta pressão e temperatura, pode penetrar na biomassa, hidratar a celulose e solubilizar a hemicelulose, além de remover parte da lignina. As maiores vantagens deste tipo de tratamento são a não utilização de reagentes químicos e o não requerimento de materiais resistentes a corrosão na construção do reator para as reações de hidrólise no processo de pré-tratamento hidrotérmico. Outras vantagens podem ser listadas como a não necessidade da diminuição prévia do tamanho da biomassa, além da baixa necessidade de químicos para a neutralização do hidrolisado produzido e produzir baixas quantidades de resíduos para serem neutralizados, quando comparado com outros métodos de pré-tratamento (ALVIRA et al., 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a; ZENG et al., 2007).

O principal objetivo do pré-tratamento hidrotérmico é solubilizar, principalmente, as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível para a hidrólise enzimática.

Dos componentes macromoleculares dos materiais lignocelulósicos, as hemiceluloses apresentam maior sensibilidade química e térmica (LEVAN; ROSS; WINANDY, 1990; WINANDY, 1995) e por isso à temperatura de 180°C ou superior em condições neutras, inicialmente, ocorre à solubilização das hemiceluloses seguida de pequenas frações de lignina (BOBLETER, 1994; GARROTE; DOMINGUEZ; PARAJO, 1999). O principio do pré-tratamento hidrotérmico está relacionado a auto-ionização da água causada pela alta temperatura. A formação de íons hidrogênio a partir da autoionização da água promove a acidificação do meio e induz a solubilização e hidrolise dos grupos acetil da hemicelulose. O ácido acético é um subproduto desta reação, e o qual atua como catalisador da hidrolise (CYBULSKA; BRUDECKI; LEI, 2013). Durante a reação exotérmica de solubilização das hemiceluloses ocorre a formação de ácidos, que auto catalisam a reação de hidrólise das hemiceluloses. Caso ocorra a degradação catalítica

dos açúcares (monômeros) formados durante a hidrólise, uma série de reações de difícil controle é desencadeada, formando produtos secundários que possuem efeitos inibitórios para as etapas subsequentes (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Para minimizar a formação destes produtos inibidores é necessário manter o pH da reação de pré-tratamento entre 4 e 7, já que nesta faixa de pH a forma oligomérica é mantida e então a formação dos açúcares é minimizada (MOSIER et al., 2005b).

Assim como no método de pré-tratamento por explosão a vapor, a severidade é um fator importante a ser avaliado no pré-tratamento hidrotérmico. Heitz et al., (1989) demonstraram que a celulose resiste até uma severidade de log Ro = 3,8 e despolimeriza rapidamente após este valor, o que limita a severidade do pré-tratamento a valores próximos de 3 para evitar a despolimerização da celulose, que é um fenômeno indesejável, pois diminui o rendimento final em etanol.

Durante o pré-tratamento há despolimerização parcial da lignina, porém apenas o pré-tratamento hidrotérmico não é capaz de remover a lignina da biomassa, pois ocorre recondensação dos componentes solúveis da lignina durante a reação (ALVIRA et al., 2010). Como as frações de lignina degradada são os principais compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação, uma etapa adicional de extração de lignina do material pré-tratado pode ser requerida (RAHIKAINEN et al., 2011; MOSIER et al., 2005b; HONGZHANG; LIYING, 2007). Para isso, a extração alcalina, a oxidação com peróxido de hidrogênio, a extração com solventes e o uso de enzimas ligninolíticas podem ser empregados.

A extração alcalina é o método convencional utilizado para remoção de ligninas de materiais lignocelulósicos; este método oferece um baixo custo de produção quando comparado a outros métodos de extração, por exemplo, extração alcalina/solventes, já que oferece os mesmos rendimentos durante o processo.

Recentemente a combinação de pré-tratamento e deslignificação alcalina vem sendo estudada por diversos autores. Rocha et al., (2012) avaliaram a reprodução em escala piloto da combinação de pré-tratamento por explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina e obtiveram boa reprodutibilidade comparada a escala de laboratório. Rezende et al., (2011) utilizaram uma combinação de pré-tratamento ácido diluído e diferentes concentrações de NaOH na deslignificação alcalina e verificaram que acima de 1%(m/v) NaOH, há um aumento pouco significativo no rendimento da hidrolise enzimática.

## 2.5.3 Ultrassom

A sonoquímica estuda a aplicação de ondas sônicas e ultrassônicas em processos químicos. Essas ondas provocam o aumento da velocidade das reações químicas e da transferência de massa, reduzindo a quantidade de reagentes e tornando as condições reacionais menos drásticas (ADEWUYI, 2001). O tratamento ultrassônico de carboidratos foi inicialmente sugerido por Flosdorf e Chambers (1933), após alguns anos do estudo dos efeitos químicos do ultrassom, realizado por Richards e Loomis (1927). Atualmente, o grande interesse dessa técnica está no uso em remediação e prevenção da poluição de compostos recalcitrantes (ADEWUYI, 2001). Entretanto, alguns autores, aproveitando o grande interesse mundial em buscar novas tecnologias de geração de biocombustíveis renováveis, têm avaliado o efeito da sonoquímica em etapas de pré-tratamento da biomassa (HROMADKOVA; KOVACIKOVA; EBRINGEROVA, 1999; LIU; SUN; YE, 2006; MA et al., 2009; SANGAVE; PANDIT, 2004; SCHUCHARDT; GONÇALVES, 2002) e também na etapa de hidrólise enzimática da celulose (LI et al., 2004; LI et al., 2005; IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004).

O princípio da sonoquímica é baseado no fenômeno da cavitação, isto é, a energia transmitida pela onda sonora é absorvida pelo líquido formando micro cavidades que, num pequeno intervalo de tempo, colapsam-se liberando enormes quantidades de energia ao meio reacional. A temperatura e pressão dessas micro cavidades podem alcançar 5.000 K e 1.200 bar, respectivamente. Sob essas condições extremas, as moléculas mais voláteis se vaporizam e sofrem degradação pela temperatura gerando radicais livres (KARDOS; LUCHE, 2001). A água sob radiação ultrassônica se desassocia a radicais hidroxilas e átomos de hidrogênio. Além do efeito de lise das moléculas, o colapso das micro cavidades formadas durante a radiação gera também forças mecânicas, as quais são capazes de romper, homoliticamente ou heteroliticamente, macromoléculas de forma não-aleatória. A cavitação sofre grande influência pelas propriedades físico-químicas do solvente, soluto ou gases (ADEWUYI, 2001). As cavidades são mais rapidamente formadas em solventes com alta pressão de vapor e de baixa viscosidade e tensão superficial. Entretanto, a intensidade da cavitação é favorecida em solventes com características opostas (baixa pressão de vapor, alta viscosidade e tensão superficial) (AVVARU et al., 2006), já que as forças intermoleculares do líquido devem ser superadas para que as bolhas sejam formadas. Então, em solventes com alta densidade, tensão superficial e viscosidade geralmente as

bolhas necessitam de grande quantidade de energia para serem formadas provocando assim condições severas de cavitação (YOUNG, 1989).

Muitos dos pré-tratamentos estudados hoje em dia, como o alcalino (ZHANG; CAI, 2008), explosão a vapor (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007), ácido diluído (HENDRICKS; ZEEMAN, 2009) entre outros, necessitam de melhorias devido as desvantagens de se utilizar, muitas vezes, reagentes químicos e altas temperaturas para remoção eficaz de lignina. Outro problema associado a estes métodos é a formação de compostos inibitórios (furfural, HMF, ácido acético, etc.) em concentração relativamente elevadas que necessitariam da etapa de remoção, antes da hidrólise enzimática e fermentação (LUCHE, 1998). A utilização do método de ultrassom traria diversas vantagens, sendo uma delas a diminuição do uso de reagentes químicos no momento do pré-tratamento, sem a necessidade de altas temperaturas além de haver baixa formação de compostos inibitórios (YOUNG, 1989).

Wang et al., (2008) avaliaram a influência do pré-tratamento com ultrassom sobre celulose microcristalina. Os autores notaram que o pré-tratamento por ultrassom promove a destruição das pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose diminuindo o seu grau de cristalinidade e elevando a área superficial da mesma. Porém, apesar de alguns autores investigarem a influência do ultrassom em derivados de celulose ou até mesmo em celulose microcristalina, o efeito do pré-tratamento ultrassônico em materiais lignocelulósicos ainda é pouco avaliado.

Existem somente alguns trabalhos de aplicação de ultrassom em biomassas vegetais. Sun e Tomkinson (2002) investigaram a aplicação do ultrassom no isolamento de hemiceluloses de palha de trigo. Com tempos de tratamentos superiores a 20 min, o rendimento de extração da hemicelulose foi elevado em 1,5%. Rodrigues e Pinto (2007) avaliaram a extração de compostos fenólicos de cascas de coco moídas. Os autores notaram que o ultrassom favoreceu a remoção dos compostos fenólicos.

Sun et al., (2004) irradiaram ondas ultrassonoras sobre bagaço de cana-de-açúcar visando o isolamento da sua celulose. Os autores conseguiram obter várias frações de celulose, removendo até 90% de hemicelulose e lignina do material. Velmurugan e Muthukumar (2011) também estudaram a aplicação do ultrassom no pré-tratamento alcalino de bagaço de cana. Os autores concluíram que o pré-tratamento alcalino assistido por ultrassom é uma técnica promissora para deslignificação do material lignocelulósico. Mais de 70% da lignina foi removida empregando condições menos severas de pré-tratamento (NaOH 2% a 50°C por 20 min). Por fim, Subhedar e Gogate (2014) utilizou o

pré-tratamento alcalino conjugado com o ultrassom, com o intuito de otimizar o processo e avaliar a extensão da deslignificação, tendo como matéria-prima folhas de jornal. Na melhor condição encontrada, foi possível remover até 80% de lignina das amostras submetidas ao tratamento alcalino conjugado com o ultrassom, contra 40,2% de remoção de lignina quando apenas utilizado o método de extração alcalina sem ultrassom.

### 2.6 Etapa de deslignificação

Existem vários métodos de remoção de lignina, entre eles estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação kraft e polpação organosolv. Estas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos *in natura*, que apresentam uma estrutura morfológica bem rígida e recalcitrante, necessitando de condições de reações mais severas (concentração de álcali acima de 10% e temperatura maior que 150°C) nas insdústrias de polpa e papel. Por outro lado, quando o material lignocelulósico já sofreu algum tipo de tratamento que torna a lignina mais exposta e fragilizada, a técnica utilizada para remoção da lignina é a extração alcalina, que consiste da mesma ideia da polpação soda, porém em condições de reação mais brandas (concentração de álcali no máximo 4% e temperaturas na ordem de 70°C a 90C°).

Dessa forma, nos processos de conversão de biomassa vegetal a etanol, em que os materiais lignocelulósicos pré-tratados geralmente possuem a lignina mais exposta, a extração alcalina tem sido aplicada com grande eficiência na sua remoção (ALVIRA et al., 2010; RAMOS, 2003). Pan et al., (2005) mostraram que a extração alcalina da lignina resulta num aumento significativo da hidrólise enzimática da celulose de coníferas (aproximadamente 30%).

O mecanismo de ação do hidróxido na estrutura do material lignocelulósico começa com as reações de solvatação e saponificação das ligações cruzadas intramoleculares existentes entre a lignina e a hemicelulose. Com isso, essas ligações são rompidas, tornando o material mais poroso e aumentando o acesso do álcali à lignina e aos polissacarídeos (LEUSTEAN, 2009). Assim como ocorre no pré-tratamento ácido, no pré-tratamento alcalino os componentes da parede vegetal se comportam de forma diferente. O pré-tratamento alcalino solubiliza apenas uma parte dos polissacarídeos, sendo bem mais

eficiente na remoção da lignina (GÍRIO et al., 2010). No caso da lignina, as reações em meio alcalino geralmente têm início na desprotonação de um OH fenólico, dando origem a uma metileno quinona, através da clivagem no carbono alfa ou a estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama (FENGEL;WENEGER, 1989).

Em relação à celulose e hemicelulose, em meio alcalino elas são bem menos removidas do que em meio ácido (CARVALHEIRO et al., 2008). A principal reação desses compostos é a hidrólise alcalina, que promove a degradação de uma pequena parte da cadeia polimérica do polissacarídeo (BERGGREN et al., 2003), e no caso das hemiceluloses, também ocorre a remoção dos grupos acetil e dos ácidos urônicos presentes como grupos pendentes na estrutura hemicelulósica (YANG et al., 2012). Porém, se o tratamento alcalino ocorrer em condições severas (acima de 100°C), a perda de polissacarídeos aumenta. Nessas condições ocorrem as reações de "peeling", em que as unidades de açúcar com extremidades redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas numa alta taxa de velocidade de reação, causando uma redução drástica na massa molar dos açúcares.

A grande vantagem desse método é que numa aplicação industrial ele não requer equipamentos especializados, já que os hidróxidos não são tão corrosivos quanto os ácidos e a uma reação eficaz pode ser realizada não requer altas pressões (GAO et al., 2013).

#### 2.7 Hidrólise de materiais lignocelulósicos

Duas técnicas têm sido amplamente empregadas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos. São elas a hidrólise com ácido diluído ou concentrado (também denominado via química) e a hidrólise enzimática.

Os ácidos concentrados são fortes agentes de hidrólise da celulose, porém são altamente corrosivos, tóxicos e, portanto, necessitam de equipamentos especiais resistentes a corrosão. Além disso, para que o processo ácido seja viável, é preciso recuperar o ácido ao fim do processo de hidrólise. Sabe-se que quando são utilizados ácidos para a hidrólise, a fração de hemicelulose é hidrolisada rapidamente, primeiro que a celulose. Os monossacarídeos liberados pela hemicelulose ficam por muito tempo no meio reacional, ocasionando a degradação e perda dos açúcares. Já no uso de ácido diluído, devido à altas

temperaturas empregadas, uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada levando a uma inibição durante o processo de fermentação (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

A hidrólise enzimática é realizada sob condições muitos mais brandas, sem ocasionar corrosão do reator ou degradação de açúcares. Com o uso de enzimas é possível obter rendimentos de hidrólise de celulose próximos de 100% enquanto para via ácida isso já não possível. (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Mas por outro lado, a hidrólise enzimática também tem as suas limitações comparada com a hidrólise com ácido diluído. O tempo de hidrólise enzimática é de alguns dias enquanto para a via ácida poucos minutos já são suficientes. O preço das enzimas ainda é muito alto em relação ao do ácido sulfúrico, embora alguns obstáculos já foram superados pela companhia Danish Novozyme na redução do preço das enzimas (TAHERZADE; KARIMI, 2007a). Na hidrólise enzimática, o produto final da reação (glicose) provoca inibição das enzimas celulolíticas enquanto no processo químico, não sofre nenhum efeito. Com o intuito de superar a inibição das enzimas celulolíticas, o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) foi desenvolvido, na qual o açúcar liberado da hidrólise da celulose é diretamente consumido pelo microrganismo presente. Entretanto, as temperaturas ótimas para a etapa de fermentação e hidrólise são diferentes, gerando um novo desafio para obter etanol bioquimicamente com eficiência. Em função disso, o processo com a etapa de hidrólise enzimática e de fermentação separados (SHF) ainda é o mais utilizado (BALAT, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

A Tabela 2 a seguir resume as vantagens e as desvantagens entre o processo químico (hidrólise ácida) e enzimático para a conversão da celulose em glicose:

Parâmetro	Hidrólise com ácido	Hidrólise enzimática
Condição da hidrólise	Severa	Branda
Rendimento da hidrólise	Baixo	Elevado
Inibição pelo produto durante o processo	Não	Sim
Formação de compostos inibidores	Sim	Não
Custo do catalisador	Baixo	Alto
Tempo de hidrólise	Baixo	Elevado

Tabela 2: Comparação entre as hidrólises com ácido diluído e enzimática.

Fonte: Adaptado (Taherzadeh; Karimi, 2007a).

# 2.7.1 Hidrólise Ácida

O fundamento da hidrólise ácida consiste na quebra das moléculas de celulose, presentes nas fibras do material lignocelulósico, por meio da adição de ácido. Os processos mais famosos são o Bergius e o método Scholler (KITANI; HALL, 1989). O primeiro consiste na hidrólise com ácido clorídrico concentrado a baixa temperatura, enquanto o outro, com ácido sulfúrico diluído a alta temperatura. Os dois processos são eficientes na hidrólise do material lignocelulósico, porém apresentam baixos rendimentos devido à degradação dos açúcares monoméricos, formando furfural e hidroximetilfurfural (DORAN; ALDRICH; INGRAN, 1994; KELLER, 1996). Assim, os hidrolisados obtidos necessitam ser purificados para permitir a fermentação dos açúcares e várias metodologias podem ser utilizadas para esse fim.

Os processos de hidrólise ácida podem ser realizados a partir de dois tipos de catalisadores: ácido diluído, com concentrações do ácido menores que 5% (m/v), e ácido concentrado, com concentrações do ácido maiores que 5% (m/v) (GURGEL, 2010).

Na formação de açúcares, o fator concentração do ácido é de grande importância, pois quando esta concentração é elevada, a conversão de moléculas de celulose em hexoses ocorre de maneira mais rápida (NEUREITER et al., 2002). Além disso, o tratamento com soluções ácidas necessita de quantidades adequadas de água para que sua eficiência seja elevada. Isto porque, o ácido em meio aquoso dissocia-se formando o íon hidroxônio, o

qual é transportado para o interior da biomassa a fim de promover a quebra das ligações glicosídicas (GURGEL, 2010).

A temperatura também se apresenta como fator importante, porém, o impacto está relacionado à degradação dos açúcares formados pela hidrólise da celulose, logo, o controle da mesma deve ser minucioso. Quando a temperatura do meio reacional é muito alta, a produção de açúcares é mais rápida, bem como a degradação dos mesmos. Isto ocorre porque com o aumento da temperatura, a reação chega mais rapidamente à taxa máxima de açúcares, entretanto, a degradação também ocorre de forma mais rápida (NEUREITER et al., 2002).

A hemicelulose normalmente é muito mais suscetível à hidrólise ácida do que a celulose. Quantidades superiores a 85% de glicose podem ser obtidas da hemicelulose em condições de reação relativamente amenas, com apenas uma pequena parte da celulose sendo convertida a glicose. Condições mais severas são necessárias para atingir níveis altos de glicose a partir da celulose, no entanto, elas levam à degradação do açúcar liberado da hemicelulose, que se encontra no meio reacional, resultando em produtos secundários indesejados, fortes inibidores da fermentação (BRETHAUER, 2010).

Atualmente, há um maior interesse na utilização das soluções ácidas diluídas devido ao benefício econômico proporcionado, uma vez que o baixo consumo de ácido diminui os custos com matéria-prima e equipamentos, devido à uma menor corrosividade dos reatores utilizados no processo (GURGEL, 2010). Entretanto, o uso de ácidos diluídos não proporciona um inchamento adequado da região cristalina da celulose, o que leva a uma baixa taxa de conversão celulose em glicose. Para se alcançar taxas aceitáveis de conversão da celulose à glicose, em tempos razoavelmente curtos e com o uso de ácidos diluídos, é necessário um incremento na pressão e na temperatura, devido à inacessibilidade aos cristalitos de celulose, o que provoca a degradação de uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel, levando a um baixo rendimento da hidrólise e da fermentação (SAEMAN, 1981; XIANG, 2002).

A hidrólise com ácidos concentrados, ao contrário da realizada com ácidos diluídos, ocasiona um intumescimento da celulose com consequente ruptura da mesma e insignificante destruição da glicose. Por este motivo, este processo apresenta maiores rendimentos, mesmo em baixas temperaturas. Não obstante, o custo é relativamente alto, o que faz com que seja imprescindível recuperação do ácido, que é um processo lento e de difícil desenvolvimento (ABASAEED, 1987).

Embora o princípio de clivagem de ligações glicosídicas pela reação catalisada com ácido seja conhecido, os dados cinéticos e o curso geral da degradação são influenciados tanto pelo meio ácido aplicado quanto pelas características da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Também influenciam na taxa geral de hidrólise das ligações glicosídicas a atividade hidrolítica, expressa pelo valor de pH, e a força ácida, expressa pela função de acidez de Hammett (Ho), quando se trata de reações catalisadas com ácidos em concentrações muito altas. Os parâmetros adicionais, temperatura e pressão, também devem ser verificados (VINK, 1966).

## 2.7.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pela ação das enzimas denominadas celulases, as quais são altamente específicas em relação ao substrato, reduzindo/eliminando a formação de subprodutos indesejáveis obtidos durante a reação, consequentemente levando a uma diminuição dos custos no processo de separação dos produtos (BALAT, 2011). Essa especificidade da enzima evita que ocorra a degradação da glicose, o que ocorre na via química de hidrólise (via ácida) (SANTOS, 2009). Além disso, as condições de operação da hidrólise enzimática são mais brandas do que os processos químicos, tanto para pressão como para temperatura e pH. Em contrapartida, as enzimas possuem um alto custo e são extremamente sensíveis, tornando necessário o controle rigoroso de diversos parâmetros (CARVALHO, 2011; CASTRO, 2010; PIETROBON, 2008).

As celulases são enzimas capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos liberando açúcares fermentescíveis, como a glicose (CASTRO, 2010). A maioria delas constituída por um domínio catalítico ligado a partir de uma sequência glicosídica a um domínio denominado "Core Binding Domain", (CBD), responsável por promover ligação entre a enzima e o substrato (PIETROBON, 2008). A Figura 13 representa o esquema de uma enzima celulase (BANSAL et al., 2009; CARVALHO, 2011).



Figura 13: Representação esquemática da celulase.

As celulases de fungos aeróbios receberam mais estudos do que qualquer outro grupo fisiológico, e atualmente dominam as aplicações industriais das celulases. Em particular, o sistema da celulase de *Trichoderma reesei* foi o foco de pesquisa por 50 anos. *T. reesei* produz, pelo menos, duas exoglucanases (celobiohidrolases CBHI e CBHII), seis endoglucanases (EGI, EGII, EGII, EGIV, EGV e EGVI) e duas  $\beta$ -glicosidases, que são produzidas em menor quantidade quando comparadas com as outras enzimas (BGLI e BGLII). O fungo *A. niger* também é muito estudado para a produção e celulases e se mostrou um eficiente produtor de  $\beta$ -glicosidase (MAEDA et al., 2011).

A necessidade de duas exoglucanases é atribuída as suas preferências particulares por finais de cadeia redutoras (CBHI) e não redutoras (CBHII) da celulose cristalina. A atividade da celobiohidrolase é essencial para hidrólise da celulose microcristalina. CBHI e CBHII são os principais componentes do sistema de celulase do *T. reesei*, representando 60 e 20%, respectivamente, do total de proteínas da celulase produzida por fungos (MAEDA et al., 2011).

Tendo em vista que a preparação enzimática utilizada para a hidrólise deve possuir quantidades adequadas de cada tipo de celulase, e que o uso de apenas um fungo produtor pode gerar uma atividade enzimática inadequada, se faz necessário à suplementação com enzimas provenientes de diferentes fungos. Isso porque uma quantidade excessiva de determinada celulase tende a gerar um acúmulo de inibidores de outra celulase, reduzindo a eficiência da hidrólise. Por este motivo os dois fungos mais utilizados são o *T. reesei*, que

Fonte: adaptado (BANSAL et al., 2009).

fornece quantidades adequadas de endo e exoglucanases, juntamente com o *A. niger*, que fornece um suplemento de  $\beta$ - glicosidase. O incremento desta carga enzimática pode ser realizado até determinada concentração limite, a partir da qual a adição de enzima seria inútil, visto que todos os sítios do substrato já estariam saturados. Com isso haveria um aumento considerável no custo das enzimas que não resultariam em um aumento no rendimento da hidrólise (MAEDA et al., 2011).

Além da concentração de  $\beta$ -glicosidase, vem sendo estudado o incremento da enzima xilanase ao meio reacional, suplementada, por exemplo, pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*, a fim de promover uma melhor eficiência da hidrólise. Estes estudos se baseiam no fato de que os xilooligômeros têm se mostrado fortes inibidores da hidrólise enzimática, mesmo a baixas concentrações. A xilanase teria a função de converter esses compostos em xilose, que são inibidores muito mais fracos da hidrólise (MAEDA et al., 2011).

Outra forma de maximizar a ação das enzimas consiste na utilização de aditivos, como algumas proteínas e surfactantes. O aditivo age ligando-se irreversivelmente à lignina, o que promove uma blindagem desta e impede que a enzima celulase realize uma adsorção não produtiva à lignina. Desta forma, o aditivo compete, juntamente com a enzima, pelo sítio ligante da lignina, o que promove um aumento da disponibilidade de enzimas livres no meio reacional e uma maior adsorção destas à celulose (CASTRO, 2010; MAEDA et al., 2011).

#### 2.7.3 Sinergismo: mecanismo de atuação das enzimas celulolíticas

A hidrólise da celulose requer ações de sinergismo de várias celulases em um sistema de reação heterogênea, e esse fato determina que o mecanismo dessa reação seja altamente complexo, dificultando até mesmo a modelagem matemática. Sinergismo é geralmente definido como o aumento da atividade exibido por uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (MENDES, 2010).

Sabe-se que a celulose é composta por frações cristalinas e amorfas. A parte amorfa, devido a sua maior área superficial é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina da celulose. Esta última por ser uma região muito organizada, apresentando grandes quantidades de ligações de hidrogênio, dificulta bastante o processo de hidrólise. Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose (SANTOS, 2009).

Estudos com celulose pura mostram que as regiões amorfas apresentaram degradação por enzimas fúngicas 5 a 10 vezes mais rápidas do que a celulose altamente cristalina, sugerindo que altas velocidades iniciais de degradação do substrato celulósico são devidas à hidrólise preferencial das regiões amorfas, e essa velocidade diminui assim que essas enzimas encontram regiões cristalinas mais recalcitrantes (SANTOS, 2009).

A Figura 14 mostra uma representação esquemática da hidrólise da celulose e a ação das endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases de *T. reesei*.

Figura 14: Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação das celulases: endoglucanases (endos), exoglucanases de terminais redutores (exosR), exoglucanases de terminais não redutores (exosNR) e ß-glucosidases.



Fonte: adaptado (BANSAL et al, 2009).

As endoglucanases são responsáveis pelo início da hidrólise e realizam uma clivagem randômica das ligações glicosídicas internas da fibra lignocelulolósica, tornando-as mais expostas. Por este motivo elas são responsáveis por reduzir o grau de polimerização da fibra, gerando regiões amorfas e liberando oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização, além de terminais redutores e não redutores. Essas regiões amorfas permitem uma melhor ação das enzimas por não possuírem ligações intermoleculares de hidrogênio tão fortes quanto às regiões cristalinas (MENDES, 2010). Já as celulases responsáveis por atuar na região externa da celulose são as exoglucanases, divididas em celobiohidrolases tipo I e II (CBHI e CBHII), e as glucano hidrolases. A celobiohidrolase tipo I hidrolisa os terminais redutores e a tipo II

hidrolisa os terminais não-redutores da celulose, ambas rompendo as ligações  $\beta$ -(1-4)glicosídicas. Essas são responsáveis pela ruptura física do substrato, promovendo uma desestratificação das fibras e um aumento considerável das regiões amorfas. O produto liberado a partir da ação das celobiohidrolases é a celobiose, um dímero de glicose, sendo este também um inibidor da ação dessas enzimas. As glucano hidrolases também agem nas extremidades dos oligossacarídeos, porém são capazes de liberar glicose diretamente deste polímero (PIETROBON, 2008). As celobiases ou  $\beta$ -glicosidases completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. Portanto, as celobiases hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água a glicose (CARVALHO, 2011; CASTRO, 2010).

Este complexo celulolítico atua em sinergia, ou seja, apresenta um melhor rendimento a partir da mistura de enzimas. Três formas de sinergia são conhecidas, sendo estas a sinergia EnG-ExG (endoglucanase/exoglucanase), sinergia ExG-ExG (exoglucanases) e sinergia ExG-BG e EnG-BG (exoglucanase/β-glucosidase e endoglucanase/β-glucosidase), o que torna o mecanismo altamente complexo e instável (CARVALHO, 2010; CASTRO, 2010).

A atividade das enzimas celobiase e endo/exoglucanases é inibida à medida que as concentrações de glicose e celobiose aumentam no meio reacional, respectivamente, ou seja, estas enzimas são inibidas por seus respectivos produtos (PIETROBON, 2008; SANTOS, 2009).

Além das interações entre as enzimas e possíveis causas de inibição, outros fatores merecem atenção. Algumas características estruturais da celulose devem ser levadas em consideração a fim de evitar interferências na ação do complexo enzimático, tais como a cristalinidade, o grau de polimerização e a acessibilidade. A quantificação da cristalinidade fornece uma estimativa da reatividade do substrato, visto que a hidrólise enzimática é de 3 a 30 vezes mais rápida em celulose amorfa do que em celulose cristalina. Portanto, quanto menor for à cristalinidade da celulose, mais rápida será a hidrólise enzimática (CARVALHO, 2011; MAEDA et al., 2011).

O grau de polimerização da celulose determina a quantidade relativa de pontes  $\beta$ glicosídicas entre as moléculas, e, consequentemente, o grau de solubilização da celulose. Desta forma, quanto maior for o grau de polimerização do substrato, menor será sua solubilidade. Este fator estrutural da celulose pode variar de acordo com a origem e a preparação do substrato, e também com a proporção de exo-endoglucanase, visto que uma maior concentração de exoglucanases confere uma despolimerização realizada a partir das porções finais da celulose (modo mais lento) e, uma maior concentração de endoglucanase confere uma despolimerização a partir das porções internas da celulose (modo mais rápido) (PIETROBON, 2008). A acessibilidade das celulases às microfibrilas da celulose é de fundamental importância, visto que a enzima necessita ligar-se à superfície da celulose para ter acesso às pontes  $\beta$ -glicosídicas e iniciar a hidrólise. Com isso o pré-tratamento do substrato promove um aumento da acessibilidade e da adsorção das enzimas à celulose, resultando em um aumento significante da taxa de glicose proveniente da hidrólise enzimática (MAEDA et al., 2011; PIETROBON, 2008).

É importante observar, também, os diversos fatores processuais, a fim de se obter rendimentos máximos da hidrólise, como o tipo do pré-tratamento realizado no substrato; a presença de hemicelulose e lignina no meio reacional, prejudicando o acesso à celulose e sua despolimerização (MAEDA et al., 2011); a termoestabilidade das enzimas e o pH do meio; a concentração do substrato; a velocidade de agitação, dentre outros fatores (CARVALHO, 2011; PIETROBON, 2008).

A termoestabilidade das enzimas requer um controle rigoroso da temperatura do processo. O aumento da temperatura, até certo ponto, promove um aumento da atividade enzimática e, consequentemente, da eficiência da hidrólise. Porém, ao se ultrapassar a temperatura limite de ação das enzimas, ocorrerá uma redução gradativa da atividade enzimática até que se alcance a desnaturação dessas. O mesmo controle rigoroso deve ser realizado com o pH, visto que um meio muito ácido provoca a desnaturação das enzimas (CARVALHO, 2011).

A velocidade de agitação do sistema influencia em três etapas diferentes do processo: a velocidade de difusão da enzima no filme líquido ao redor da celulose, a velocidade de adsorção da enzima à superfície da celulose e a velocidade intrínseca da reação de catálise da celulase. Deve-se observar que, quanto maior for a velocidade do fluido, menor será a espessura do filme estagnado e maior será a velocidade de difusão da enzima. No entanto, uma agitação exagerada do sistema poderá levar à desativação das enzimas devido à força de cisalhamento gerada pelo agitador, provocando uma redução no rendimento da hidrólise. Desta forma, um estudo cinético da hidrólise deve ser realizado para determinação da velocidade de agitação ideal para aquele sistema, a fim de evitar que a velocidade de uma etapa seja limitante das etapas subsequentes (CARVALHO, 2011).

Diante da fragilidade do processo envolvendo enzimas, pode-se notar que mesmo atuando em condições favoráveis, a hidrólise enzimática pode ser limitada por diversos fatores. A Figura 15 representa esquematicamente alguns destes fatores, que devem ser observados a fim de se conseguir um maior rendimento possível da hidrólise enzimática (WOLF, 2011). Figura 15: Representação esquemática de alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose. (1) Inibição das enzimas exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases por seus produtos (celobiose e glicose, respectivamente); (2) Impedimento estérico das celulases à celulose pela presença de hemicelulose; (3) Impedimento estérico das celulases à celulose pela presença de lignina; (4) Adsorção não produtiva da enzima à lignina; (5) desativação das enzimas por desnaturação térmica e/ou por cisalhamento por agitação excessiva.



Fonte: adaptado (WOLF, 2011).

## **3. OBJETIVOS**

# 3.1 Gerais

O objetivo principal do trabalho foi investigar tecnologias de pré-tratamento dos subprodutos sucroalcooleiros (bagaço e palha de cana) com intuito de dar um destino mais adequado e elevar a produção de etanol sem necessidade de aumentar a área cultivável das Usinas de Açúcar e Álcool, e também caracterizar o bagaço e a palha de cana-de-açúcar após os pré-tratamentos efetivados. Além de avaliar cada método de tratamento escolhido, foi testado também a possibilidade de misturar as biomassas em diferentes proporções com o objetivo de elevar o rendimento (recuperação total de açúcares) para produção bioetanol.

# 3.2 Específicos

- Estudar pré-tratamento hidrotérmico e pré-tratamento por ultrassom da palha de cana em diferentes condições;
- Realizar deslignificação alcalina dos materiais pré-tratados pelo método hidrotérmico e ultrassônico;
- Estudar o pré-tratamento por explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub> tanto para palha quanto para bagaço de cana, em diferentes condições;
- Misturar as biomassas em diferentes proporções e submeter as misturas ao prétratamento por explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub>, em condição previamente otimizada (item anterior);
- Realizar hidrólise enzimática tanto dos materiais somente pré-tratados como dos materiais que foram deslignificados;
- Caracterizar quimicamente cada uma das biomassas vegetais em sua forma "in natura", bem como caracterizar as frações obtidas após cada processo de prétratamento e deslignificação;
- Caracterizar os materiais lignocelulósicos "in natura", obtidos após pré-tratamento e deslignificação por difração de raios-X e MEV.
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado de acordo com os fluxogramas gerais da tese mostrado nas figuras 16 e 17.

Figura 16: Fluxograma operacional dos processos de pré-tratamento realizado para a palha de cana.



Fonte: Arquivo Pessoal.

- CQ Caracterização Química;
- DRX Difratometria de Raios X;
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura.



Figura 17: Fluxograma operacional do processo de pré-tratamento realizado para a palha e bagaço de cana.

Fonte: Arquivo Pessoal.

O bagaço e palha utilizados em cada pré-tratamento foram previamente moídos em um Moinho de Martelo (peneiras de 20 mesh), presente no Departamento de Biotecnologia. A palha de cana, utilizada neste trabalho, foi coletada diretamente durante o período de safra em 2011 na Usina da Pedra em Serrana-SP, e o bagaço foi coletado na Usina Olho d'Água em Pernambuco.

## 4.1 Pré-tratamento hidrotérmico

Os pré-tratamentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O reator utilizado foi do tipo autoclave eletrônica REG MED modelo AU/E-20 com capacidade de 20 L, conforme Figura 18.



Figura 18: Reator REG MED modelo AU/E 20.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Foram realizadas 15 reações em diferentes condições de tempo e temperatura, conforme a Tabela 3.

Amostras de Palha	Temperatura (°C)	Tempo (min)
R1	160	10
R2	160	20
R3	160	30
R4	160	40
<b>R5</b>	160	50
R6	170	10
<b>R7</b>	170	20
<b>R8</b>	170	30
<b>R9</b>	170	40
R10	170	50
R11	180	10
R12	180	20
R13	180	30
R14	180	40
R15	180	50

Tabela 3: Condições de pré-tratamento hidrotérmico de palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Para todas as condições acima descritas foi utilizada uma relação sólido/líquido de 1:10 (m/v), sendo o reator carregado com 1 kg de palha de cana-de-açúcar juntamente com 10 L de água destilada. Em seguida o reator foi hermeticamente fechado, e a camisa de aquecimento foi ligada e a temperatura e o tempo de reação foram monitorados. Com estes dados foi possível obter as rampas de aquecimento e de resfriamento de cada reação, conforme Figuras 19 e 20. Os patamares em cada gráfico representam o tempo de residência do bagaço e da palha na temperatura de reação.



Figura 19: Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo Pessoal.



50

0

0 20 40 60 80100 20 40 60 80 00 Tempo de reação (min)

Figura 20: Rampas de aquecimento e resfriamento para as diferentes condições de reação de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Ao término da reação, o vapor gerado foi liberado gradualmente até a reação atingir a temperatura de 100°C. Em seguida, o reator foi descarregado e foi feita a separação do material sólido (celulose e lignina) do material líquido (hidrolisado hemicelulósico). A palha de cana pré-tratada foi lavada com aproximadamente 80L de água a 70°C, até atingir pH neutro; este procedimento foi adotado para remoção de quantidades residuais do hidrolisado hemicelulósico. Para verificar se a quantidade de água utilizada na lavagem foi suficiente para remoção do hidrolisado residual, foi feita coleta de alíquotas de 20 em 20L destas águas de lavagem para as reações, com bagaço de cana, R3, R8 e R13. Para as demais condições de reação, foi obtida uma alíquota após lavagem com 80L de água. Posteriormente essas águas de lavagem e o hidrolisado foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme itens 4.7.2 e 4.7.6.

#### 4.2 Pré-tratamento por ultrassom

Um banho de ultrassom modelo USC 2800 da UNIQUE (Figura 21) com uma frequência de 40 kHz foi utilizado para os testes de pré-tratamento com ultrassom. As amostras de 30,0000 g (base seca) foram suspensas em uma solução alcalina (1% m/v de NaOH) ou ácida (1% m/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), relação material/solvente 1:10 (m/v). A temperatura do banho foi mantida constante (27 °C). O tempo de exposição do material sob irradiação ultrassônica foi variado de 1 a 30 mim (como ilustra a Tabela 4 a seguir) e, após isso, o material pré-tratado foi filtrado e lavado com 3 volumes de água e reservado para posterior caracterização. O hidrolisado obtido foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de açúcares, HMF e furfural.

Para acompanhar o efeito do pré-tratamento por ultrassom, foram feitas amostras controle, ou seja, a biomassa foi suspensa somente em água destilada, mantidas as condições sólido/líquido e a temperatura do banho e variando apenas o tempo, como foi realizado para as amostras suspensas em solução ácida e alcalina.



Figura 21: Banho de ultrassom modelo USC 2800 da UNIQUE utilizado para o pré-tratamento.

Fonte: Arquivo Pessoal.

PRÉ-TRATAMENTO POR ULTRASSOM					
MEIO ALCALINO	MEIO ÁCIDO	CONTROLE			
30 min (OH1)	30 min (H1)	30 min (C1)			
25 min (OH 2)	25 min (H2)	25 min (C2)			
20 min (OH 3)	20 min (H3)	20 min (C3)			
15 min (OH 4)	15 min (H4)	15 min (C4)			
10 min (OH 5)	10 min (H5)	10 min (C5)			
5 min (OH 6)	5 min (H6)	5 min (C6)			
1 min (OH 7)	1 min (H7)	1 mim (C7)			

Tabela 4: Condições adotadas para a realização do pré-tratamento por ultrassom.

Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 4.3 Pré-tratamento por Explosão a vapor catalisado por SO2

Para a realização do pré-tratamento, amostras de 150 g (base seca) de palha e bagaço e, posteriormente, todas as misturas avaliadas foram impregnadas por SO<sub>2</sub> anidro por 15 horas, em atmosfera sob pressão de sacos plásticos especialmente vedados. Para que

a impregnação ocorresse, primeiramente, a biomassa foi umidecida por 24 horas e, em seguida, após remoção do excesso de água presente na biomassa (utilização de centrífuga), foi determinada a umidade. A impregnação com  $SO_2$  ocorreu quando a biomassa atingiu o teor de umidade entre 60 – 62 %. A quantidade de dióxido de enxofre adicionado em cada saco correspondeu a 3% da massa seca da amostra utilizada. O pré-tratamento foi realizado em reator batelada de 2.7 L (Aurora Technical, Savona, BC, Canada), como ilustrado na Figura 22 a seguir.

Figura 22: Reator de explosão a vapor.



Fonte: Arquivo Pessoal.

As amostras (tanto palha quanto bagaço) foram sucessivamente aquecidas a temperaturas que variaram de 190 a 200°C, por 5 minutos. Após o processo de otimização, o pré-tratamento foi conduzido em temperatura ótima de 190°C por 5 minutos.

Após a explosão a vapor, as amostras pré-tratadas foram filtradas para separar a fração solúvel em água (licor hemicelulósico) da fração insolúvel (celulignina), usando o processo de filtração a vácuo. Para remover açúcares residuais, a celulignina foi lavada com um volume de água destilada e deionizada equivalente a 20 vezes o peso seco de cada amostra. O licor hemicelulósico foi analisado por HPLC, para quantificação de açúcares e inibidores, segundo o item 4.7.7.1 ; também foi analisado para determinação de fenólicos e lignina solúvel. A celulignina foi reservada para posterior caracterização química.

## 4.4 Deslignificação Alcalina

O processo de deslignificação alcalina do material in natura e obtido após prétratamento hidrotérmico e ultrassônico em diferentes condições, foi realizado em balão de vidro de 3 bocas, utilizando-se uma relação sólido:líquido 1:10 (m/v), NaOH 1% (m/v) e temperatura de 100°C por 1h sob agitação de 50 rpm. Ao término da reação o resíduo sólido do processo de deslignificação foi filtrado a vácuo, recolhendo-se o licor concentrado de lignina.

A fração sólida foi lavada com água destilada a 70°C para remoção da lignina residual contida na polpa bruta, até pH neutro. Após este procedimento, a polpa bruta foi seca à temperatura ambiente, até uma umidade de aproximadamente 10% e posteriormente mensurada quanto ao rendimento do processo (Equação 3). Uma fração de cada material deslignificado foi utilizada para caracterização química e análises microscópicas enquanto a outra fração foi submetida a ensaio de conversão enzimática.

#### 4.5 Rendimento de reação e perdas de componentes macromoleculares

A massa pré-tratada e deslignificada obtida foi mensurada para calcular o rendimento do pré-tratamento e deslignificação, respectivamente, conforme equação a seguir:

$$R = \frac{m final}{massa inicial} \times 100$$
(3)

Onde:

R: rendimento mássico da etapa (em %). *m inicial*: massa inicial seca de material lignocelulósico (g);

*m final*: massa final seca de material lignocelulósico (g);

Já as perdas dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) foram calculadas pela seguinte equação:

$$P = 100 \times \left(1 - (R/100) \times \frac{\gamma f}{\gamma i}\right) \tag{4}$$

Onde:

P: perda do componente macromolecular (em %);

yi: teor do componente macromolecular no material lignocelulósico "in natura";

yf: teor do componente macromolecular no material lignocelulósico pré-tratado;

#### 4.6 Hidrólise Enzimática

Para as amostras pré-tratadas por ultrassom e pelo método hidrotérmico e as polpas obtidas: a hidrólise enzimática foi realizada empregando a celulase comercial Celluclast 1.5 L, suplementada pela  $\beta$ -glicosidase (Novozym 188), ambas doadas gentilmente pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) ao laboratório. As condições de reação foram: tampão citrato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> pH 4,8 relação sólido:líquido 1:10, agitação orbital a 100 rpm, 45°C por 72 h. As cargas enzimáticas foram de 15 FPU/g de material seco (Celluclast 1.5 L) e 12,5 UI/g de material seco ( $\beta$ -glicosidase), baseadas nos valores comumente encontrados na literatura (BALLESTEROS et al., 2004; CARA et al., 2006; WYMAN, 1999). Após o término, os hidrolisados foram fervidos por 5 min, filtrados em papel de filtro Whatmann n.º 1 e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito abaixo. Os resíduos da hidrólise foram separados para posterior quantificação de massa residual. A conversão enzimática de celulose foi calculada pela equação a seguir:

$$CC = \frac{mglicose \times fh}{minicial \times yi} \times 100$$
(5)

Onde:

CC: conversão enzimática da celulose;

mglicose: massa de glicose presente no hidrolisado (g);

*minicial*: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise enzimática (g);

yi: teor de celulose no material lignocelulósico;

*fh*: fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9).

A atividade celulolítica total foi determinada utilizando-se a metodologia padrão de Mandels et al., (1976). Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 4,8 e 50 mg de papel de filtro Whatmann número 1 como substrato. O meio foi incubado num banho-maria a 45°C durante 1 h. 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, e o meio foi fervido 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 de  $\beta$ -glicosidase foi determinada utilizando a metodologia descrita por Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002). Em um tudo de ensaio foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução 0,1 % (m/v) de p-NPG (paranitrofenol  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glucosídeo). O meio foi incubado em banho-maria a 45°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10 % (m/v) de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). A quantidade de glicose liberada foi mensurada através da equivalência molar do p-NP (para-Nitrofenol) na clivagem do p-NPG (1 p- NPG  $\rightarrow$  1 glicose + 1 p-NP) e usando a absortividade molar do p-NP (E410nm = 15.000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Para as amostras submetidas ao pré-tratamento por explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub>: A etapa de conversão enzimática foi conduzida com 5% (m/v) de consistência, com um volume total de 50 ml, em erlenmeyers de 125 mL. Solução tampão de ácido cítrico 0,050 mol.L<sup>-1</sup> foi utilizado para manter o pH no valor de 4,8. Os frascos foram incubados a 50°C, sob agitação orbital em shaker (New Brunswick) de 175 rpm. Foram utilizados 5 FPU/g de celulose de Celulase (Celluclast 1.5L da Novozym) e 10 CBU/g de celulose de  $\beta$ -glucosidase (Novozym 188) em cada frasco. Em intervalos determinados, 1 mL de cada frasco foi removido até o fim de 96 horas, fervido por 10 minutos para desnaturar as enzimas e estocado em freezer a – 20 °C para análise posterior em HPLC. A atividade das enzimas foi mensurada da mesma maneira citada anteriormente.

#### 4.7 Análises químicas

4.7.1 Composição química dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por via hidrotérmica e por ultrassom e das respectivas polpas

Foi feita a caracterização química dos materiais "in natura" e obtidos nas etapas de pré-tratamento hidrotérmico e por ultrassom e deslignificação alcalina, conforme metodologia analítica desenvolvida por Rocha et al., (1997) e validada por Gouveia et al., (2009).

Para as amostras "in natura" primeiramente foi feita a remoção alcoólica de extrativos utilizando o aparato de Soxhlet, por 1 ciclo de 8 horas. Após a extração o material sólido foi seco em estufa até peso constante; e pela diferença do peso inicial foi feita a quantificação destes extrativos. Em seguida a amostra in natura, sem extrativos, foi submetida ao mesmo procedimento de caracterização química das demais amostras.

Amostras de 2g de material lignocelulósico (moído a 30 mesh), pesados com precisão de 0,1 mg, foram transferidos para um béquer de 100 mL e tratados com 10 mL de  $H_2SO_4$  72% (m/m), sob rigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45,0 ± 0,5°C por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a

amostra transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume final a 275 mL de água, e consequente diluição do ácido para aproximadamente 4% (m/v).

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, acima da pressão atmosférica, a 121°C.

Após a descompressão da autoclave, o erlenmeyer foi retirado, resfriado a temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL utilizando-se a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico que contém o hidrolisado foi submetido à análise de carboidratos, ácido acético, fórmico e glucorônico, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel. Enquanto o material sólido retido no filtro foi submetido a análise de lignina insolúvel e teor de cinzas.

#### 4.7.2 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE

Os hidrolisados e as águas de lavagem obtidas do pré-tratamento hidrotérmico e ultrasson, bem como os hidrolisados da metodologia de caracterização do material lignocelulósico e da hidrólise enzimática foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H2SO4 0,005 mol.L<sup>-1</sup> com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A.

Previamente à injeção das amostras na coluna, o pH das amostras de hidrolisado foi ajustado para a faixa de 1 a 3 e os compostos fenólicos presentes nas amostras foram 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.

#### 4.7.3 Determinação de lignina insolúvel em ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro obtido no item 4.7.1 foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7) e seco em estufa a 105°C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco; e a massa real de lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa obtida nesta etapa e a massa obtida da determinação de cinzas.

## 4.7.4 Determinação do teor de cinzas presentes na lignina insolúvel

Os materiais resultantes do item 4.7.1 foram colocados em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. Esses materiais foram inicialmente pré-calcinados a 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.

## 4.7.5 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. Foram colocados 5 mL dos hidrolisados e águas de lavagem em um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 M.

Após agitação, a mistura resultante, foi analisada em espectrofotômetro. A equação 6 abaixo foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado.

$$C_{Lig} = \frac{\left(A_{280\,nm} - \mathcal{E}_{HMF} \cdot C_{HMF} - \mathcal{E}_{Furf} \cdot C_{Furf} - 0,045650\right)}{\mathcal{E}lig} \tag{6}$$

onde:

 $C_{lig}$ : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);  $A_{280nm}$ : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;  $\varepsilon_{HMF}$ : Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g<sup>-1</sup>);  $\varepsilon_{Furfural}$ : Absortividade do furfural (146,85 L.g<sup>-1</sup>);  $C_{HMF}$ : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);  $C_{Furfural}$ : Concentração de furfural no hidrolisado (g/L);  $E_{lig}$ : absortividade da lignina (L/g) Determinado por ROCHA et al., (1997).

#### 4.7.6 Determinação de furfural de hidrometilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu$ m) 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<sup>-1</sup>, a temperatura de 25 °C.

Os hidrolisados e águas de lavagem do item 4.1, bem como hidrolisados foram filtrados em membrana de diâmetro de poro de 0,47  $\mu$ m (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras. As amostras foram injetadas com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20  $\mu$ L. 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 a partir dos compostos puros.

4.7.7 Composição química dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por explosão a vapor catalisada por SO<sub>2</sub>

O método modificado de Tappi T-222 om-98 (TAPPI, 1998) foi utilizado para determinar a composição química tanto de cada biomassa "in natura" como após prétratamento. Amostras de 0,2 g (base seca) foi hidrolisada com 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m) por 120 minutos a temperatura ambiente (por volta de 20°C). Após o tempo transcorrido, as amostras foram diluídas em 120 mL de volume total e autoclavadas a 121°C por 60 minutos. Após resfriamento, o material foi filtrado em filtros de placa porosa n° 3 (Schott-Duran) devidamente tarados e a lignina insolúvel foi determinada por gravimetria. A lignina solúvel foi medida em espectrofotômetro a 205 nm. Análise de carboidratos e inibidores presentes no filtrado foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que será descrita no item 4.7.7.1 a seguir.

Para as amostras " in natura" foi realizado a remoção de extrativos em dois ciclos: o primeiro com água destilada apenas, durante 24 horas, e o segundo com etanol puro por 24 horas, utilizando o aparato de Soxhlet. Após a extração o material sólido foi seco em estufa até peso constante; e pela diferença do peso inicial foi feita a quantificação destes extrativos. Em seguida a amostra "in natura", sem extrativos, foi submetida ao mesmo procedimento de caracterização química das demais amostras.

# 4.7.7.1 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural

A concentração de açúcares foi medida utilizando o cromatógrafo Dionex (Sunnyvale, CA) HPLC (ICS-3000). O sistema é equipado com auto injetor AS, detector eletroquímico ED, bombas duplas e colunas de troca iônica (Dionex CarboPac PA1). Água filtrada e deionizada foi utilizada como eluente, em um fluxo de 1,0 ml.min<sup>-1</sup>. Solução de NaOH 0,2 mol.L<sup>-1</sup> em um fluxo de 0.5 ml.min<sup>-1</sup> foi utilizado para garantir a otimização da análise e estabilidade a linha base e do detector. Após cada análise, a coluna foi recondicionada com solução de NaOH 0,25 mol.L<sup>-1</sup>. Vinte microlitros de cada amostra foram injetados após a passagem por filtro com 0,22  $\mu$ m de diâmetro de poro (Restek Corp., Bellefonte, PA, U.S.). Fucose (0,2 g.L<sup>-1</sup>) foi adicionada em cada amostra e padrões, como padrão interno.

Para a análise dos inibidores (ácido acético, furfural e HMF), o equipamento utilizado foi o cromatógrado da marca Shimadzu Prominence LC com detector de índice de refração e coluna de troca iônica (REZEX RHMMono saccharide  $H^+$  (8%), Phenomenex, Inc., Torrance, CA, U.S.). O eluente utilizado foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol.L<sup>-1</sup> em um fluxo de 0,6 ml.min<sup>-1</sup>. A temperature da análise foi mantida constante a 63 °C. Vinte microlitros de cada amostra foram injetados após a passagem por filtro com 0,22 µm de diâmetro de poro (Restek Corp., Bellefonte, PA, U.S.). Padrões foram preparados e usados para quantificar cada componente.

#### 4.7.7.2 Determinação de cinzas

As cinzas foram determinadas para o material não extraído, com rampa de aquecimento em forno mufla até atingir 575°C, seguido de manutenção do material nesta temperatura por 2 h. Depois de resfriado, foi determinado o peso seco.

#### 4.7.7.3 Determinação de fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu (F-C) foi utilizado como forma de determinar de forma aproximada a concentração de fenólicos totais presentes no licor hemicelulósico, utilizando ácido gálico como padrão (AINSWORTH & GILLESPIE, 2007). O reagente de Folin Ciocalteu e o ácido gálico foram adquiridos da Sigma. As amostras foram analisadas pela a determinação da absorbância de cada solução a 765 nm contra a solução branco e um gráfico que relaciona absorbância com concentração foi plotado para a quantificação de fenólicos.

#### 4.8 Caracterização física dos materiais lignocelulósicos

## 4.8.1 Difração de Raios-X

Com o propósito de se avaliar a redução de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos após as etapas de pré-tratamento, os materiais pré-tratados (moídos a 40 mesh e devidamente secos em temperatura ambiente – matérias em torno de 10% de umidade) foram preparados para a análise de difração de raios-X, utilizando um difratômetro de raios X da marca Rigaku com um anodo rotatório de cobre ( $\lambda = 1,5418$  Å), filamento de tungstênio e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg – 20), passo angular de 0,05° e tempo de exposição de 1s por ângulo (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais – DEMAR da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP).

O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado pela equação 6 abaixo, segundo CAO; TAN, 2002:

$$I_c = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100$$
(6)

onde:

 $I_c$ : Índice de cristalinidade (%);

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

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

## 4.8.1.1 Interpretação dos resultados de Difração de Raios - X

Durante o pré-tratamento ocorre a remoção de hemicelulose e lignina (materiais amorfos) que promove um aumento da cristalinidade devido à maior quantidade de celulose presente na fibra. Além disso, o pré-tratamento contribui para remoção de celulose amorfa. As medidas de cristalinidade são importantes para se determinar quanto da celulose cristalina torna-se amorfa após o pré-tratamento. Espera-se um índice de cristalinidade menor devido à redução da recalcitrância do material lignocelulósico, já que a cada etapa de tratamento há um rompimento da estrutura rígida da biomassa vegetal diminuindo a barreira física ao transporte de massa (HIMMEL et al., 2007).

Para determinar se o pré-tratamento promove a diminuição de cristalinidade, algumas considerações devem ser abordadas.

Considerando que uma amostra de Avicel (100% celulose) possui uma cristalinidade de 83% (RAMOS, 2005) e que o bagaço in natura possui 42% de celulose com uma cristalinidade de 55,6%, pode-se dizer que o bagaço in natura possui 67% de cristalinidade em relação à Avicel. Utilizando esta informação pode-se obter a cristalinidade, relativa, esperada das amostras de bagaço após o pré-tratamento e deslignificação. A mesma relação pode ser utilizada para palha, porém utilizando-se os dados de composição química e índice de cristalinidade deste material.

Utilizando-se os dados obtidos da composição química de celulose no bagaço em cada etapa de processamento, pode-se determinar a cristalinidade esperada. A diferença entre o valor esperado e o valor obtido experimentalmente nos fornece a porcentagem de diminuição da cristalinidade da celulose, conforme indicado nas Equações 7 e 8:

$$Ice = CQcelulose * \frac{67}{CQ cel.ea}$$
(7)

$$Dc = Ice - Ic_{medida} \tag{8}$$

Onde:

*Ice*: Índice de cristalinidade esperada;

CQcelulose: composição química da celulose de bagaço ou de palha;

*CQcel.ea*: Composição química da celulose da etapa anterior (ex: para matérias pré-tratado a etapa anterior é a composição química do material in natura, para amostras deslignificadas a etapa anterior é a composição química do material pré-tratado);

Dc: diminuição da cristalinidade;

*Ic*<sub>medida</sub>: Indice de cristalinidade calculado a partir dos dados experimentais.

#### 4.8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Os materiais lignocelulósicos foram presos em um suporte com auxílio de fita de carbono e submetidos ao recobrimento metálico com ouro, espessura de 7  $\mu$ m com uma voltagem de 40 mA sob atmosfera de argônio. As amostras metalizadas foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura 1450 V (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP) operando a 20 kW e utilizando detector de elétrons secundários.

As amostras foram dispostas de forma que seja possível observar as modificações superficiais das fibras da palha depois dos pré-tratamentos e também após a deslignificação.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar

#### 5.1.1 Análise dos hidrolisados hemicelulósicos

Conforme descrito na literatura, o pré-tratamento hidrotérmico baseia-se na utilização de água, como agente de fracionamento, para extrair uma mistura rica em oligômeros, monômeros, açúcares e ácidos orgânicos (CAPARRÓS; LOPÉZ; DÍAS, 2007). O fracionamento dos carboidratos em oligômeros é bastante expressivo neste tipo de pré-tratamento, e devido à dificuldade de padrões destes oligômeros para uma análise completa, uma pós-hidrólise do licor nos fornece resultados mais significativos e facilita a compreensão de quais componentes possuem maior susceptibilidade à solubilização neste tipo de pré-tratamento.

Desta forma, a Tabela 5 mostra a composição do hidrolisado obtido após o prétratamento hidrotérmico nas diferentes condições estudadas, após o processo de póshidrólise para quantificação total dos açúcares.

Em todas as condições de reação, os hidrolisados apresentaram concentrações relativamente baixas de furfural e hidroximetilfurfural, corroborando com os dados obtidos da literatura, já que neste tipo de pré-tratamento é gerado uma quantidade significativa destes compostos, no entanto em uma baixa concentração devido à quantidade de água utilizada para conduzir as reações (BOBLETER et al., 1994).

	Celobiose	Ác.	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác.	Ác.	HMF	Furfural
		Glucur.				Fórmico	Acético		
<b>R1</b>	0,15	0,03	1,78	1,78	0,75	ND	ND	0,08	0,015
R2	0,14	0,04	0,27	1,09	0,86	ND	0,59	0,06	0,038
R3	0,14	0,03	0,19	1,39	0,59	ND	0,60	0,02	0,012
R4	0,16	0,13	0,22	1,89	0,78	ND	0,67	0,02	0,068
R5	0,16	0,13	0,18	1,60	0,64	ND	0,66	0,02	0,175
R6	0,16	ND	0,14	1,45	0,87	ND	0,64	0,04	0,018
<b>R7</b>	0,18	ND	0,15	1,65	0,88	ND	0,64	0,04	0,023
<b>R8</b>	0,17	ND	0,20	1,67	0,96	ND	0,76	0,05	0,041
R9	0,20	ND	0,36	1,78	0,96	ND	0,75	0,08	0,043
R10	0,22	ND	0,45	2,18	0,98	ND	0,83	0,10	0,042
R11	0,15	0,25	0,21	2,43	0,76	0,03	0,96	0,03	0,590
R12	0,99	0,37	0,20	2,31	0,70	0,04	1,11	0,02	0,703
R13	1,25	0,55	0,20	3,83	0,84	0,03	1,12	0,03	1,01
R14	1,26	0,70	2,01	4,76	0,89	0,03	1,13	0,02	1,01
R15	1,27	0,89	2,21	4,85	0,89	0,05	1,13	0,04	1,08

Tabela 5: Composição dos hidrolisados hemicelulósicos. A quantidade e cada componente está expressa em g.L $^{-1}$  (±0,01).

\*ND – não detectado

Fonte: Arquivo Pessoal.

Foi possível observar também a degradação da celulose devido à formação de hidroximetilfurfural, celobiose, glicose e ácido fórmico. Destes compostos, o furfural apresentou concentração significativa nos hidrolisados obtidos na condição mais drástica (a 180°C), quando comparado a outros compostos. Pode-se notar que quanto maior o tempo de reação, maior é a concentração destes compostos no meio, devido à degradação dos

açúcares que foram solubilizados, que pode ser considerado o parâmetro expressivo na degradação destes açúcares.

Além disso, a análise do hidrolisado revela a maior solubilização da xilose em relação aos demais componentes, evidenciando que o pré-tratamento atua preferencialmente na solubilização da hemicelulose. Observa-se um aumento de até 2 vezes na quantidade de xilose solubilizada quando considerado os mesmos tempos de reação em temperaturas diferentes, corroborando-se com LASER et al., (2002) que descreve a maior propensão à degradação térmica da hemicelulose em relação a celulose e lignina.

As águas de lavagem obtidas nas condições intermediárias para cada temperatura (R3, R8 e R12) foram analisadas e não foi detectado a presença de nenhum destes compostos, mostrando que após a lavagem com 60 L de água não há mais resquício destes componentes no material pré-tratado.

Nas Tabelas 6 e 7 estão mostrados os resultados da caracterização do hidrolisados em função da massa dos açúcares gerados e, por consequência, das perdas reais de massa de hemicelulose e celulose, uma vez que se considera que toda a massa perdida esteja principalmente solubilizada no hidrolisado.

Para gerar os resultados em massa, multiplicou-se o volume do hidrolisado (em litros) pela concentração de cada açúcar, que se encontram na Tabela 5 (já na concentração em g/L).

Para calcular a perda real de hemicelulose, somaram-se as massas de ácido glucurônico, xilose, arabinose, ácido acético e furfural. E para a perda real de celulose, somaram-se as massas de celobiose, glicose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural. A perda teórica de hemicelulose e de celulose foi calculada levando-se em considerção a perda de componente (Tabela 9), os valores de composição do material (Tabela 8) e massa inicial e final do pré-tratamento.

Amostras	Celobiose (g)	Glicose (g)	Ác. Fórmico (g)	HMF (g)	Perda Real de Celulose (g)	Perda Teórica de Celulose (g)
R1	0,97	11,39	ND	0,52	12,88	24,29
R2	0,79	1,46	ND	0,33	2,57	30,85
R3	0,88	1,15	ND	0,16	2,19	39,03
R4	0,94	1,33	ND	0,14	2,41	19,60
R5	0,90	1,05	ND	0,13	2,08	17,97
R6	1,17	1,03	ND	0,29	2,50	33,07
<b>R7</b>	1,40	1,17	ND	0,31	2,89	35,35
<b>R8</b>	1,25	1,47	ND	0,37	3,09	31,62
<b>R9</b>	1,52	2,74	ND	0,61	4,86	37,09
R10	1,41	2,88	ND	0,64	4,93	31,52
R11	0,77	1,13	0,17	0,13	2,19	25,32
R12	6,20	1,22	0,24	0,12	7,79	32,98
R13	8,06	1,30	0,17	0,15	9,68	43,80
R14	7,96	12,77	0,20	0,14	21,07	49,96
R15	7,66	13,40	0,30	0,22	21,59	62,77

Tabela 6: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados.

\*ND - Não detectado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

	Ác.			Ác.		Perda Real		
Amostra	Glue	Xilose	Arabinose	Acético	Furf.	de	Perda Teórica de	
Amostia	Ciuc.	<b>(g</b> )	<b>(g)</b>		<b>(g</b> )	Hemicelulose	Hemicelulose (g)	
	(g)			(g)		<b>(g)</b>		
R1	0,19	11,39	4,73	ND	0,09	16,40	58,67	
R2	0,22	5,90	4,63	3,21	0,20	14,17	66,73	
R3	0,20	8,55	3,61	3,70	0,08	16,14	86,93	
R4	0,76	11,55	4,77	4,06	0,42	21,56	79,05	
R5	0,76	9,26	3,70	3,79	1,01	18,53	79,50	
R6	ND	10,64	6,39	4,70	0,29	22,02	77,30	
<b>R7</b>	ND	12,87	6,87	4,99	0,31	25,04	85,29	
<b>R8</b>	ND	12,29	7,07	5,59	0,37	25,32	85,97	
<b>R9</b>	ND	13,53	7,30	5,70	0,61	27,13	99,73	
R10	ND	13,95	6,27	5,31	0,64	26,18	116,04	
R11	1,36	12,99	4,08	5,11	3,15	26,68	145,66	
R12	2,32	14,51	4,40	6,98	4,41	32,62	177,69	
R13	3,51	24,59	5,39	7,22	6,45	47,16	204,87	
R14	4,43	30,21	5,62	7,10	6,38	53,80	239,47	
R15	5,38	29,37	5,40	6,83	6,57	53,54	246,73	

Tabela 7: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados.

\*ND - Não detectado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Os resultados das Tabelas 6 e 7 mostram que a perda real, tanto de celulose quanto de hemicelulose, foi muito menor que a perda teórica determinada. Uma das hipóteses para o ocorrido seria o fato dos compostos mais voláteis terem se vaporizado durante o pré-

tratamento, tanto que não é possível estabelecer uma correlação entre a formação de produtos de desidratação de açúcares com a severidade do processo, já que houve uma despressurização manual do reator e o condensado não pode ser recuperado para posterior análise e fechamento total do balanço de massa.

#### 5.1.2 Composição química da palha submetida ao pré-tratamento hidrotérmico

O material pré-tratado (celulignina) (Figura 23) apresentou um escurecimento da cor em relação ao material "in natura", analogamente ao encontrado por Curreli et al., (2002) que relataram o escurecimento da palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico. Este fenômeno pode estar associado à catálise ácida das ligações do complexo ligninacarboidrato, bem como pela formação de produtos da degradação de carboidratos.

Figura 23: Palha de cana in natura e amostras pré-tratadas hidrotermicamente.



Fonte: Arquivo Pessoal.

	Os rendimentos d	los pré-tratamentos,	bem como a	composição	química do	material
obtido	estão	expostos	na	a	Tabela	8.

Amostra	Rendimento (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Total (%)
IN	100,00	$29,57 \pm 0,10$	$38,82 \pm 0,10$	$28,55 \pm 0,15$	$3,35 \pm 0,10$	$4,58 \pm 0,11$	104,87
<b>R</b> 1	82,89	$28,58 \pm 0,20$	$37,85 \pm 0,10$	$29,79 \pm 0,20$	$3,96 \pm 0,10$	-	100,18
R2	78,91	$29,02 \pm 0,20$	$38,96 \pm 0,26$	$29,60 \pm 0,10$	$3,40 \pm 0,15$	-	100,98
R3	76,92	$27,14 \pm 0,12$	$38,89 \pm 0,22$	$30,60 \pm 0,12$	$3,95 \pm 0,15$	-	100,58
<b>R4</b>	75,62	$28,65 \pm 0,30$	$42,12 \pm 0,20$	$25,37 \pm 0,11$	$3,46 \pm 0,10$	-	99,60
R5	76,92	$28,10 \pm 0,30$	$41,63 \pm 0,30$	$26,54 \pm 0,10$	$3,25 \pm 0,20$	-	99,52
R6	77,21	$28,29 \pm 0,15$	$39,52 \pm 0,09$	$29,33 \pm 0,17$	$3,18 \pm 0,15$	-	100,32
<b>R7</b>	75,94	$27,71 \pm 0,21$	$39,88 \pm 0,25$	$29,12 \pm 0,06$	$3,24 \pm 0,13$	-	99,95
<b>R8</b>	74,83	$28,03 \pm 0,14$	$40,97 \pm 0,20$	$28,70\pm0,10$	$3,47 \pm 0,07$	-	101,17
<b>R9</b>	71,66	$27,35 \pm 0,05$	$42,02 \pm 0,13$	$28,90 \pm 0,15$	$3,81 \pm 0,10$	-	102,08
R10	69,97	$25,68 \pm 0,26$	$43,83 \pm 0,10$	$28,46 \pm 0,16$	$3,73 \pm 0,22$	-	101,70
R11	69,3	$21,65 \pm 0,33$	$45,14 \pm 0,32$	$29,25 \pm 0,20$	$3,76 \pm 0,20$	-	99,80
R12	60,86	$19,38 \pm 0,20$	50,14 ±0, 21	$27,64 \pm 0,22$	$3,92 \pm 0,15$	-	101,08
R13	58,55	$15,51 \pm 0,11$	50,27 ±0, 21	$28,51 \pm 0,10$	$4,85 \pm 0,15$	-	99,14
R14	57,27	$9,82 \pm 0,21$	50,32 ±0, 20	$30,63 \pm 0,10$	$5,94 \pm 0,15$	-	96,71
R15	55,05	$8,90 \pm 0,20$	50,02 ±0, 23	$33,90 \pm 0,10$	$5,37 \pm 0,25$	-	98,19

Tabela 8: Composição química do material pré-tratado hidrotermicamente e da palha in natura e valores dos rendimentos de cada reação.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Observou-se uma diminuição do rendimento em função do aumento da temperatura e tempo de reação, indicando que há uma maior solubilização dos componentes lignocelulósicos com o aumento destas duas variáveis. Porém, para as reações realizadas a 160°C, os valores de rendimento não sofreram grande variação independente do tempo, ficando em torno de 76 %.

É possível, também, correlacionar as severidades do pré-tratamento com os rendimentos de reação, como ilustra a Figura 24 a seguir:

PTHT 160°C **PTHT 180°C** PTHT 170°C 84 80 80 70 82 **REND MENTO (%)** 8 60 80 REND MENTO 50 78 40 76 30 = -9,68x + 109,09 - 19,724x+134,67 74 20 10,172x+ 109,36  $R^2 = 0.8819$  $R^2 = 0,966$ 72 10  $R^2 = 0.8629$ 70 60 0 2 0 3 đ, 0 2 3 4 0 2 4 6 SEVERIDADE (LOG (RO') SEVERIDADE (LOG (RO)) SEVERIDADE (LOG (RO))

Figura 24: Correlação entre rendimento e fator de severidade (Log de (Ro)).

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota-se que para as três temperaturas avaliadas de pré-tratamento, quanto maior for a severidade, menor é o rendimento da reação, indicando que, além da temperatura, o tempo de pré-tratamento influencia na solubilização dos componentes. Ao se linearizar o efeito combinado da temperatura e tempo através do cálculo da severidade (Equação 1), nota-se um efeito linear para as condições estudadas, obtendo-se bons coeficientes de correlação ( $\mathbb{R}^2$ ), com mostra a figura acima.

A Tabela 9 a seguir mostram as frações macromoleculares solubilizadas corrigidas pelo rendimento. A Tabela 10 mostra a seletividade entre hemicelulose/celulose (H/C) e lignina/hemicelulose (L/H) para cada reação. Seletividade é a razão entre a solubilização/perda de dois componentes.

Pode-se verificar na tabela a seguir uma alta solubilização das hemiceluloses. Isso ocorre devido às hemiceluloses apresentarem caráter amorfo, grande polidispersidade e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose nativa (geralmente não ultrapassando o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcar). Todas essas características

fazem com que esta fração seja muito mais susceptível ao pré-tratamento do que a fração celulósica (FENGEL, 1989).

Quando se compara a solubilização da hemicelulose para os mesmos tempos de reação em diferentes temperaturas, nota-se um aumento da solubilização com o aumento da temperatura, confirmando os resultados da caracterização do hidrolisado obtido após o pré-tratamento, descrito anteriormente. O tempo também influencia na taxa de solubilização.

Amostra	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)
R1	19,87	19,17	13,52
R2	22,55	20,82	18,20
R3	29,39	22,94	17,57
R4	26,75	17,96	32,83
R5	26,89	17,52	28,52
R6	26,13	21,40	20,68
<b>R7</b>	28,84	21,99	22,54
<b>R8</b>	29,07	21,06	24,78
<b>R9</b>	33,72	22,43	27,46
R10	39,23	21,00	30,25
R11	49,26	19,42	29,01
R12	60,09	21,39	41,09
R13	69,28	24,18	41,55
R14	80,98	25,76	38,58
R15	83,44	29,07	34,65

Tabela 9: Perda/Solubilização de cada componente para cada reação.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Amostra	Seletividade H/C	Seletividade L/H
R1	1,04	0,68
R2	1,06	0,81
R3	1,28	0,60
<b>R4</b>	1,48	1,22
R5	1,49	1,06
<b>R6</b>	1,22	0,79
<b>R7</b>	1,31	0,78
<b>R8</b>	1,38	0,85
<b>R9</b>	1,50	0,81
<b>R10</b>	1,86	0,77
R11	2,54	0,59
R12	2,81	0,68
R13	2,87	0,60
<b>R14</b>	3,14	0,48
R15	2,87	0,42

Tabela 10: Seletividade entre hemicelulose/celulose e lignina/hemicelulose.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Com relação à celulose, pode-se afirmar que tanto o tempo quanto a temperatura influenciam na solubilização da celulose. Para um mesmo tempo de reação considerando um aumento da temperatura observa-se um aumento na solubilização da celulose, enquanto que mantendo-se a temperatura constante e considerando o aumento do tempo de reação, observa-se um aumento da solubilização deste componente.

Avaliando o efeito de solubilização na temperatura de 160°C variando-se o tempo de 10 para 20 min, observa-se um aumento de 8% na solubilização da celulose, e considerando esta mesma variação de tempo para a temperatura de 180°C, solubilização de 9,21 % da celulose, o que nos permite afirmar que o efeito de solubilização da celulose com o tempo de reação é ainda potencializada quando esta variação ocorre em temperaturas elevadas, ou seja, um aumento do tempo e da temperatura de reação promovem uma solubilização ainda maior da celulose. Porém, os valores encontrados para solubilização de celulose são inferiores quando comparados aos da hemicelulose, uma vez que a celulose possui duas regiões estruturais com reatividades diferentes: cristalina e

amorfa. A região de celulose cristalina, em que as microfibrilas estão altamente organizadas, possui uma elevada resistência à hidrólise química e/ou enzimática, enquanto, a região de celulose amorfa, em que as microfibrilas estão desordenadas, as taxas de hidrólise são bem maiores (FENGEL; WEGENER, 1989). Portanto, a perda de celulose (que no caso mais severo chegou a 29%) provocada pelo pré-tratamento hidrotérmico deve corresponder à degradação da região de celulose amorfa.

Já para lignina foi possível observar uma solubilização relativamente baixa nas reações realizadas a 160 e 170 °C. Para as reações conduzidas a 180 °C, houve um aumento significativo na solubilização da lignina, porém nos maiores tempos de reação (40 e 50 minutos) a perda foi menor. A seletividade hemicelulose/lignina (L/H) das palhas pré-tratadas reduziu com o aumento da temperatura (severidade) do pré-tratamento (Tabela 10). Consequentemente, observou-se que a diminuição para a seletividade H/L refletiu o aumento de solubilização da hemicelulose (note que a solubilização de hemicelulose se elevou com o aumento da temperatura do pré-tratamento - Tabela 10). Isto, provavelmente, aconteceu pelo fato de а lignina sofrer reações de despolimerização/repolimerização e reações de condensação que limitam sua remoção (KUMAR et al., 2009a). Desta forma, uma etapa de deslignificação após o pré-tratamento da palha de cana se faz necessária.

É possível estabelecer correlações entre as perdas de cada componente com a severidade do pré-tratamento. A utilização desta correlação nos permite comparar, quantitativamente, diferentes métodos de pré-tratamento, por meio do valor de coeficiente angular da reta ou curva encontrada, e predizer comparativamente a eficiência de um pré-tratamento em relação a outros.

A correlação entre solubilização de componentes lignocelulósicos com a severidade do pré-tratamento revela que para a hemicelulose há um comportamento polinomial destas variáveis evidenciando que a partir de certo valor de severidade, maior será a solubilização deste componente (Figura 25).



Figura 25: Correlação entre fração hemicelulósica solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nota-se que é possível obter uma correlação aceitável entre severidade e a solubilização de hemicelulose. Esta correlação indica que a quantidade de hemicelulose removida no pré-tratamento hidrotérmico está intrinsicamente relacionada com a severidade. Para a hemicelulose, em valores de severidades acima de 3,1, há uma perda significativa deste componente, que pode quadruplicar em relação a condições de mais baixa severidade. Ou seja, tempo e temperatura influenciam diretamente na solubilização deste componente.

Assim como para a hemicelulose, pode-se dizer também que para a celulose o tempo e a temperatura de reação influenciam diretamente em sua solubilização. Uma baixa perda de celulose é encontrada para as condições R1 e R2, devido principalmente à baixa severidade do processo quando comparada as demais condições de pré-tratamento Resultados semelhantes, com baixa perda de celulose, para o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes condições de temperatura e tempo de reação foram reportados na literatura por Allen et al., (1996); Pérez et al., (2007); Cara et al., (2007).

Pelos resultados obtidos e correlacionados na Figura 26, observa-se que em severidades abaixo de 3,2 (como no caso das reações R1, R2 e R6) a despolimerização e consequente perda de celulose é baixa, ao passo que em severidades acima deste valor verifica-se uma perda significativa deste componente.



Figura 26: Correlação entre fração celulósica solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte Arquivo Pessoal.

Já para a lignina observa-se uma solubilização relativamente baixa, indicando que a palha pré-tratada contém uma alta quantidade deste componente, sendo necessária a inserção de uma etapa de deslignificação do material previamente a etapa de hidrólise enzimática, para minimizar o efeito de inibição da enzima pela lignina. Similarmente a hemicelulose e celulose, observa-se um comportamento polinomial entre a solubilização deste componente e a severidade do processo conforme mostrado na Figura 27:

Figura 27: Correlação entre fração de lignina solubilizada e o fator de severidade do pré-tratamento hidrotérmico.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Verifica-se que contrariamente ao que ocorre com a celulose e com a hemicelulose, em severidades maiores que 3,8 há uma menor solubilização da lignina.

É ainda possível estabelecer uma correlação entre a lignina insolúvel/solúvel em função da severidade do pré-tratamento, conforme mostrado na Figura 28:



Figura 28: Razão de lignina solúvel/insolúvel em função da severidade do pré-tratamento.

O gráfico evidencia que o aumento da severidade dificulta a remoção de lignina, já que é observado que em altas severidades tem-se uma maior quantidade de lignina insolúvel. Em severidades mais baixa, apesar de o material pré-tratado ainda apresentar lignina insolúvel em maior quantidade na sua composição, nota-se que há a diminuição da formação da lignina insolúvel e um aumento da lignina solúvel, que é constituída de pequenas frações ou ligações mais facilmente cliváveis.

## 5.1.3 Análises Físicas

#### 5.1.3.1 Difração de Raios-X da palha após pré-tratamento hidrotérmico

Fonte: Arquivo Pessoal.

Muitos estudos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumenta após as etapas de pré-tratamento, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO; TAN, 2002). Estudos de difração de raios-X foram realizados, e os resultados são mostrados no difratograma da Figura 29.

Figura 29: Difratograma da palha pré-tratada hidrotermicamente em todas as condições.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Com os dados extraídos do difratograma e utilizando as Equações 6, 7 e 8 apresentadas nos itens 4.8.1 e 4.8.1.1 da metodologia, foi possível montar a Tabela 11 a seguir, com dos dados de cristalinidade medida (Ic), cristalinidade espererada (Ice) e diminuição da cristalinidade (Dc).
Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
R1	45,41	65,33	19,92
R2	43,09	67,24	24,15
R3	43,38	67,12	23,74
R4	40,99	72,7	31,71
R5	47,18	71,04	23,86
R6	43,16	68,21	25,05
<b>R7</b>	42,34	68,83	26,49
<b>R8</b>	44,62	70,71	26,09
R9	42,79	72,53	29,74
R10	46,29	75,64	29,35
R11	48,94	77,91	28,97
R12	48,18	86,54	38,36
R13	49,21	86,76	37,55
R14	51,54	86,84	35,3
R15	50,22	86,33	36,11

Tabela 11: Diferenças entre índice de cristalinidade medido e o esperado, para obtenção do parâmetro de diminuição da cristalinidade da celulose.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Pode-se observar que para todas as condições de pré-tratamento adotadas ocorreu uma diminuição de pelo menos 20% da cristalinidade da celulose, exceto para a condição R1 (160°C, 10 min) porém chegou a um valor próximo. Para as reações a 170°C verificase uma acentuada diminuição de até 29,74% da cristalinidade. Já para as reações a 180°C observa-se uma diminuição significativa da cristalinidade, chegando a 38,4% na condição R 12 (180°C, 20 min). É possível observar também pelos dados da tabela que existe uma faixa de severidade do processo onde é possível se obter uma máxima diminuição da cristalinidade, e o aumento da severidade pode ocasionar em baixa transformação de celulose cristalina à amorfa. Observa-se uma diminuição máxima da cristalinidade de celulose em severidade de 3,7 (condição R12), e assim como para a lignina e celulose, esta mostra-se como uma severidade crítica, já que a celulose remanescente no material é mais cristalina e consequentemente mais dificilmente hidrolisada.

# 5.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas hidrotermicamente

As microscopias da Figura 30, 31 e 32 mostram as diferenças morfológicas apresentadas pela palha de cana após o processo de pré-tratamento. Observa-se que a palha in natura (INP) apresenta uma superfície lisa e compacta evidenciando a recalcitrância do material e pouca acessibilidade de reagentes e enzimas à matriz lignocelulósica. Para os materiais pré-tratados a temperatura de 160°C nota-se pouca modificação da estrutura morfológica. Para a reação R1 observam-se apenas fraturas na superfície da palha que pode estar mais associada ao processo de moagem do que ao pré-tratamento. Já para a condição R2 observa-se uma modificação maior da superfície com a exposição de poucas células parenquimáticas e poucas fibras isoladas. Similarmente ocorre para a condição R3 onde é possível observar tanto fibras quanto células de parênquima, além de fraturas causadas pelo processo de moagem, porém com uma superfície ainda pouco modificada. A condição R4 apresenta um isolamento das fibras e exposição de alguns feixes vasculares (F) e células de parênquima (P). A condição R5 apresenta uma exposição maior do parênquima e superfície mais modificada que as demais condições.

As amostras tratadas a 170°C apresentam características semelhantes as tratadas a 160°C, porém, quando comparadas, as amostras a 170°C apresentaram uma maior desestruturação das fibras, sendo a R10 a amostra que apresentou as maiores modificações nas fibras.



Figura 30: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 160°C nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 31: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 170°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x).

H170/20

H170/30



H170/40

500 um EEL - USP H170/50

D9.4 x200 500 um



Figura 32: Microscopias da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 180°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x).

Com exceção da amostra R11, as microscopias obtidas para as condições à 180°C apresentaram uma modificação morfológica da palha de cana, evidenciando que o aumento da severidade promove uma exposição das fibras devido à remoção dos componentes lignocelulósicos, principalmente hemicelulose e lignina. Além disso, observam-se apenas feixes vasculares evidenciando a fragilidade das células de parênquima ao processo de pré-tratamento. Observa-se que a condição R13 apresentou uma maior abertura dos feixes de fibras, que pode contribuir para as etapas subsequentes de deslignificação e aumentar a susceptibilidade das enzimas à celulose na hidrólise enzimática.

Em suma, a palha pré-tratada mostrou uma estrutura mais fragmentada e com aglomerações de várias fibras de celulose, de certa forma, ordenadas nas condições menos severas. Quando o material lignocelulósico é pré-tratado somente por água quente, a maioria das modificações no material ocorre na sua estrutura química provocada pela ação dos ácidos orgânicos liberados em altas temperaturas. No entanto, a micrografia da palha pré-tratada mostrou claramente que o pré-tratamento hidrotérmico também provoca alterações na estrutura morfológica do lignocelulósico.

# 5.1.4 Deslignificação Alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente

#### 5.1.4.1 Caracterização química das amostras deslignificadas

A Tabela 12 mostra a composição química da palha de cana in natura e pré-tratadas submetidas à deslignificação alcalina. Os resultados mostram a influência direta do processo de pré-tratamento sobre a etapa de deslignificação. Apesar do processo de deslignificação ter sido realizado em uma condição fixa, nota-se que o aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento promoveu um pequeno aumento do rendimento mássico. Comparando-se os materiais pré-tratados com o material in natura apenas submetido à deslignificação (IND) observa-se uma diminuição significativa de celulose e lignina.

Amostras	Rendimento (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Total (%)
R1D	65,01	$25,63 \pm 0,10$	$58,50 \pm 0,10$	$11,34 \pm 0,15$	$3,96 \pm 0,10$	99,43
R2D	66,03	$24,35 \pm 0,10$	$58,26 \pm 0,15$	$13,50 \pm 0,15$	$3,40 \pm 0,10$	99,51
R3D	64,61	$25,23 \pm 0,15$	$54,25 \pm 0,13$	$17,99 \pm 0,18$	$3,95 \pm 0,15$	101,42
R4D	62,92	$22,09 \pm 0,22$	$53,21 \pm 0,11$	$17,54 \pm 0,20$	$3,46 \pm 0,15$	96,30
R5D	65,26	$20,13 \pm 0,20$	$53,60 \pm 0,10$	$21,38 \pm 0,10$	$3,25 \pm 0,20$	98,36
R6D	66,49	$24,98 \pm 0,10$	$56,89 \pm 0,12$	$12,75 \pm 0,17$	$3,78 \pm 0,21$	98,40
R7D	66,11	$25,12 \pm 0,15$	$56,01 \pm 0,06$	$13,90 \pm 0,15$	$3,70 \pm 0,14$	98,73
R8D	65,43	$23,81 \pm 0,09$	$54,34 \pm 0,15$	$16,71 \pm 0,27$	$3,52 \pm 0,15$	98,38
R9D	64,09	$22,47 \pm 0,12$	$52,27 \pm 0,24$	$19,55 \pm 0,11$	$3,39 \pm 0,10$	97,68
R10D	62,92	$20,69 \pm 0,08$	$51,80 \pm 0,17$	$20,63 \pm 0,15$	$3,40 \pm 0,08$	96,52
R11D	65,31	$12,86 \pm 0,20$	$53,89 \pm 0,20$	$27,57 \pm 0,10$	$3,75 \pm 0,20$	98,07
R12D	67,37	$10,18 \pm 0,15$	$67,31 \pm 0,15$	$16,90 \pm 0,14$	$2,05 \pm 0,15$	96,44
R13D	68,24	$7,72 \pm 0,10$	$69,03 \pm 0,15$	$15,97 \pm 0,12$	$4,85 \pm 0,13$	97,57
R14D	68,27	$4,78 \pm 0,13$	$69,85 \pm 0,23$	$20,24 \pm 0,12$	$5,94 \pm 0,15$	100,81
R15D	68,78	$4,27 \pm 0,15$	$68,30 \pm 0,21$	$18,22 \pm 0,13$	$5,37 \pm 0,20$	96,16
IND*	57,34	$29,79 \pm 0,15$	$60,62 \pm 0,30$	$10,93 \pm 0,20$	$0,76 \pm 0,20$	102,10

Tabela 12: Composição química das palhas pré-tratadas hidrotermicamente após a deslignificação.

115

Para fins comparativos, a Tabela 13 apresenta os resultados de solubilização dos componentes macromoleculares.

Amostras	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)
R1D	41,72 (53,29) <sup>1</sup>	- $(18,75)^1$	75,25 (78,59) <sup>1</sup>
R2D	44,58 (57,08) <sup>1</sup>	1,24 (21,80) <sup>1</sup>	69,88 (75,36) <sup>1</sup>
R3D	39,94 (57,59) <sup>1</sup>	9,86 (30,54) <sup>1</sup>	61,53 (68,70) <sup>1</sup>
R4D	51,47 (64,45) <sup>1</sup>	20,51 (34,78) <sup>1</sup>	56,49 (70,77) <sup>1</sup>
R5D	52,54 (65,82) <sup>1</sup>	15,96 (30,69) <sup>1</sup>	47,41 (62,41) <sup>1</sup>
R6D	41,29 (56,63) <sup>1</sup>	4,29 (24,77) <sup>1</sup>	71,10 (77,07) <sup>1</sup>
R7D	40,09 (57,35) <sup>1</sup>	7,15 (27,57) <sup>1</sup>	68,44 (75,56) <sup>1</sup>
R8D	45,98 (61,62) <sup>1</sup>	13,22 (31,46) <sup>1</sup>	61,90 (71,34) <sup>1</sup>
R9D	47,35 (65,10) <sup>1</sup>	20,28 (38,16) <sup>1</sup>	56,65 (68,55) <sup>1</sup>
R10D	49,31 (69,20) <sup>1</sup>	25,64 (41,25) <sup>1</sup>	54,39 (68,19) <sup>1</sup>
R11D	$61,22(80,32)^1$	22,02 (37,16) <sup>1</sup>	38,43 (56,30) <sup>1</sup>
R12D	64,62 (82,32) <sup>1</sup>	9,55 (28,91) <sup>1</sup>	58,79 (75,73) <sup>1</sup>
R13D	66,01 (89,56) <sup>1</sup>	6,29 (28,95) <sup>1</sup>	61,76 (77,64) <sup>1</sup>
R14D	66,77 (93,98) <sup>1</sup>	5,24 (29,65) <sup>1</sup>	54,88 (72,64) <sup>1</sup>
R15D	67,01 (94,53) <sup>1</sup>	6,09 (33,39) <sup>1</sup>	63,02 (75,83) <sup>1</sup>

Tabela 13: Solubilização dos componentes da palha de cana pré-tratada após deslignificação (%).

<sup>1</sup> Valores em parênteses representam as perdas/solubilizações totais associadas ao pré-tratamento hidrotérmico e à etapa de deslignificação. Fonte: Arquivo Pessoal.

Além da lignina, os polissacarídeos também sofreram degradação durante a deslignificação. Considerando as solubilizações totais, para a condição mais severa (180 °C, 50 min), aproximadamente 95% das hemiceluloses foram removidas, restando apenas 4,5% na polpa. Já celulose apresentou um conteúdo de 68% na polpa, porém 33% da celulose foram degradadas, o que não é favorável para conversão de palha de cana-de-açúcar a etanol.

Notou-se, também, a influência do pré-tratamento na etapa de deslignificação (Tabela 13). Para as palhas pré-tratadas a 160 e a 170°C, a solubilização de hemicelulose e celulose foram aumentando com o tempo de pré-tratamento, ou seja, quanto maior foi o tempo de reação de pré-tratamento, maior foi a solubilização dos açúcares na etapa de deslignificação, mostrando que a etapa de pré-tratamento causou mudanças na estrutura do material, facilitando a ação do agente deslignificante. O mesmo aconteceu para as palhas pré-tratadas a 180 °C em relação as hemiceluloses. Já com relação a celulose, a solubilização se manteve praticamente constante, exceto para as condições das amostras R3D, R4D e R5D. Esta alta remoção de hemicelulose é um fator importante quando se pretende obter etanol celulósico, visto que, além do teor de lignina, outro componente que interfere de forma negativa na ação das celulases é a presença de hemicelulose. Esse componente forma uma barreira física sobre a celulose impedindo o acesso das enzimas celulolíticas. Assim, devido à alta solubilização deste componente, espera-se que o efeito da hemicelulose sobre as enzimas seja, praticamente, insignificante.

Outro fator importante observado foi solubilização da celulose na deslignificação da palha pré-tratada. Esta perda pode estar associada ao fato de o material ter um tipo de estrutura morfológica diferente das madeiras folhosas e coníferas. Oliveira (2012) identificou células de parênquima ao redor da superfície das fibras de celulose de palha de cana. Estas células também possuem celulose em sua composição química, porém é mais susceptível aos agentes químicos e/ou enzimáticos do que a celulose presente numa fibra. Desta forma, acredita-se que estas células tenham sido degradadas, ocasionando perdas significativas de celulose.

Com relação à lignina, foi possível observar uma alta solubilização. Para a condição mais severa (180 °C, 50 min), foi removido aproximadamente 63 % de lignina (Tabela 13). Porém a condição em que houve uma maior remoção foi a R1 (160 °C, 10 min). Para todas as amostras deslignificadas, o teor de lignina encontrado foi inferior ao determinado para palha de cana in natura, de 28,56 % (Tabela 8).

Analisando as composições químicas das palhas pré-tratada hidrotermicamente e deslignificadas, notou-se que todas elas apresentaram um conteúdo de lignina residual na faixa de aproximadamente 17 - 20% (Tabela 12), com exceções das condições menos severas R1D e R2D. Porém, é possível destacar que o agente de deslignificação (NaOH) atingiu o seu limite de solubilização de fragmentos de lignina susceptíveis aos álcalis, evento comum em etapas de branqueamento de polpas celulósicas, as quais os agentes de deslignificação são alternados para conseguir reduzir cada vez mais o conteúdo de lignina

residual na polpa a ser branqueada (FENGEL; WEGENER, 1989). A avaliação das solubilizações totais de lignina (soma da solubilização associada à etapa de pré-tratamento com a da extração alcalina) revela esse efeito, pois as palhas de pré-tratada deslignificadas apresentaram solubilizações totais de lignina em torno de no máximo 78% (R1D – 160 °C, 10 min), e depois numa condição uma pouco mais severa o máximo de solubilização foi de 58 % (R11D – 180°C, 10 min). Se a avaliação da etapa de deslignificação for feita apenas em relação a temperatura do pré-tratamento, por exemplo, nota-se que para cada temperatura houve um tempo em que ocorreu máxima remoção de lignina.

#### 5.1.5Análises físicas

# 5.1.5.1 Difração de Raios-X das palhas pré-tratadas deslignificadas

A Figura 33 apresenta os difratogramas obtidos para as amostras delignificadas de palha.





Fonte: Arquivo Pessoal.

Utilizando os dados do difratograma e as equações dos itens 4.8.1 e 4.8.1.1, foi construída a Tabela 14, com os dados a seguir:

Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
R1D	60,43	103,55	43,12
R2D	54,97	100,20	45,22
R3D	58,07	93,46	35,39
R4D	53,34	84,64	31,30
R5D	56,79	86,62	29,83
R6D	57,73	96,45	38,72
R7D	59,46	94,10	34,64
R8D	61,37	88,87	27,50
R9D	62,58	83,34	20,76
R10D	60,92	79,18	18,26
R11D	59,91	79,99	20,08
R12D	51,2	89,94	38,74
R13D	54,93	92,00	37,07
R14D	55,28	93,00	37,72
R15D	59,18	91,49	32,31

Tabela 14: Diminuição da cristalinidade de polpa de palha de cana pré-tratada hidrotermicamente.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Pode-se observar que a deslignificação promoveu uma diminuição da cristalinidade de celulose de palha. Para a amostra apenas deslignificada observa-se uma pequena diminuição da cristalinidade ( $Dc_{IND} = 8,03$ ) evidenciando que apesar de uma grande solubilização da celulose, grande parte desta celulose solubilizada era amorfa restando no material majoritariamente celulose cristalina, que é mais dificilmente hidrolisada pelas enzimas na hidrólise enzimática. Além disso, pode-se afirmar que o pré-tratamento promove uma modificação significativa que influencia nas etapas posteriores de tratamento

da biomassa, como a deslignificação. Observa-se que pela mudança morfológica causada pelo pré-tratamento foi possível obter uma expressiva diminuição da cristalinidade da celulose após a deslignificação, que não é observada quando a biomassa não sofre nenhuma modificação anterior à deslignificação, como no caso da amostra IND (palha in natura deslignificada).

Comparando-se a diminuição da cristalinidade em função dos tratamentos realizados pode-se afirmar que após a deslignificação a celulose remanescente é menos cristalina quando comparada a celulose submetida ao processo de pré-tratamento ou a biomassa in natura, evidenciando que a combinação de tratamentos pode contribuir de forma positiva para minimização de componentes inibidores e também para aumentar a susceptibilidade do material à hidrolise enzimática.

# 5.1.5.2 Microscopia eletrônica de varredura das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e deslignificadas

As Figuras 34, 35 e 36 mostram as modificações estruturais ocorridas nas palhas pré-tratadas após deslignificação alcalina e também na palha in natura deslignificada. Após o pré-tratamento seguido de deslignificação, as fibras se encontram bastante fragmentadas e com poucas aglomerações. Já para a palha que apenas passou pela etapa de remoção de lignina (IND), as fibras se encontram bem modificadas, revelando uma exposição das fibras decorrente apenas do processo de deslignificação evidenciando a influência deste tratamento sobre a biomassa. No entanto, ainda pode-se perceber um certo grau de agrupamento (organização) das fibras.

Quando a palha de cana é submetida ao processo de pré-tratamento, ocorre a quebra da estrutura lignocelulósica, e uma grande fração das hemiceluloses é removida, aumentando a acessibilidade às fibras de celulose. Após a etapa de deslignificação alcalina é possível observar grandes quantidades de fibras celulósicas livres, mostrando que a etapa de pré-tratamento seguida da deslignificação pode proporcionar uma melhor disponibilidade das fibras celulósicas para processos subsequentes, como por exemplo, a etapa de sacarificação, visto que houve um aumento da área superficial do material.



Figura 34: Microscopias das polpas de palha in natura e pré-tratadas hidrotermicamente a 160°C nos tempos de 10, 20, 30, 40 e 50 min (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 35: Microscopias das polpas palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 170°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 36: Microscopias das polpas palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente a 180°C nos tempos de 10, 20, 30 40 e 50 min (aumento de 200x).

Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes amostras deslignificadas submetidas previamente ao pré-tratamento, sendo que para todas as condições observa-se, majoritariamente a presença de feixes vasculares e fibras bastante expostas. Assim como no pré-tratamento em condições mais severas, pode-se afirmar que o parênquima apresenta uma fragilidade em função do processo de deslignificação perdendo totalmente suas características estruturais. Portanto o material deslignificado, submetido à hidrólise enzimática é proveniente, em grande maioria, de feixes vasculares.

# 5.1.6 Digestibilidade enzimática da palha pré-tratada e após deslignificação

A conversão de celulose à glicose foi avaliada após a hidrólise enzimática dos materiais in natura, somente pré-tratado e materiais submetidos à pré-tratamento seguido de deslignificação.

As condições do pré-tratamento hidrotérmico podem tanto influenciar a etapa de deslignificação como também a etapa de sacarificação enzimática da celulose. Mas, para isso, a etapa de deslignificação deve ser realizada na mesma condição para normalizar o efeito da extração de lignina sobre a hidrólise enzimática da celulose e possibilitar a investigação de qual a melhor condição de pré-tratamento para se obter elevados rendimentos de hidrólise enzimática. Os dados da conversão enzimática de celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e das polpas obtidas após a extração alcalina. As condições do pré-tratamento hidrotérmico podem tanto influenciar a etapa de deslignificação como também a etapa de sacarificação enzimática da celulose. Mas, para isso, a etapa de deslignificação deve ser realizada na mesma condição para normalizar o efeito da extração de lignina sobre a hidrólise enzimática da celulose e possibilitar a investigação de qual a melhor condição de pré-tratamento para se obter elevados rendimentos de hidrólise enzimática. Os dados da conversão enzimática da celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e das polpas obtidas após a extração alcalina o efeito da extração de lignina sobre a hidrólise enzimática da celulose e possibilitar a investigação de qual a melhor condição de pré-tratamento para se obter elevados rendimentos de hidrólise enzimática. Os dados da conversão enzimática de celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e das polpas obtidas após a extração alcalina se encontram na Tabela 15.

Para cada temperatura estudada no pré-tratamento hidrotérmico, foi avaliado a influência dos tempos de reação na etapa de sacarificação. Para a temperatura de 160 °C, a menor conversão enzimática foi obtida para a palha pré-tratada por 10 minutos (26,16 %) e

a maior conversão encontrada foi para a palha pré-tratada por 50 minutos (28,89 %). O mesmo fato aconteceu na palha pré-tratada à temperatura de 170°C com a menor conversão encontrada para o tempo de 10 minutos (30,18%) e a maior para o tempo de 50 minutos (42,81%), e também para as amostras pré-tratadas à 180 °C, sendo a menor conversão encontrada no tempo de 10 minutos (44,04 %) e a maior conversão se deu tempo de 50 minutos (67,49 %). Portanto, fica evidente que o tempo de reação influência na conversão enzimática, pois quanto maior o tempo de reação, maior foi a conversão da celulose. Também é possível notar que a temperatura do pré-tratamento exerce influência na etapa de sacarificação, pois para o mesmo tempo de reação, apenas variando a temperatura, a conversão da celulose foi maior na palha pré-tratada a 180 °C.

A Figura 37 a seguir mostra o efeito da severidade (Log (Ro)) do pré-tratamento hidrotérmico na conversão enzimática da celulose da palha de cana:



Figura 37: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na conversão enzimática.

Fonte: Arquivo Pessoal.

É possível observar ao se linearizar o efeito de temperatura e tempo através do cálculo de severidade (Equação 1), um efeito linear. Deste modo, fica claro o efeito do prétratamento na conversão enzimática do material. Quanto maior a severidade do prétratamento, maior a conversão enzimática encontrada. O aumento da temperatura e do tempo de pré-tratamento pode proporcionar cada vez mais alterações da estrutura supramolecular dos lignocelulósicos (CUNHA, 1999; OLIVEIRA, 2010; SENDELIUS, 2005; SILVA, 2009). Na condição mais branda avaliada, a temperatura do pré-tratamento hidrotérmico pode ter sido baixa para provocar alterações na estrutura supramolecular do lignocelulósico que facilitam o acesso das enzimas celulolíticas. Enquanto nas condições mais severas, a remoção de parte da hemicelulose e lignina tornou o material mais acessível às enzimas celulolíticas, facilitando a conversão da celulose.

Na Tabela 15 encontram-se também os dados da conversão enzimática da palha submetida ao pré-tratamento e também das polpas obtidas.

Palha Pré-	Conversão da	Polpa de palha	Conversão da
tratada	celulose (%)	pré-tratada	celulose (%)
IN	$19,24 \pm 0,30 (19,24)^2$	IND	$55,74 \pm 0,34 (35,24)^2$
R1	$26,16 \pm 0,37 (21,16)^2$	R1D	$71,45 \pm 0,36 (58,05)^2$
R2	$27,36 \pm 0,32 (21,66)^2$	R2D	$78,99 \pm 0,30 (61,77)^2$
R3	$28,31 \pm 0,24 (21,82)^2$	R3D	$82,90 \pm 0,25 (57,58)^2$
<b>R4</b>	$27,53 \pm 0,25 (22,59)^2$	R4D	$88,30 \pm 0,27 (57,59)^2$
R5	$28,89 \pm 0,30 (23,83)^2$	R5D	$89,55 \pm 0,30 (62,07)^2$
<b>R6</b>	$30,18 \pm 0,22 (23,72)^2$	R6D	$86,39 \pm 0,25 (65,00)^2$
<b>R7</b>	$34,66 \pm 0,31 (27,04)^2$	R7D	$88,57 \pm 0,38 (64,15)^2$
<b>R8</b>	$37,50 \pm 0,18 (29,60)^2$	R8D	$91,30 \pm 0,40 (62,58)^2$
<b>R9</b>	$40,03 \pm 0,26 (31,05)^2$	R9D	$94,30 \pm 0,25 (58,32)^2$
R10	$42,81 \pm 0,19 (33,82)^2$	R10D	$95,10 \pm 0,30 (55,87)^2$
R11	$44,04 \pm 0,12 (35,49)^2$	R11D	<b>98,47</b> $\pm$ 0,15 (61,88) <sup>2</sup>
R12	$50,21 \pm 0,20 (39,47)^2$	R12D	$86,74 \pm 0,20 \ (61,66)^2$
R13	$54,96 \pm 0,21 (41,67)^2$	R13D	$84,26 \pm 0,22 (59,87)^2$
R14	$64,89 \pm 0,23 (48,17)^2$	R14D	$82,69 \pm 0,30 (58,17)^2$
R15	$67,49 \pm 0,33 (47,86)^2$	R15D	$81,56 \pm 0,32 (54,33)^2$

Tabela 15: Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e das respectivas amostras pré-tratadas deslignificadas obtidas.

<sup>2</sup>Conversão corrigida pelas perdas de celulose durante o processo.

Para as amostras deslignificadas de palha pré-tratadas na temperatura de 160 e 170°C, observa-se que a conversão da celulose se torna maior à medida que se aumenta o tempo do pré-tratamento, chegando a uma conversão máxima de 89,55 % para a amostra R5D e 95,10% para a amostra R10D. Quando comparado à conversão da palha in natura (IN), in natura deslignificada (IND) e pré-tratada, confirma-se a importância da etapa de pré-tratamento e deslignificação, pois para as amostras in natura e in natura deslignificada, a conversão encontrada foi de 19,24 % e 55,74 %, respectivamente. Após o pré-tratamento, a conversão enzimática aumenta, chegando a, aproximadamente, 28,9 % para a condição mais severa, na temperatura de 160 °C (amostra R5). Após a deslignificação, a conversão chega a quase 90 % (amostra R5D), mostrando que a remoção da lignina é um ponto muito importante no momento da hidrólise enzimática, uma vez que a remoção dessa torna a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas (GREGG; SADDLER, 1996).

Já para as amostras deslignificadas e pré-tratadas na temperatura de 180 °C, observou-se o contrário ocorrido para as polpas de palha pré-tratada a 160 °C. À medida que se aumenta o tempo do pré-tratamento, há uma queda na conversão de celulose. Para a condição da amostra R11D a conversão encontrada foi de 98,5 %, enquanto que para a condição da amostra R15D a conversão foi de 81,6 %. Outro fato interessante foi que a amostra R11D possui o maior teor de lignina residual quando comparado com as outras condições das polpas pré-tratadas a 180 °C (vide Tabela 12). Ou seja, nesta condição a presença da lignina não influenciou negativamente a conversão enzimática. Desta forma, um ponto importante a ser considerado é em que lugar esta lignina se encontra na fibra da palha da cana. Por isso, é de extrema importância estudar a morfologia deste material a cada etapa do processo de obtenção do etanol de segunda geração. A análise dos licores de pré-tratamentos ou de deslignificação da palha de cana poderia dar mais informações sobre o efeito dessa lignina em relação às celulases. Entretanto, este não é o objetivo maior do trabalho.

Outro ponto importante é o cálculo da conversão enzimática corrigido pelas perdas de celulose após o processo de pré-tratamento e após a deslignificação. Para todas as condições avaliadas observa-se que a conversão enzimática do material pré-tratado é inferior à obtida para os mesmos materiais após o processo de deslignificação. A combinação de tratamentos pode melhorar a conversão enzimática em até 65%; e, em casos menos significativos este aumento chega a 35%, evidenciando a eficácia dos pré-tratamentos, devido principalmente a remoção de lignina e hemicelulose, obtendo-se um material remanescente com maior porcentagem mássica de celulose quando comparado ao

material apenas pré-tratado. Portanto pode-se afirmar que a remoção de lignina e hemicelulose pelas etapas de pré-tratamento e deslignificação provocam uma extensa mudança na estrutura morfológica da biomassa tornando-a mais acessível às enzimas celulolíticas e proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão em glicose e consequentemente em etanol.

Os resultados revelam que a condição R6 (170°C, 10 min) apresenta maior conversão de celulose à glicose, mostrando-se como promissora para o processamento do bagaço a etanol, porém, ao pensar em economia energética e levando em consideração valores próximos de conversão enzimática, a condição R2 (160°C, 20min) também pode ser considerada promissora para obtenção de etanol 2G.

#### 5.2 Pré-tratamento por ultrassom

# 5.2.1 Análise do hidrolisado hemicelulósico

Os ensaios de pré-tratamento por ultrassom foram efetuados seguindo a metodologia descrita no item 4.2. Foram avaliados 3 meios de reação diferentes: meio alcalino (NaOH 1% (m/v)), meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (m/v)) e o meio controle (com apenas água destilada). Para cada meio foi variado o tempo de reação (1 a 30 minutos) e mantida constante a consistência de 10% (m/v).

As tabelas 16, 17 e 18 fornecem a composição dos hidrolisados obtidos após o prétratamento por ultrassom, em cada condição estudada no presente trabalho.

	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético
OH 1	0,0159	0,0256	0,0089	0,0097
<b>OH 2</b>	0,0198	0,0266	0,0094	0,0099
<b>OH 3</b>	0,0141	0,0248	0,0085	0,0083
<b>OH 4</b>	0,0147	0,0302	0,0076	0,0095
ОН 5	0,0186	0,0452	ND	ND
<b>OH 6</b>	0,0109	0,0234	ND	ND
<b>OH 7</b>	0,01028	0,0209	ND	ND

Tabela 16: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom em meio ALCALINO. A quantidade de cada componente está expressa em  $g/L (\pm 0,01)$ .

\*ND – não detectado;

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 17: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom em meio ÁCIDO. A quantidade de cada componente está expressa em g/L ( $\pm$  0,01).

	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético
H 1	0,0244	0,0253	0,0107	0,0101
Н 2	0,0173	0,0421	0,0099	0,0142
Н3	0,0109	0,0398	0,0104	0,0119
H 4	0,0122	0,0211	0,0122	0,0113
Н 5	0,0115	0,0245	ND	0,0098
H 6	0,0037	0,0194	ND	ND
H 7	0,0048	0,0187	ND	ND

\*ND – não detectado;

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 18: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom (CONTROLE). A quantidade de cada componente está expressa em g/L ( $\pm$  0,01).

	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético
C 1	0,0162	0,0155	0,0021	0,0077
C 2	0,0179	0,0169	0,0010	0,0092
C 3	0,0166	0,0129	0,0022	0,0099
C 4	0,0171	0,0135	ND	ND
C 5	0,0117	0,0133	ND	ND
C 6	0,0104	0,0149	ND	ND
C 7	0,0109	0,0144	ND	ND

\*ND – não detectado;

Em todas as condições de reação, os hidrolisados não apresentaram HMF e furfural, evidenciando que, o tratamento por ultrassom realizado nas condições descritas anteriormente, não foram severas a ponto de degradar os açúcares liberados no prétratamento, corroborando com dados obtidos da literatura (KUNAVER et al., 2012). Observou-se, também, que independente do meio de reação (alcalino, ácido ou água), houve uma solubilização preferencial de hemicelulose. Isso ocorre devido às hemiceluloses apresentarem caráter amorfo, grande polidispersidade e grau de polimerização bastante inferior ao da celulose nativa. Todas estas características fazem com que esta fração seja muito mais susceptível ao pré-tratamento do que a fração celulósica.

A pós-hidrólise de todos os hidrolisados obtidos foi realizada, porém não se notou uma alteração significativa na concentração de cada componente, como é possível observar nas tabelas 19, 20 e 21 a seguir:

Tabela 19: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO ALCALINO). A quantidade de cada componente está expressa em g/L ( $\pm 0,01$ ).

	Glicose	Xilose	Arabinose
OH 1	0,0162	0,0212	0,0077
OH 2	0,0188	0,0255	0,0069
ОН 3	0,0133	0,0210	0,0072
<b>OH 4</b>	0,0112	0,0322	ND
ОН 5	0,0156	0,0408	ND
<b>OH 6</b>	0,0110	0,0229	ND
<b>OH 7</b>	0,0029	0,0194	ND

\*ND – não detectado;

	Glicose	Xilose	Arabinose
H 1	0,0212	0,0222	0,0093
H 2	0,0169	0,0394	0,0087
Н3	0,0110	0,0311	0,0095
H 4	0,0115	0,0197	ND
Н 5	0,0109	0,0216	ND
H 6	0,0074	0,0113	ND
H 7	0,0055	0,0161	ND

Tabela 20: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO ÁCIDO). A quantidade de cada componente está expressa em  $g/L (\pm 0,01)$ .

\*ND – não detectado;

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 21: Composição dos hidrolisados após pré-tratamento por ultrassom e pós-hidrólise (MEIO CONTROLE). A quantidade de cada componente está expressa em  $g/L (\pm 0,01)$ .

	Glicose	Xilose	Arabinose
C 1	0,0151	0,0148	0,0033
C 2	0,0144	0,0157	0,0015
C 3	0,0147	0,0120	0,0029
C 4	0,0129	0,0130	ND
C 5	0,0107	0,0117	ND
C 6	0,0110	0,0115	ND
C 7	0,0097	0,0125	ND

\*ND – não detectado;

Fonte: Arquivo Pessoal.

Nas tabelas de 22 a 27 estão mostrados os resultados da caracterização do hidrolisados em função da massa dos açúcares gerados e, por consequência, das perdas reais de massa de hemicelulose e celulose, uma vez que se considera que toda a massa perdida esteja principalmente solubilizada no hidrolisado.

Para gerar os resultados em massa, multiplicou-se o volume do hidrolisado (em litros) pela concentração de cada açúcar, que se encontram nas tabelas 17, 18 e 19 (já na concentração em g/L).

Para calcular a perda real de hemicelulose, somaram-se as massas de xilose, arabinose e ácido acético. E para a perda real de celulose, somaram-se as massas de glicose. A perda teórica de hemicelulose e de celulose foi calculada levando-se em consideração a perda (solubilização) de componente (Tabela 29), os valores de composição do material (Tabela 28) e massa inicial e final do pré-tratamento.

Amostras	Clicopa (g)	Perda real de	Perda Teórica de
	Gilcose (g)	celulose (g)	celulose (g)
OH 1	0,0041	0,0041	1,2835
<b>OH 2</b>	0,0052	0,0052	1,1238
ОН 3	0,0033	0,0033	1,8278
<b>OH 4</b>	0,0036	0,0036	1,6526
ОН 5	0,0048	0,0048	1,7693
<b>OH 6</b>	0,0027	0,0027	1,7974
<b>OH 7</b>	0,0027	0,0027	2,0008

Tabela 22: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ALCALINO.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 23: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ALCALINO.

Amostros	Xilose (g)	Arabinose	Ác. Acético	Perda Real de	Perda Teórica de
Amostras		<b>(g</b> )	<b>(g)</b>	Hemic. (g)	Hemicelulose (g)
OH 1	0,0066	0,0023	0,0025	0,0113	1,6302
<b>OH 2</b>	0,0070	0,0025	0,0026	0,0121	1,8372
<b>OH 3</b>	0,0058	0,0020	0,0020	0,0098	1,5274
<b>OH 4</b>	0,0075	0,0019	0,0024	0,0120	1,5100
<b>OH 5</b>	0,0117	ND	ND	0,0118	1,8579
<b>OH 6</b>	0,0057	ND	ND	0,0058	1,4449
<b>OH 7</b>	0,0055	ND	ND	0,0055	1,6104

\*ND – Não detectado.

Amostras	Glicose (g)	Perda real de celulose (g)	Perda Teórica de celulose (g)
H 1	0,0053	0,0053	2,7689
H 2	0,0046	0,0046	2,2976
Н3	0,0029	0,00294	0,9817
H 4	0,0032	0,0032	1,0068
Н 5	0,0029	0,0029	1,3150
H 6	0,0010	0,0010	0,5712
H 7	0,0012	0,0012	0,6810

Tabela 24: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ÁCIDO.

\*ND - Não detectado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 25: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio ÁCIDO.

Amostras	Xilose (g)	Arabinose (g)	Ác. Acético (g)	Perda Real de Hemicel. (g)	Perda Teórica de Hemicelulse (g)
H 1	0,0054	0,0001	0,0022	0,0077	1,5291
H 2	0,01115	0,0002	0,0038	0,01506	2,2835
Н3	0,0108	0,0001	0,0032	0,0141	2,5496
H 4	0,0056	0,0001	0,0030	0,0087	1,4698
Н 5	0,0063	ND	0,0025	0,0088	1,6646
H 6	0,0054	ND	ND	0,0054	1,2716
H 7	0,0049	ND	ND	0,0049	1,1470

\*ND - Não detectado.

Amostros	Clicoso (g)	Perda real de	Perda Teórica de	
Amostias	Gilcose (g)	celulose (g)	celulose (g)	
C 1	0,0043	0,0043	1,1756	
C 2	0,0047	0,0047	1,3074	
C 3	0,0049	0,0049	1,2838	
C 4	0,0039	0,0039	1,0413	
C 5	0,0032	0,0032	1,0694	
C 6	0,0027	0,0027	1,0562	
C 7	0,0029	0,0029	1,2439	

Tabela 26: Análise da perda de massa de celulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio CONTROLE.

\*ND – Não detectado. Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 27: Análise da perda de massa de hemicelulose em função das massas dos açúcares solubilizados nos hidrolisados obtidos após pré-tratamento com ultrassom meio CONTROLE.

Amostras	Xilose (g)	Arabinose (g)	Ác. Acético (g)	Perda Real de Hemicel. (g)	Perda Teórica de Hemicel. (g)
C 1	0,0041	0,0006	0,0020	0,0067	1,2092
C 2	0,0045	0,0003	0,0024	0,0072	1,5485
C 3	0,0039	0,0007	0,0030	0,0075	1,2041
C 4	0,0032	ND	ND	0,0031	1,3308
C 5	0,0036	ND	ND	0,0036	1,1309
C 6	0,0039	ND	ND	0,0039	0,9929
C 7	0,0038	ND	ND	0,0038	1,4775

\*ND - Não detectado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Os resultados das tabelas acima mostram que a perda real, tanto de celulose quanto de hemicelulose, foi muito menor que a perda teórica determinada. Uma das hipóteses para o ocorrido é que na degradação da celulose ocorreu a formação de oligômeros, e não de monômeros (glicose) ou dímeros (celobiose), sendo que o mesmo aconteceu para a hemicelulose. Todavia, após a pós-hidrólise não foi verificado o aumento da concentração

de monômeros. Desta forma, outra hipótese válida para justificar este resultado seria o fato dos compostos mais voláteis terem se vaporizado durante o pré-tratamento, o que explicaria a grande diferença entre a perda real e teórica.

### 5.2.2 Composição química das amostras pré-tratadas por ultrassom

Na Figura 38 se encontra material pré-tratado (celulignina) em todas as condições avaliadas. Nota-se que o pré-tratamento por ultrassom não provocou alterações macroscópicas significativas na palha de cana, pois tanto o material pré-tratado como o in natura apresentaram o mesmo aspecto visual. Zhang et al., (2008) também notaram que a irradiação de ondas ultrassonoras não provocou mudanças morfológicas no material lignocelulósico (no caso, corn stover). Os autores explicaram que a energia da vibração ultrassônica é muito baixa para gerar mudanças na estrutura do material lignocelulósico. Em função disso, acredita-se que os efeitos do pré-tratamento por ultrassom ocorreram em escala microscópica, como, por exemplo, erosão da superfície das fibras de celulose (AIMIN et al., 2005) ou clivagem das ligações da lignina e hemicelulose (KADIMALIEV et al., 2003; YU et al., 2009).

Figura 38: Fotos da palha de cana in natura e pré-tratada por ultrassom.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Na Tabela 28 a seguir, encontram-se os valores de rendimentos bem como a caracterização química da palha in natura e após o pré-tratamento por ultrassom nas diferentes condições avaliadas.

As análises do rendimento da etapa de pré-tratamento corroboraram com o efeito do ultrassom sobre a morfologia do material lignocelulósico. Somente uma fração consideravelmente pequena do material in natura foi solubilizada, apresentando rendimentos de reação superiores a 80%. A solubilização dos componentes macromoleculares em outros tipos de pré-tratamento atinge valores superiores a 30% (WYMAN et al., 2005).

É possível observar também que, independentemente do meio em que o prétratamento foi realizado (meio ácido, alcalino ou com água apenas), os rendimentos ficaram próximos, em torno de 86%. Notou-se também que quanto maior foi o tempo de reação, menores foram os rendimentos. Desta forma, o tempo de exposição à radiação ultrassônica deve ser considerado um fator importante.

Pela análise composicional também é possível observar que, independente dos meios reacionais e do tempo de reação, a por centagem de celulose, hemicelulose e lignina são valores muito próximos uns dos outros. A exceção está nas amostras tratadas em meio ácido para o percentual de lignina, em que os valores são ligeiramente superiores, quando comparado com outras amostras, em meio alcalino e em meio aquoso.

Amostra	Rendimento	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Extrativos	Total (%)
	(%)					(%)	
IN	100,00	$29,57 \pm 0,10$	$38,82 \pm 0,10$	$28,55 \pm 0,15$	$3,35 \pm 0,10$	$4,58 \pm 0,10$	104,87
OH 1	80,28	$28,69 \pm 0,12$	$41,98 \pm 0,15$	$28,29 \pm 0,20$	$3,16 \pm 0,15$	-	102,12
<b>OH 2</b>	82,13	$27,04 \pm 0,15$	$41,81 \pm 0,25$	$27,89 \pm 0,15$	$3,42 \pm 0,10$	-	100,16
<b>OH 3</b>	82,22	$28,52 \pm 0,13$	$38,34 \pm 0,12$	$29,28 \pm 0,15$	$3,85 \pm 0,15$	-	99,99
<b>OH 4</b>	82,54	$28,49 \pm 0,19$	$39,04 \pm 0,18$	$29,32 \pm 0,10$	$3,33 \pm 0,21$	-	100,18
<b>OH 5</b>	81,72	$27,07 \pm 0,15$	$38,86 \pm 0,15$	$28,81 \pm 0,15$	$3,38 \pm 0,16$	-	98,12
<b>OH 6</b>	81,12	$29,31 \pm 0,15$	$39,16 \pm 0,20$	$27,62 \pm 0,10$	$4,41 \pm 0,11$	-	100,50
<b>OH 7</b>	78,86	$29,32 \pm 0,20$	$39,10 \pm 0,21$	$29,10 \pm 0,25$	$4,25 \pm 0,20$	-	101,77
H 1	86,04	$27,24 \pm 0,25$	$32,26 \pm 0,22$	$34,76 \pm 0,20$	$3,16 \pm 0,20$	-	97,42
H 2	85,25	$23,95 \pm 0,15$	$34,77 \pm 0,25$	$37,99 \pm 0,20$	$3,42 \pm 0,16$	-	100,18
Н3	85,80	$22,56 \pm 0,15$	$40,69 \pm 0,13$	$36,57 \pm 0,15$	$3,81 \pm 0,15$	-	103,63
H 4	86,63	$27,33 \pm 0,10$	$40,18 \pm 0,15$	$38,83 \pm 0,15$	$2,34 \pm 0,25$	-	108,68
Н5	85,72	$26,71 \pm 0,15$	$39,17 \pm 0,25$	$39,41 \pm 0,22$	$2,18 \pm 0,29$	-	107,47
H 6	89,90	$26,22 \pm 0,25$	$39,66 \pm 0,15$	$35,63 \pm 0,25$	$3,43 \pm 0,10$	-	104,88
H 7	91,45	$27,30 \pm 0,15$	$39,49 \pm 0,10$	$34,61 \pm 0,12$	$3,26 \pm 0,21$	-	104,66
C 1	86,14	$28,70 \pm 0,20$	$39,63 \pm 0,15$	$29,22 \pm 0,10$	$3,16 \pm 0,15$	-	100,71
C 2	86,41	$27,04 \pm 0,18$	$38,89 \pm 0,15$	$29,45 \pm 0,15$	$3,42 \pm 0,13$	-	98,80
C 3	86,73	$28,52 \pm 0,15$	$38,86 \pm 0,10$	$26,81 \pm 0,13$	$3,86 \pm 0,10$	-	98,05
<b>C</b> 4	85,05	$28,49 \pm 0,12$	$40,76 \pm 0,15$	$28,70 \pm 0,11$	$3,13 \pm 0,21$	-	101,08
C 5	87,10	$28,74 \pm 0,13$	$39,68 \pm 0,20$	$29,20 \pm 0,11$	$3,38 \pm 0,13$	-	101,00
C 6	87,29	$29,31 \pm 0,20$	$39,65 \pm 0,15$	$29,42 \pm 0,15$	$3,31 \pm 0,12$	-	101,69
C 7	85,49	$27,66 \pm 0,10$	$39,61 \pm 0,12$	$29,02 \pm 0,17$	$3,16 \pm 0,10$	-	99,45

Tabela 28: Composição química da palha in natura e da palha pré-tratada por ultrassom em todas as condições estudadas.

A Tabela 29 a seguir mostra as frações macromoleculares solubilizadas corrigidas pelo rendimento.

Amostra	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)
OH 1	22,09	13,17	20,47
<b>OH 2</b>	24,89	11,53	19,79
<b>OH 3</b>	20,70	18,78	15,68
<b>OH 4</b>	20,46	16,98	15,23
<b>OH 5</b>	25,17	18,18	17,53
<b>OH 6</b>	19,58	18,47	21,54
<b>OH 7</b>	21,82	20,57	19,64
H 1	20,72	28,48	_
H 2	30,92	23,62	_
Н3	34,52	10,06	_
H 4	19,92	10,32	_
Н 5	22,55	13,50	_
H 6	17,24	5,84	_
H 7	15,55	6,97	_
C 1	16,39	12,06	11,84
C 2	20,98	13,42	10,87
C 3	16,32	13,18	18,55
<b>C 4</b>	18,04	10,68	14,50
C 5	15,33	10,97	10,93
C 6	13,47	10,83	10,04
<b>C</b> 7	20,02	12,77	13,10

Tabela 29: Solubilização dos componentes após tratamento por ultrassom.

Fonte: Arquivo Pessoal.

No tratamento realizado em meio alcalino, houve uma boa solubilização de lignina, chegando a quase 22 % de solubilização (OH 6). Isso acontece devido ao fato de o NaOH atacar a lignina, rompendo essa macromolécula em unidades de baixa massa molecular que são solúveis no licor. As reações de lignina no meio alcalino, geralmente têm início na desprotonação de um OH fenólico, dando origem a uma metileno quinona, através da clivagem no carbono alfa ou a estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama (FENGEL; WEGENER, 1989). Houve também uma satisfatória solubilização de hemiceluloses e celulose.

No pré-tratamento por ultrassom, a energia transmitida pela onda sonora é absorvida pelo líquido formando microcavidades que, num pequeno intervalo de tempo, colapsam-se liberando enormes quantidades de energia ao meio reacional. A temperatura e pressão dessas microcavidades podem alcançar 5.000 K e 1.200 atm, respectivamente (KARDOS; LUCHE, 2001). Sendo assim, foi observado que ao final do tratamento nos tempos de 20, 25 e 30 minutos, a temperatura chegou a 45 °C, 49 °C e 58 °C, respectivamente. E nos demais tempos, a temperatura ao término da reação ficou por volta de 30 a 36°C. Desta forma, além do efeito da radiação ultrassônica, o aumento da temperatura também influencia na solubilização dos componentes.

No tratamento em meio ácido foi onde se observou uma maior solubilização de hemicelulose, quando comparada aos outros tratamentos (em meio alcalino e controle). Devido ao caráter amorfo e do baixo grau de polimerização, a hemicelulose é mais susceptível ao ataque de reagentes químicos. Em meio ácido, em condições brandas, ocorre à hidrólise dos polissacarídeos. Entretanto, não há um ataque da fração celulósica em apreciável extensão.

Em meio ácido, a degradação da lignina é produzida por reações de substituição e quebra de ligações, geralmente acompanhadas por reações de condensação que acabam fazendo com que não ocorra a dissolução da lignina e, consequentemente, que ela seja eliminada em pequenas proporções. Com isso, o produto final obtido de um tratamento ácido é rico em celulose e lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). Sendo assim, foi possível notar que não houve solubilização de lignina (Tabela 29) e de todas as amostras obtidas, as que apresentaram maior teor de lignina foram as realizadas em meio ácido (vide Tabela 28).

Já para as reações realizadas em meio apenas com água (controle), foi possível notar baixa solubilização, tanto de celulose como de hemicelulose e lignina, quando comparada às outras condições avaliadas. Desta forma, é notório que o tratamento por ultrassom provoca mudanças na estrutura lignocelulósica, auxiliando na solubilização dos componentes do material. É necessário também levar em conta o aumento de temperatura durante o pré-tratamento. Foi observado que ao final do tratamento nos tempos de 20, 25 e 30 minutos, a temperatura chegou a 47 °C, 51 °C e 56 °C, respectivamente. E nos demais tempos, a temperatura ao término da reação ficou por volta de 34 °C. Este acréscimo de temperatura, portanto, provavelmente, pode também ter influenciado a solubilização dos componentes do material lignocelulósico.

#### 5.2.2.1 Difração de Raios X das amostras pré-tratadas

A Figura 39 mostra o difratograma das amostras pré-tratadas por ultrassom em todas as condições avaliadas.



Figura 39: Difratograma das amostras pré-tratadas por ultrassom e da palha in natura.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Com os dados obtidos pela análise foi possível construir a Tabela 30 a seguir, com os dados de Cristalinidade Medida (Ic), Cristalinidade esperada (Ice) e Diminuição da Cristalinidade (Dc).

Observou-se que a diminuição da cristalinidade após o pré-tratamento não chegou a faixa de 20%. Para a palha pré-tratada em meio ácido e em meio com apenas água (controle) a diminuição da cristalinidade foi menos pronunciada do que aquelas tratadas

Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
OH1	52,38	72,45	19,77
OH2	53,18	72,16	18,98
OH3	47,60	66,17	18,57
OH4	49,27	67,38	18,11
OH5	48,44	67,10	18,63
OH6	47,73	67,59	19,86
OH7	50,36	67,48	17,12
H1	44,81	55,69	10,87
H2	46,83	60,01	13,18
Н3	56,62	70,69	14,07
H4	57,87	69,35	11,47
Н5	55,28	67,60	12,32
H6	59,75	68,45	8,70
H7	57,61	68,16	9,55
C1	57,37	68,40	11,03
C2	54,16	67,12	12,96
C3	55,80	67,07	11,27
C4	59,76	70,35	10,59
C5	58,38	68,48	10,10
C6	59,77	68,43	8,67
<b>C7</b>	57,29	68,36	11,07

Tabela 30: Diminuição da cristalinidade das palhas pré-tratadas por ultrassom.

As amostras controle confirmam que o tratamento com ultrassom surte efeito na biomassa, pois neste caso, como as amostras estão apenas imersas em água, o efeito se deve às ondas ultrassônicas. O aumento da temperatura causado pelo tratamento também deve ser um fator a ser considerado.

Além disso, a utilização de ácido e álcali no meio reacional potencializou o efeito do ultrassom, contribuindo para a solubilização dos componentes e influenciando na cristalinidade do material. Os tempos de exposição à radiação ultrassônica também contribuíram para a diminuição da cristalinidade no material. As amostras que ficaram expostas em maiores tempos (como OH1, H1 e C1 – 30 min) apresentaram uma maior diminuição da cristalinidade, quando comparado a outros tempos.

# 5.2.2.2 Microscopia eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas por ultrassom

As Figuras 40 e 41 mostram as micrografias das palhas tratadas por ultrassom. Para cada meio reacional avaliado (ácido, alcalino e o controle), foram analisadas as micrografias nos tempos de 30 e 15 minutos.

É possível verificar que, diferentemente do que acontece em outros tipos de prétratamento, como no caso do hidrotérmico em que há abertura das fibras e maior exposição da celulose para a etapa de hidrólise enzimática, no caso do tratamento com ultrassom não ocorre a abertura das fibras, nota-se apenas mudanças leves na superfície delas, o que explica a não modificação visual entre a palha in natura e a palha após o pré-tratamento, corroborando, assim, com os dados encontrados na literatura (Vide Figura 38) (ZHANG et al., 2008).

A palha sem tratamento possui a superfície das fibras sem qualquer tipo de modificação, lisa e bem compactada. Nas amostras pré-tratadas há a modificação nas superfícies das fibras, porém estas continuam aglomeradas em seus feixes, não havendo alterações significantes na morfologia do material, o que explica os resultados obtidos até o momento, em que houve baixa solubilização dos componentes e baixos valores de diminuição da cristalinidade. As amostras controles (tratadas em meio com água) foram as que apresentaram menos modificações, entretanto mostra que a radiação do ultrassom atingiu e modificou a amostra, pois as superfícies se encontram modificadas.



Figura 40: Microscopias das palhas in natura e pré-tratadas em meio alcalino e ácido (aumento de 200x).

EEL - USP D9.9 x200 500 um Н

H - 15



Figura 41: Microscopias das palhas in natura e pré-tratadas em meio controle (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.

# 5.2.3 Deslignificação Alcalina

# 5.2.3.1 Composição química das palhas pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas

Após o pré-tratamento por ultrassom, a palha de cana foi submetida à uma etapa de deslignificação alcalina nas mesmas condições de deslignificação da palha pré-tratada hidrotermicamente (NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1h – em reator de vidro, como descrito no item 4.4). Para comparar os efeitos do ultrassom sobre a etapa de deslignificação,
ensaios brancos foram realizados utilizando a palha de cana sem pré-tratar por ultrassom (material lignocelulósico in natura). Os dados de caracterização química das polpas obtidas a partir dos materiais pré-tratados por ultrassom e dos ensaios brancos se encontram na Tabela 31.

Os rendimentos da etapa de extração alcalina para biomassa pré-tratada por ultrassom foram superiores aos valores obtidos para a palha deslignificada sem prétratamento prévio (Tabela 31). A palha de cana pré-tratada por ultrassom, o rendimento foi em torno de 60 a 68%, ao passo que para o ensaio branco 57,3%. Esses dados mostram claramente que os materiais pré-tratados por ultrassom sofreram uma menor degradação em relação aos seus componentes macromoleculares. Os rendimentos mássicos de ambos os materiais foram superiores ao ensaio branco.

Notou-se também que para as reações realizadas com a biomassa tratada na condição controle, os rendimentos foram levemente superiores, quando comparadas às outras amostras, além de apresentarem maior teor de celulose e hemicelulose.

Amostra	Rendimento	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Total
	(%)					(%)
IND	57,34	$29,79 \pm 0,15$	$60,62 \pm 0,30$	$10,93 \pm 0,20$	$0,76 \pm 0,20$	102,10
OH 1D	60,07	$21,70 \pm 0,07$	$54,33 \pm 0,15$	$19,41 \pm 0,22$	$3,10 \pm 0,18$	98,54
OH 2D	62,13	$20,15 \pm 0,11$	$54,78 \pm 0,20$	$19,08 \pm 0,25$	$2,41 \pm 0,20$	96,42
OH 3D	61,42	$21,07 \pm 0,20$	$55,02 \pm 0,15$	$20,23 \pm 0,36$	$3,01 \pm 0,12$	99,33
OH 4D	65,60	$19,52 \pm 0,13$	$56,31 \pm 0,27$	$20,94 \pm 0,29$	$3,26 \pm 0,30$	100,03
OH 5D	65,98	$19,69 \pm 0,10$	$56,19 \pm 0,23$	$19,57 \pm 0,30$	$3,30 \pm 0,13$	98,75
<b>OH 6D</b>	66,51	$20,49 \pm 0,25$	$55,47 \pm 0,11$	$21,66 \pm 0,16$	$3,22 \pm 0,19$	100,84
OH 7D	66,24	$20,38 \pm 0,30$	$56,54 \pm 0,12$	$21,87 \pm 0,20$	$4,12 \pm 0,22$	101,91
H 1D	62,33	$19,61 \pm 0,20$	55,19 ± 0,21	$20,84 \pm 0,23$	3, 40±0,21	99,04
H 2D	61,50	$20,19 \pm 0,11$	$55,08 \pm 0,20$	$19,56 \pm 0,10$	$3,36 \pm 0,17$	98,19
H 3D	64,75	$20,98 \pm 0,15$	$55,89 \pm 0,13$	$19,12 \pm 0,15$	$3,18 \pm 0,15$	99,17
H 4D	64,70	$21,37 \pm 0,07$	$56,31 \pm 0,14$	$20,46 \pm 0,19$	$3,29 \pm 0,22$	101,43
H 5D	66,10	$19,81 \pm 0,15$	$56,40 \pm 0,05$	$21,38 \pm 0,28$	$3,09 \pm 0,29$	100,68
H 6D	64,44	$22,03 \pm 0,26$	$55,58 \pm 0,32$	$20,55 \pm 0,25$	$3,14 \pm 0,14$	101,30
H 7D	64,53	$21,77 \pm 0,15$	$56,20 \pm 0,11$	$19,90 \pm 0,10$	$3,28 \pm 0,21$	101,15
C 1D	62,88	$22,89 \pm 0,15$	$58,08 \pm 0,12$	$29,22 \pm 0,10$	$3,55 \pm 0,10$	100,12
C 2D	62,95	$24,42 \pm 0,16$	$58,96 \pm 0,12$	$29,45 \pm 0,19$	$3,46 \pm 0,33$	101,97
C 3D	65,38	$24,38 \pm 0,10$	$59,47 \pm 0,06$	$26,81 \pm 0,26$	$3,54 \pm 0,20$	102,74
C 4D	67,80	$25,18 \pm 0,12$	$58,33 \pm 0,10$	$28,70 \pm 0,28$	$3,24 \pm 0,22$	102,79
C 5D	67,25	$24,76 \pm 0,13$	$57,67 \pm 0,24$	$29,20 \pm 0,34$	$3,25 \pm 0,07$	101,80
C 6D	68,14	$25,26 \pm 0,23$	$58,03 \pm 0,15$	$29,42 \pm 0,25$	$3,40 \pm 0,17$	102,01
<b>C 7D</b>	68,68	$24,69 \pm 0,15$	$59,89 \pm 0,16$	$29,02 \pm 0,29$	$3,09 \pm 0,18$	102,97

Tabela 31: Composição Química da palha in natura e das palhas pré-tratadas por ultrassom submetidas à deslignificação.

A Tabela 32 a seguir mostra as frações macromoleculares solubilizadas corrigidas pelo rendimento.

Amostra	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)
IND	42,23	10,44	78,05
OH 1D	$54,11(64,26)^3$	21,48 $(31,84)^3$	$58,37(66,89)^3$
OH 2D	$53,70(62,23)^3$	$18,60(24,00)^3$	$57,50(65,90)^3$
OH 3D	$54,62(54,02)^3$	11,86 $(28,43)^3$	$57,56(64,22)^3$
OH 4D	55,05 $(64,26)^3$	$5,38(21,46)^3$	53,15 (60,28) <sup>3</sup>
OH 5D	$52,01(64,10)^3$	$4,60(21,96)^3$	55,18 (63,04) <sup>3</sup>
OH 6D	53,50 (62,61) <sup>3</sup>	$5,79(22,91)^3$	$47,8459,07)^3$
OH 7D	$53,96(63,99)^3$	$4,21(23,92)^3$	50,21 (59,99) <sup>3</sup>
H 1D	$55,13(64,43)^3$	$-(23,76)^3$	$62,63 (60,85)^3$
H 2D	$48,16(64,20)^3$	$2,58(25,61)^3$	$68,34(64,08)^3$
H 3D	$39,78(60,58)^3$	11,06 $(20,02)^3$	66,15 (62,79) <sup>3</sup>
H 4D	49,41 (59,49) <sup>3</sup>	$9,33(18,70)^3$	65,91 (59,83) <sup>3</sup>
H 5D	$50,98(62,04)^3$	$4,82(17,68)^3$	$64,14(57,57)^3$
H 6D	$45,86(56,84)^3$	$9,69(17,06)^3$	$62,83(58,30)^3$
H 7D	$48,54(56,55)^3$	$8,16(14,57)^3$	$62,90(58,87)^3$
C 1D	$49,85(58,07)^3$	$7,85(18,96)^3$	$66,43(70,40)^3$
C 2D	$43,15(55,08)^3$	$4,56(17,38)^3$	67,66 (71,17) <sup>3</sup>
C 3D	$44,11(53,25)^3$	$-(13,13)^3$	62,57 (69,51) <sup>3</sup>
C 4D	$40,08(50,90)^3$	$2,97(13,36)^3$	$62,11(67,60)^3$
C 5D	$42,02(50,95)^3$	$2,26(12,98)^3$	$62,90(66,94)^3$
C 6D	41,28 (49,19) <sup>3</sup>	$0,27(11,09)^3$	$64,52(68,08)^3$
C 7D	$38,69(50,98)^3$	- (9,42) <sup>3</sup>	$63,79(68,53)^3$

Tabela 32: Solubilização por componente após pré-tratamento e etapa de deslignificação.

<sup>3</sup> Valores em parênteses representam as perdas/solubilizações totais associadas ao pré-tratamento por ultrassom e à etapa de deslignificação.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Na análise de solubilização de lignina verificou-se que, a palha apenas submetida a etapa de deslignificação sem etapa prévia de pré-tratamento por ultrassom, a extração de lignina foi ligeiramente maior em comparação aos valores obtidos para materiais pré-tratados por ultrassom, sendo de 78,05% para palha in natura deslignificada (IND) e 67,66% para amostra pré-tratada e deslignificada (C2D). Considerando a solubilização total de lignina (soma da solubilização de lignina da etapa de pré-tratamento com a da extração alcalina), as polpas dos materiais pré-tratados por ultrassom ainda tiveram uma

extração menor de lignina do que para os ensaios branco. Essas evidências sugerem que a radiação ultrassônica sobre a palha de cana dificultou, de alguma forma, a degradação da lignina pela soda cáustica. No entanto, trabalhos na literatura mostram claramente o contrário, como o trabalho de Kadimaliev et al., (2003), os quais observaram que a radiação ultrassônica em serragem de pinheiro e de bétula favoreceu o consumo de lignina pelo fungo Panus (Lentinus) tigrinus, e de Rodrigues e Pinto (2007) que avaliaram a extração de compostos fenólicos de cascas de coco moídas e notaram que o ultrassom também melhorou a remoção de compostos fenólicos. Mas, por outro lado, Li et al., (2005) verificaram que altas intensidades de radiação ultrassônica (acima de 60 W por 48h), em papéis com impurezas de lignina, provocam o amolecimento dessa estrutura permitindo difundir-se extensivamente sobre as microfibrilas de celulose, formando redes de fibra de celulose rígidas e fechadas, muito mais recalcitrantes aos agentes químicos e enzimas celulolíticas. Analisando as condições do pré-tratamento com ultrassom adotadas neste trabalho, nota-se que intensidade da radiação empregada no pré-tratamento foi de 120 W (padrão do equipamento – não era possível modificar), valor superior ao especificado por Li et al., (2005), entretanto por tempos muito menores do que o utilizado pelo autor. Comparando as condições empregadas neste trabalho (120 W/30 minutos como sendo tempo máximo de radiação estudado nesta tese) com a dos autores (60 W/48 h), há uma grande diferença da quantidade de energia ultrassônica fornecida nos experimentos. Entretanto, o efeito de amolecimento da lignina notado pelos autores pode ter ocorrido num determinado momento ao atingir um valor limite de energia fornecida, e após isso, mantém a sua estrutura mesmo com adição de energia ao experimento. Nos nossos dados de remoção de lignina para os materiais pré-tratados por ultrassom observaram-se que de alguma forma a irradiação de ondas ultrassonoras dificultou a solubilização da lignina pela soda cáustica. Apesar do tempo reduzido do pré-tratamento, o mesmo pode ter sido suficiente para provocar o amolecimento da lignina e permeação sobre algumas microfibrilas de celulose, uma vez que o pré-tratamento ultrassônico foi realizado sob uma intensidade duas vezes maior ao valor em que os autores notaram o efeito de amolecimento da lignina.

Para os carboidratos, os valores de solubilização de celulose das amostras prétratadas foram inferiores ao encontrado para a palha apenas deslignificada (fato que confirmaria a hipótese do amolecimento da lignina sobre a fibra, impedindo a remoção dos componentes), porém para a hemicelulose ocorreu o inverso (com exceção de algumas amostras controle – meio aquoso). Uma hipótese seria o efeito combinado das soluções de NaOH e  $H_2SO_4$ , o aumento da temperatura do meio reacional com o pré-tratamento e a radiação ultrassônica sobre as fibras promover preferencialmente a solubilização da hemicelulose, antes do efeito do amolecimento da lignina acontecer. Porém, na literatura não foi encontrado situação semelhante, portanto, seria necessária uma investigação mais aprofundada, com outros tipos de análises ou outras condições de tratamento para a confirmação da hipótese levantada.

## 5.2.4 Análises físicas

## 5.2.4.1 Difração de Raios – X das palhas pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas

A Figura 42 mostra o difratograma das amostras obtidas após o pré-tratamento e deslignificação:



Figura 42: Difratograma das polpas pré-tratadas por ultrassom.

Com os dados obtidos pela análise, obteve-se os resultados da Tabela 33 a seguir:

Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
OH1D	62,21	86,71	24,50
OH2D	63,84	87,78	23,94
OH3D	64,39	96,15	31,76
OH4D	64,86	96,64	31,78
OH5D	68,82	96,88	28,67
OH6D	64,77	94,91	30,14
OH7D	65,59	96,88	31,29
H1D	66,43	114,62	48,19
H2D	65,92	106,14	40,22
H3D	63,18	91,42	28,24
H4D	62,54	93,90	31,35
H5D	60,31	96,47	36,17
H6D	63,17	93,89	30,72
H7D	66,19	95,35	29,16
C1D	66,38	98,19	31,81
C2D	66,79	101,58	34,79
C3D	67,23	102,53	35,30
C4D	66,88	95,88	29,00
C5D	65,92	97,38	31,46
C6D	66,51	98,06	31,55
C7D	67,76	101,30	33,54

Tabela 33: Diminuição da cristalinidade das polpas obtidas.

Pode-se observar que a deslignificação promoveu uma diminuição da cristalinidade de celulose de palha. Para a amostra apenas deslignificada a diminuição da cristalinidade foi de 8,03%. Além disso, pode-se afirmar que o pré-tratamento promove uma modificação significativa que influencia nas etapas posteriores de tratamento da biomassa, como a deslignificação. Observa-se que pela mudança morfológica causada pelo pré-tratamento foi possível obter uma expressiva diminuição da cristalinidade da celulose após a deslignificação, que não é observada quando a biomassa não sofre nenhuma modificação anterior à deslignificação, como no caso da amostra IND (palha in natura deslignificada).

Comparando-se a diminuição da cristalinidade em função dos tratamentos realizados pode-se afirmar que após a deslignificação a celulose remanescente é menos cristalina quando comparada a celulose submetida ao processo de pré-tratamento, evidenciando que a combinação de tratamentos pode contribuir de forma positiva para aumentar a susceptibilidade do material à hidrolise enzimática.

# 5.2.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas

As Figuras 43 e 44 a seguir mostram as micrografias das amostras de palhas tratadas por ultrassom e de palha in natura após deslignificação. Para cada meio reacional avaliado (ácido, alcalino e o controle), foram analisadas as micrografias nos tempos de 30 e 15 minutos.

Verifica-se que para todas as amostras, a deslignificação alcalina das amostras prétratadas promoveu uma maior modificação das fibras, ocasionando uma "leve" abertura dos feixes fibrosos, diferentemente do que ocorreu com as amostras somente pré-tratadas, em que houve apenas mudanças superficiais. Porém, ao comparar com as polpas obtidas após tratamento hidrotérmico, nota-se que estas sofreram maior abertura dos feixes do que as polpas previamente tratadas por ultrassom.

Para a palha que apenas passou pela etapa de remoção de lignina (IND), as fibras se encontram bem modificadas, revelando uma exposição das fibras decorrente apenas do processo de deslignificação evidenciando a influência deste tratamento sobre a biomassa. No entanto, ainda pode-se perceber um certo grau de agrupamento (organização) das fibras. O mesmo grau de organização das fibras também é encontrado nas amostras prétratadas por ultrassom seguidas pela etapa de deslignificação.



Figura 43: Micrografias de polpa de palha in natura e pré-tratada por ultrassom (aumento de 200x).





Figura 44: Micrografias de polpa de palha in natura e pré-tratada por ultrassom (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.

Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes polpas submetidas previamente ao pré-tratamento, sendo que para todas as condições observa-se, majoritariamente a presença de feixes vasculares e fibras levemente expostas.

Em suma, o pré-tratamento por ultrassom melhora a ação do agente deslignificante, porém é uma melhora discreta quando comparado a outros tipos de pré-tratamento.

5.2.5 Digestibilidade Enzimática das amostras pré-tratadas por ultrassom e deslignificadas

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos sem nenhum pré-tratamento é extremamente lenta e pode resultar em rendimentos inferiores a 20% do valor teórico (SILVA et al., 2011). A cristalinidade, o grau de polimerização da celulose, a porosidade, o teor de lignina, as características heterogêneas das partículas da biomassa e revestimento da celulose pela hemicelulose são fatores que influenciam radicalmente a etapa de sacarificação (AGBOR et al., 2011; MOSIER et al., 2005).

A Tabela 34 a seguir mostra os resultados de conversão enzimática tanto da palha in natura como de todas as condições estudadas para o pré-tratamento por ultrassom e das suas respectivas amostras deslignificadas.

Amostras	Amostras Conversão Enzimática A		Conversão Enzimática
	(%)		(%)
IN	$19,24 \pm 0,33$	IND	$55,74 \pm 0,34$ (49,92)
<b>OH 1</b>	$34,30 \pm 0,15$ (29,78)	OH 1D	$60,23 \pm 0,45$ (41,05)
<b>OH 2</b>	32,69 ± 0,24 (28,92)	OH 2D	58,64 ± 0,29 (44,57)
<b>OH 3</b>	38,40 ± 0,32 (31,19)	OH 3D	59,76 ± 0,36 (42,77)
<b>OH 4</b>	36,92 ± 0,18 (30,65)	OH 4D	$58,57 \pm 0,28$ (46,00)
<b>OH 5</b>	34,73 ± 0,21 (28,41)	OH 5D	$57,92 \pm 0,40$ (45,20)
<b>OH 6</b>	32,65 ± 0,36 (26,62)	<b>OH 6D</b>	58,18 ± 0,25 (44,85)
<b>OH 7</b>	29,00 ± 0,30 (23,03)	OH 7D	59,35 ± 0,20 (45,15)
H 1	30,86 ± 0,26 (22,07)	H 1D	57,61 ± 0,28 (43,92)
H 2	29,12 ± 0,40 (22,24)	H 2D	57,84 ± 0,41 (43,03)
Н3	27,64 ± 0,20 (24,85)	H 3D	$58,29 \pm 0,24$ (46,62)
H 4	27,03 ± 0,31 (24,24)	H 4D	57,08 ± 0,33 (46,41)
Н 5	24,37 ± 0,11 (21,08)	H 5D	$56,84 \pm 0,14$ (46,79)
H 6	25,18 ± 0,21 (23,71)	H 6D	$56,79 \pm 0,25$ (47,10)
H 7	23,10 ± 0,20 (21,49)	H 7D	$56,06 \pm 0,29$ (47,89)
C 1	16,57 ± 0,23 (14,57)	C 1D	55,88 ± 0,35 (45,29)
C 2	16,13 ± 0,22 (13,97)	C 2D	54,72 ± 0,25 (45,21)
C 3	15,89 ± 0,35 (13,80)	C 3D	$55,89 \pm 0,30$ (48,55)
<b>C</b> 4	$16,43 \pm 0,24 (14,66)$	<b>C 4D</b>	55,44 ± 0,39 (48,03)
C 5	15,49 ± 0,38 (13,79)	C 5D	55,50 ± 0,34 (48,29)
C 6	$15,20 \pm 0,45 \ (13,55)$	C 6D	55,26 ± 0,46 (49,13)
C 7	15,33 ± 0,35 (13,37)	C 7D	55,38 ± 0,39 (49,16)

Tabela 34: Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas por ultrassom e das respectivas polpas obtidas.

Os valores entre parênteses presentes na tabela correspondem a conversão enzimática corrigida pelas perdas de celulose que amostras sofreram com os processos de pré-tratamento e deslignificação.

Verifica-se que para as amostras pré-tratadas, a conversão enzimática foi superior ao da palha in natura, evidenciando que a alteração superficial das fibras (vide figuras 40 e 41) foi importante para a hidrólise enzimática, entretanto não foi suficientemente eficaz, pois a amostra que apresentou melhore valor de conversão (considerando as perdas do processo) teve uma melhora de apenas 11,9% (OH 3), quando comparado com a palha in natura. A exceção está com as amostras pré-tratadas em meio aquoso (controle), em que todas as condições avaliadas apresentaram valores de conversão inferior à amostra in natura. Neste caso, talvez, o efeito do amolecimento da lignina seja o fator determinante para os baixos valores encontrados. Nas amostras em que o tratamento foi realizado na presença de álcali ou ácido, os valores foram levemente melhores. Isto sugere, novamente, a hipótese da ação combinada dos reagentes, o aumento da temperatura do meio reacional com o pré-tratamento e a radiação ultrassônica, o qual pode ter amenizado o efeito do amolecimento da lignina sobre as fibras, melhorando os valores da conversão enzimática.

Para as amostras deslignificadas, os valores de conversão foram superiores aos encontrados para as pré-tratadas e para a palha in natura deslignificada. Comparando os valores de conversão da palha in natura (IN), da palha in natura deslignificada (IND) com os valores encontrados para a palha pré-tratada e em seguida deslignificada, pode-se afirmar que o pré-tratamento melhorou a ação do agente deslignificante. Porém, quando analisados os valores de conversão considerando todas as perdas durante o processo, as amostras que sofreram pré-tratamento prévio apresentaram valores abaixo ao da palha in natura deslignificada, evidenciando novamente o efeito do amolecimento da lignina sobre as fibras. Não obstante, para confirmar as hipóteses, seria necessário a utilização de análises diferenciadas (como, por exemplo, análise de imagens) ou outras condições de tratamento, variando potência do equipamento, tempos de exposição maiores, etc.

Portanto, a escolha do melhor processo para a conversão de biomassa não se deve focar somente em resultados de uma única etapa e sim pela análise do efeito combinado de todas as etapas envolvidas nesse processo. Desta forma, pensando nos valores encontrados em para conversão global de celulose em glicose (conversão considerando as perdas pelos processos – valores entre parênteses da Tabela 34) e levando em consideração a economia energética (redução de tempo de tratamento), pode-se dizer que a melhor condição para tratamento foi a OH 3 / OH 3D (NaOH 1%(m/v), 20min, 10% (m/v) consistência). As amostras controle (meio aquoso) também podem ser uma alternativa, já que apresentaram melhores valores de conversão. Todavia, seria necessário um melhor estudo sobre este tipo de pré-tratamento, pois os valores de sacarificação enzimática foram inferiores a 50%. Quando se pensa na produção do etanol de segunda geração, espera-se que estes valores sejam superiores a 90%, chegando próximo a 100% de conversão. O ultrassom, neste caso, deixou a desejar. Outras condições de tratamento, outros reagentes no meio reacional e até mesmo outro tipo de equipamento (como ultrassom por sonda ao invés do banho utilizado neste trabalho) devem ser testados com o intuito de averiguar mais afundo os efeitos do ultrassom na biomassa e, consequentemente, tornar os valores de conversão enzimática mais atrativos para a produção de etanol 2G.

## 5.3 Pré-tratamento por explosão a vapor catalisada por SO2

## 5.3.1 Otimização das condições de pré-tratamento para palha e bagaço de cana

### 5.3.1.1 Composição química do licor hemicelulósico e da celulignina

Como etapa inicial deste trabalho, palha e bagaço, separadamente, foram submetidos ao pré-tratamento por explosão a vapor em três diferentes condições já citados no item 4.3. Três temperaturas diferentes (190, 195 e 200°C), foram testadas, mantendo-se constante o tempo de reação e porcentagem de SO<sub>2</sub> impregnada na biomassa (5 min, 3% SO<sub>2</sub> (m/m)).

O material pré-tratado (celulignina) (Figura 45) apresentou um escurecimento da cor em relação ao material "in natura", analogamente ao encontrado por Curreli et al., (2002) que relataram o escurecimento da palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico. Este fenômeno pode estar associado à catálise ácida das ligações do complexo ligninacarboidrato, bem como pela formação de produtos da degradação de carboidratos (caramelização de açúcares). Figura 45: Amostras pré-tratadas de palha e bagaço de cana: (A) bagaço tratado a 190 °C; (B) bagaço tratado a 195 °C; (C) bagaço tratado a 200 °C; (D) palha tratada a 190 °C; (E) palha tratada a 195 °C; (F) palha tratada a 200 °C.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A Tabela 35 mostra a composição do licor hemicelulósico (açúcares) obtidos após a etapa de pré-tratamento. Nota-se que a remoção de hemicelulose é bem pronunciada, tanto para bagaço quanto para a palha de cana, sendo que o bagaço apresenta concentrações maiores de hemicelulose (xilose) em comparação à palha de cana.

Vale ressaltar que, como descrito na literatura, o pré-tratamento por explosão a vapor é baseado no uso de vapor superaquecido como o agente de desestruturação da fibra (YANG, 2008). O fracionamento dos carboidratos em oligômeros é bastante expressivo neste tipo de pré-tratamento, e devido à dificuldade de padrões destes oligômeros para uma análise completa, uma pós-hidrólise do licor nos forneceu resultados mais significativos e facilitando a compreensão de quais componentes possuem maior susceptibilidade à solubilização neste tipo de pré-tratamento.

	Concentração total de açucares (g/L)							
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose			
Bagaço 190 / 5	1,49±0,01	$0,65\pm0,01$	3,06±0,02	13,35±0,01	ND			
Bagaço 195 / 5	1,44±0,01	$0,54\pm0,01$	5,02±0,05	13,85±0,01	0,41±0,01			
Bagaço 200 / 5	1,41±0,02	0,47±0,01	4,30±0,78	12,39±1,11	0,39±0,03			
Palha 190 / 5	$1,84\pm0,01$	$0,54\pm0,05$	2,63±0,75	10,75±0,94	ND			
Palha 195 / 5	1,57±0,00	$0,45\pm0,22$	$3,53\pm0,58$	11,79±0,48	$0,39\pm0,05$			
Palha 200 / 5	$1,54\pm0,01$	0,49±0,10	4,21±0,33	12,26±0,03	0,38±0,00			
	Concentração de monômeros (g/L)							
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose			
Bagaço 190 / 5	1,34±0,02	0,48±0,01	2,97±0,09	16,74±0,35	0,17±0,03			
Bagaço 195 / 5	1,25±0,09	$0,49\pm0,03$	4,73±0,24	15,24±0,57	$0,09\pm0,07$			
Bagaço 200 / 5	1,16±0,01	$0,44\pm0,01$	$2,84\pm0,01$	14,41±0,16	$0,08\pm0,06$			
Palha 190 / 5	1,75±0,15	$0,39\pm0,05$	$1,26\pm0,07$	7,24±0,36	0,12±0,01			
Palha 195 / 5	$1,55\pm0,00$	0,43±0,01	$1,69\pm0,05$	8,74±0,04	$0,11\pm0,10$			
Palha 200 / 5	1,46±0,15	$0,45\pm0,07$	2,08±0,16	9,70±0,54	$0,23\pm0,04$			
		Concentraç	ão de oligô	meros (g/L)				
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose			
Bagaço 190 / 5	0,15	0,17	0,09	ND	ND			
Bagaço 195 / 5	0,19	0,04	0,29	ND	0,31			
Bagaço 200 / 5	0,25	0,03	1,45	ND	0,3			
Palha 190 / 5	0,09	0,15	1,38	3,51	0,12			
Palha 195 / 5	0,02	0,02	1,84	3,04	0,28			
Palha 200 / 5	0,07	0,04	2,13	2,56	0,15			

Tabela 35: Composição química do licor hemicelulósico obtido após pré-tratamento da palha e do bagaço.

\*ND – Não Detectado Fonte: Arquivo Pessoal.

Na Tabela 36 se encontram as concentrações de furfural, HMF, ácido acético, lignina solúvel e fenólicos totais presentes no hidrolisado:

Tabela 36: Concentração de furfural, HM	F, ácido acético, lignina	a solúvel e fenólicos contid	os no hidrolisado.
hemicelulósico.			

Amostras	Fufural (g/L)	HMF (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Lignina solúvel (g/L)	Fenólicos totais (g/L)
Bagaço 190/5	0.67	1.81	1.78	2,07	2,02
Bagaço 195/5	0.70	1.85	1.81	2,84	2,54
Bagaço 200/5	0.74	1.90	1.83	2,25	2,99
Palha 190/5	0.62	1.73	1.52	3,30	2,42
Palha195/5	0.63	1.72	1.57	3,55	2,77
Palha 200/5	0.69	1.79	1.61	3,64	2,85

Pelos resultados apresentados, observou-se que, além da alta solubilização de hemicelulose (xilose), houve degradação da celulose pela presença de HMF e glicose na fração líquida (Tabela 35 e 36). Notou-se que em temperaturas maiores de reação, a concentração desses compostos nos hidrolisados aumentaram devido a degradação dos açúcares que são solubilizados. Desta forma, o parâmetro temperatura é considerado significante para a degradação dos açúcares. Porém, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que são produtos de degradação de pentoses e hexoses respectivamente, estão presentes em baixas concentrações. A baixa formação desses furanos é resultado da mínima degradação de açúcar durante o pré-tratamento. Minimizando a formação desses compostos no licor hemicelulósico haverá, consequentemente, a melhora do rendimento e do potencial de produção de etanol, uma vez que os inibidores dos microrganismos estarão em concentrações reduzidas no processo de fermentação. Assim, nota-se que condições escolhidas foram suficientemente severas para produzir um substrato sólido que pode ser de hidrólise rápida e completa, mas não severo o bastante para que os açúcares presentes fossem totalmente degradados.

Já com relação a lignina solúvel e fenólicos totais, foi observado que o bagaço possui concentrações inferiores quando comparado com a palha (Tabela 36). Além disso, com o aumento da severidade, há o aumento da concentração desses compostos nos hidrolisados.

Lignina é uma macromolécula aromática sintetizada pelos precursores de fenilpropanóides (DONALDSON, 2001). E os compostos fenólicos são derivados da degradação da lignina durante o pré-tratamento.

Compostos fenólicos exercem efeito inibitório quando presentes no hidrolisado no momento da fermentação. Sabe-se que estes compostos em concentrações iguais ou superiores a 3 g.L<sup>-1</sup> são prejudiciais para a fermentação. Entretanto, o mecanismo de inibição não foi completamente elucidado (PALMQVIST; HAHN-HAAGERDAL, 1999). A Tabela 37 mostra a composição química da palha e do bagaço de cana-de-açúcar antes após cada condição de pré-tratamento estudada neste trabalho:

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lig. Insolúvel	Lig. Solúvel	Cinzas	Extrativos (%)	Total
			(%)	(%)	(%)		(%)
Bagaço in natura	40,13±0,08	25,95±0,25	21,65±0,26	4,02±0,13	3,95	2,31	98,70
Palha in natura	37,80±0,21	27,82±0,28	21,38±0,42	5,65±0,28	4,5	3,35	100,50
Bagaço 190 / 5	49,18±0,15	1,88±0,15	31,02±1,00	4,72±0,31	9,05	_	95,85
Bagaço 195 / 5	50,35±0,10	2,32±0,35	31,95±0,60	4,63±0,41	9,22	_	98,50
Bagaço 200 / 5	49,77±0,53	2,12±0,41	32,08±0,91	4,72±0,20	9,34	_	98,03
Palha 190 / 5	48,45±0,99	6,89±0,40	32,44±0,94	3,62±0,06	9,15	-	100,55
Palha 195 / 5	48,88±0,21	6,15±1,15	32,52±0,97	3,40±0,29	9,13	-	100,08
Palha 200 / 5	49,97±0,01	3,89±0,01	32,84±1,41	3,43±1,08	9,18	_	99,31

Tabela 37: Composição química da palha e bagaço in natura e do material pré-tratado por E.V.

Tabela 38: Determinação do rendimento e fator de severidade para cada condição.					
Amostra	Rendimento (%)	Fator de Severidade			
Aniostia	Kenumento (70)	(CS)*			
Bagaço 190/5	66.32	1,40			
<b>Bagaço 195/5</b>	63.41	1,63			
<b>Bagaço 200/5</b>	62.38	1,66			
Palha 190/5	69.92	0,85			
Palha 195/5	63.48	1,12			
Palha 200/5	63.18	1,16			

A Tabela 38 traz os rendimentos de reação de cada condição estudada e o respectivo fator de severidade combinada (CS), calculado utilizando a Equação 2:

\*CS - é o fator de severidade levando em conta o pH do meio.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Diferentes condições de pré-tratamentos foram avaliadas para bagaço e palha com o propósito de obter uma polpa com boa degradabilidade das fibras remanescentes (boa conversão enzimática) para a próxima etapa deste trabalho. A temperatura foi variada e o tempo de reação foi mantido constante.

Nota-se pela tabela de composição química que o pré-tratamento foi eficaz na remoção de hemicelulose, além de a razão Lignina Insolúvel/Lignina Solúvel ser maior para as amostras pré-tratadas que para as amostras in natura, mostrando que a proporção de lignina solúvel nos materiais pré-tratados diminui, ou seja, um indício que parte da lignina presente no material in natura pode ter sofrido reticulação, em função da severidade do pré-tratamento. Já na Tabela 38, observou-se que os valores de severidade combinada (CS) encontrados para as reações conduzidas com bagaço foram maiores que as reações conduzidas com palha. Provavelmente, isto se deve ao fato do bagaço apresentar um teor de ácido acético levemente superior à palha, intensificando as reações de hidrólise dos componentes. Ao observar a Tabela 36, nota-se que o teor de ácido acético encontrado no hidrolisado de bagaço é superior ao encontrado no hidrolisado de palha de cana.

Foi observada também uma significante diminuição do rendimento devido a temperatura de reação. Portanto, a temperatura é um fator importante para ser analisado.

Com essa finalidade, é possível correlacionar o fator de severidade com o rendimento de reação, como mostra a Figura 46 a seguir:



Figura 46: Correlação entre rendimento e fator de severidade para cada reação e para cada biomassa.

Observa-se que severidade e rendimento possuem boa correlação para ambas biomassas, evidenciando que temperatura e efeito de pH combinado influenciam no rendimento mássico na etapa de pré-tratamento. Para obter uma melhor visualização dos efeitos das condições adotadas para realização do tratamento em cada biomassa, a Tabela 39 mostra a solubilização/perda de cada componente.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço 190/5	19,09	95,32	7,66
Bagaço 195/5	20,80	94,33	9,64
Bagaço 200/5	22,98	94,90	10,57
Palha 190/5	10,38	82,68	6,72
Palha 195/5	18,58	85,97	15,64
Palha 200/5	16,48	91,17	15,22

Tabela 39: Solubilização/perda por componente após pré-tratamento por explosão a vapor catalisado por SO<sub>2</sub>.

Fonte: Arquivo Pessoal.

É possível observar que cada biomassa se comporta de maneira diferente para a mesma condição estudada. Por exemplo, para o bagaço, com o aumento da severidade há o aumento da solubilização da hemicelulose e lignina, enquanto há uma leve redução na solubilização de hemicelulose. Para a palha há um aumento na solubilização de hemicelulose e uma menor perda de celulose e lignina. As Figuras 47 e 48 ilustra bem o efeito da severidade na solubilização dos componentes da biomassa.

Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 47: Relação entre severidade e solubilização dos componentes do bagaço pré-tratado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 48: Relação entre severidade e solubilização dos componentes da palha pré-tratada.



Fonte: Arquivo Pessoal.

### 5.3.1.2 Conversão enzimática e recuperação total de açúcares

Após a etapa de pré-tratamento, todas as 6 amostras foram submetidas a hidrólise enzimática, utilizando 5% (m/v) de consistência e 10 FPU/g de celulose de enzima celulase (Figura 48). Esta condição de hidrólise é diferente da condição utilizada para as amostras

submetidas ao tratamento hidrotérmico e por ultrassom e suas respectivas polpas. No caso deste estudo, optou-se em utilizar as condições otimizadas para o bagaço de cana obtidos no laboratório da Dr<sup>a</sup>. Bura, para ser possível futuras comparações com outros trabalhos relacionados que seguem em andamento.

Houve diferenças de digestibilidade entre palha e bagaço, porém não foram extremamente significativas. Dentre todas as amostras, o máximo de conversão de celulose foi após 48 horas, chegando a alcançar valores entre 60 e 63%, conforme os dados expressos na Figura 49.



Figura 49: Perfil da conversão enzimática das amostras pré-tratadas por explosão a vapor.

Fonte: Arquivo Pessoal.

É possível observar que não há diferença significativa nos valores de conversão enzimática entre as amostras estudadas. Entretanto, notou-se que o bagaço apresenta valores de conversão superiores quando comparado com palha. Esse aumento pode estar relacionado com redução da quantidade de xilana presente nas amostras. Quando o teor de xilana aumenta, a conversão enzimática diminui. Sabe-se que a remoção de xilana (hemicelulose) melhora a digestibilidade da celulose (BURA et al., 2009). Além disso, outros fatores influenciam no sucesso da conversão, como a quantidade de lignina, tamanho da partícula, cristalinidade da celulose, etc. Com tantas variáveis, torna-se complicado determinar o papel que a xilana exerce (MANSFIELD et al., 1999). A xilana presente na parede celular é susceptível a hidrólise ácida e é solubilizada pela ação do  $SO_2$  e outros ácidos que são formados durante o pré-tratamento, melhorando a etapa subsequente de sacarificação (BURA et al., 2009).

De posse destes dados, é possível determinar a recuperação total de açúcares antes e após a hidrólise enzimática, como ilustra a Figura 50 a seguir. A recuperação de açúcares após o pré-tratamento determina o quanto de açúcares presentes na matéria-prima foram recuperados no licor hemicelulósico e no substrato sólido. A recuperação de açúcares pós hidrólise enzimática define o quanto de açúcar da matéria-prima foi recuperado no licor hemicelulósico após o pré-tratamento e do substrato sólido após a conversão enzimática (em relação a massa inicial utilizada para o tratamento). Estes dados foram corrigidos pelas perdas dos processos de pré-tratamento.



Figura 50: Recuperação total de açúcares antes e após a etapa de conversão enzimática.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Notou-se que os melhores resultados de recuperação de açúcares foram encontrados para as amostras de bagaço quando comparado com a palha de cana, provavelmente devido as diferenças estruturais e químicas entre o bagaço e a palha.

A recuperação total de açúcares (pós hidrólise enzimática) foi baixa devido a pobre digestibilidade da fração sólida, resultado do fracionamento não eficiente da biomassa após o pré-tratamento, mesmo utilizando o SO<sub>2</sub> como catalisador. A baixa severidade pode levar ao incompleto fracionamento e, consequentemente, a baixos rendimentos de hidrólise e baixos valores de recuperação de açúcares. Valores elevados de severidade resultam em uma desestruturação mais eficiente do material, com valores de conversão enzimática superiores, o que é altamente desejado. Porém, há o efeito inevitável e pouco desejado: a

formação de vários produtos de degradação de açúcares que atuam de forma negativa no momento da fermentação, por exemplo, e que podem levar aos mesmos resultados de baixo rendimento e baixa conversão (OLSSON et al., 1996).

Dentre todas as condições avaliadas, a amostra de bagaço tratada a 190°C, 5 min e 3% de SO<sub>2</sub> e a amostra de palha tratada a 190°C, 5 min e 3% de SO<sub>2</sub> foram as que tiveram os melhores resultados de recuperação de açúcares e, assim sendo, esta condição foi utilizada na segunda parte deste trabalho, nos experimentos de mistura de biomassa.

## 5.3 Misturas de bagaço e palha de cana-de-açúcar

# 5.3.1 Composição química do licor hemicelulósico e do substrato sólido após prétratamento

Bagaço e palha de cana são duas fontes de celulose altamente abundante e que estão presentes em diferentes quantidades em diferentes momentos durante o ano. A ideia de misturá-las dentro de uma biorrefinaria seria uma alternativa eficiente para a utilização da biomassa. A primeira parte deste trabalho teve como objetivo avaliar a melhor condição de pré-tratamento para ambas biomassas com o intuito de obter um substrato com elevados valores de digestibilidade e recuperação de açúcares. Agora, a segunda parte do trabalho deseja avaliar a influência que existe em misturar palha e bagaço nos resultados de recuperação totais de açúcares ao final de processo.

A temperatura ótima de tratamento de 190°C foi a escolhida para conduzir os experimentos com as misturas propostas de bagaço e palha. Para esse propósito, três diferentes proporções foram testadas: 90 % palha / 10 % bagaço, 90 % bagaço / 10 % Palha e 50 % bagaço / 50 % palha.

Visualmente, todas as misturas estudadas apresentaram coloração mais escura após o pré-tratamento em relação ao material "in natura" (Figura 51). Esta mudança de coloração está associada com a quebra química da lignina e extrativos durante o processo de pré-tratamento, além da degradação de açúcares (CURRELI, 2002).

Figura 51: Amostras pré-tratadas por explosão a vapor: (A) 100% palha; (B) 100% bagaço; (C) mistura 90% palha / 10% bagaço; (D) mistura 90% bagaço / 10% palha; (E) mistura 50% palha / 50% bagaço.

Fonte: Arquivo Pessoal.

A Tabela 40 mostra a composição do hidrolisado hemicelulósico obtido após o prétratamento para todas as misturas e para apenas palha e bagaço separadamente, e em seguida, se encontram as concentrações de furfural, HMF, ácido acético, lignina solúvel e fenólicos totais na Tabela 41.

	Concentração total de açúcares (g/L)					
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	
100 % Palha	2,65±0,21	0,96±0,11	2,66±0,39	20,87±0,89	0,56±0,07	
100% Bagaço	1,49±0,18	$0,57\pm0,20$	4,74±0,20	22,74±0,40	$0,44\pm0,08$	
90% P/10% B	2,87±0,19	$1,04\pm0,15$	$2,53\pm0,03$	22,10±0,38	0,51±0,10	
50% B / 50% P	2,36±0,05	$0,85\pm0,22$	3,28±0,11	24,13±0,55	0,52±0,07	
90%B / 10% P	1,74±0,03	$0,84\pm0,05$	4,70±0,04	23,39±0,37	ND	
	Concentração de monômeros (g/L)					
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	
100 % Palha	1,89±0,12	0,48±0,22	0,62±0,10	11,33±0,52	0,07±0,15	
100% Bagaço	0,96±0,04	0,42±0,27	3,09±0,09	18,57±0,18	0,24±0,06	
90% P/10% B	1,79±0,07	$0,51\pm0,30$	0,82±0,47	15,50±0,74	0,11±0,20	
50% B / 50% P	1,75±0,10	$0,49\pm0,02$	1,78±0,14	21,41±0,31	0,14±0,10	
90%B / 10% P	$1,01\pm0,15$	$0,46\pm0,21$	2,91±0,13	20,02±0,21	0,25±0,19	
		Concentraç	ão de oligô	meros (g/L)		
	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	
100 % Palha	0,77	0,48	2,04	9,59	0,49	
100% Bagaço	0,52	0,14	1,65	4,17	0,20	
90% P/10% B	0,99	0,53	1,71	6,60	0,40	
50% B / 50% P	0,95	0,37	1,50	2,72	0,38	
90%B/10%P	0,73	0,39	1,79	3,37	ND	

Tabela 40: Composição química do licor hemicelulósico obtido após pré-tratamento da palha, do bagaço e misturas.

\*ND - Não Detectado.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 41: Concentração de furfural, HMF, ácido acético, lignina solúvel e fenólicos contidos no hidrolisado hemicelulósico.

	Fufunal		Ácido	Lignina	Fenólicos
Amostras		HMF(g/L)	Acético	solúvel	totais
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(g/L)
100% Palha	1,05	2,95	1,92	3,17	3,27
100% Bag.	1,13	3,01	1,84	3,03	3,47
90%P/10%B	1,04	2,93	1,86	3,11	3,10
50%P/50%B	1,09	2,98	1,91	3,13	3,19
90%B/10%P	1,10	3,00	1,93	3,07	3,32

Fonte: Arquivo Pessoal.

Observou-se para todas as amostras a degradação de celulose devido a formação de HMF e glicose na fração líquida. Houve também uma alta solubilização de xilose quando

comparado com os outros açúcares constituintes da biomassa. Mais uma vez, nota-se que o bagaço é um material mais susceptível ao pré-tratamento pois apresentou concentração de açúcares superiores em seu hidrolisado, especialmente xilose. Este fato é corroborado mais uma vez, quando nas misturas a concentração de xilose é maior nos hidrolisados em que a proporção de bagaço é maior.

Também foi possível notar que os hidrolisados de palha possuem concentrações superiores de lignina solúvel e os hidrolisados de bagaço apresentam valores superiores de fenólicos totais. Para todas as misturas testadas, os valores encontrados foram intermediários. Quando há o aumento do teor de palha nas misturas, há o aumento da concentração de lignina solúvel no hidrolisado. O mesmo acontece com os compostos fenólicos quando há o aumento do teor de bagaço nas misturas.

Como previamente mencionado, a lignina é uma macromolécula aromática formada pelos precursores de fenilpropanóides e os compostos fenólicos são derivados da degradação da lignina durante a etapa de pré-tratamento. É sabido que fenólicos, HMF e furfural são prejudiciais no momento da fermentação.

Aparentemente, a mistura de biomassa (palha e bagaço) possue certo efeito sinergístico, que poderá ser evidenciado nos próximos resultados.

A Tabela 42 mostra a composição química de palha, de bagaço e das misturas antes do pré-tratamento, e a Tabela 43 informa a composição química da palha, do bagaço e das misturas após a etapa de pré-tratamento. Analisando a composição química da palha e do bagaço sem pré-tratamento (Tabela 42), observa-se que o bagaço possuir um maior teor de celulose que a palha. Já a palha possui maiores valores de extrativos e lignina. Os níveis de hemicelulose encontrados para ambas biomassas são semelhantes. Com relação as misturas avaliadas, os valores de celulose encontrados são intermediários e, quanto maior o teor de bagaço na mistura, maior é a porcentagem de celulose. O mesmo é válido para os outros componentes (hemicelulose, lignina, extrativos).

Tabela 42: Composição	química das biom	assas sem pré-tratamento.
-----------------------	------------------	---------------------------

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lig. Insolúvel	Lig. Solúvel	Cinzas	Extrativas (%)	Total (%)
			(%)	(%)	(%)	Extrativos (%)	
100% Bag.	42,35±0,24	28,19±0,20	20,46±0,19	2,92±0,12	3,56	3,09	100,57
100% Palha	37,82±0,11	27,82±0,23	21,38±0,22	5,65±0,27	3,45	4,67	100,79
90%P/10%B	38,85±0,15	28,24±0,21	22,98±0,21	3,22±0,14	4,58	4,28	102,15
50%P/50%B	40,46±0,22	27,77±0,48	22,60±0,20	3,05±0,22	4,10	4,56	102,54
90%B/10%P	41,59±0,14	27,60±0,15	22,87±0,15	3,19±0,17	4,02	4,14	103,41

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 43: Composição química das biomassas após pré-tratamento.

	Celulose (%)	) Hemicelulose (%)	Lig. Insolúvel	Lig. Solúvel	Cinzas	Extrativos	Total (%)
			(%)	(%)	(%)	(%)	<b>10tal</b> (%)
100% Palha	47,06±0,13	6,78±0,18	28,72±0,62	3,33±0,10	7,02	_	92,91
100% Bag.	50,12±0,20	7,00±0,20	28,04±0,69	3,27±0,12	6,45	_	94,88
90%P/10%B	52,15±0,58	6,98±0,40	24,94±0,83	3,19±0,31	7,95	_	95,21
50%P/50%B	58,45±0,33	3,86±0,35	23,82±0,15	3,34±0,20	7,05	_	96,52
90%B/10%P	55,64±0,82	1,08±0,26	24,77±0,28	3,40±0,11	7,17	_	92,06

Para as amostras pré-tratadas (Tabela 43), observou-se que o pré-tratamento foi efetivo, pois houve significativa solubilização de hemicelulose e completa remoção dos grupos acetil (ácido acético). Com relação ao teor de lignina total, não houve alteração significante, uma vez que a lignina pode sofrer reações de despolimerização/repolimerização e condensação, limitando a sua remoção (KUMAR, 2009).

Para palha e bagaço tratados separadamente, notou-se que a palha possui menor teor de celulose quando comparado ao bagaço. Para todas as misturas estudadas neste trabalho, o teor de celulose encontrado foi maior do que teor encontrado apenas par palha e bagaço separadamente. As misturas com maiores proporções de bagaço apresentaram teores altos de celulose, sendo que a proporção 50% palha / 50% bagaço foi o maior valor encontrado para celulose (58,45%).

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito do pré-tratamento, a Tabela 44 informa a solubilização por componente (corrigidos pelo rendimento de cada reação):

Amostras	Rendimento (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
100% palha	60,28	33,98	87,08	37,12
100% bagaço	62,74	39,62	87,33	31,68
90% P/10 % B	56,48	32,61	87,56	46,10
50% P/50% B	58,12	25,30	92,81	45,25
10% P/90% B	58,94	28,59	97,91	42,30

Tabela 44: Solubilização por componentes e rendimentos de cada reação.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Verifica-se que em todas as misturas avaliadas, houve baixa solubilização de celulose e alta solubilização de lignina e hemicelulose, quando comparados com palha e bagaço tratados separadamente. Desta forma, fica mais evidente o efeito sinergístico entre as biomassas, uma vez que a celulose é preservada e os outros componentes sofrem maiores solubilizações. Além disso, fica evidente que o bagaço sofre mais com o pré-tratamento, porém ao adicionar a palha, ocorre a preservação da celulose, pois há a diminuição dos valores de solubilização quando comparado as biomassas tratadas isoladamente.

# 5.3.2 Conversão Enzimática e Recuperação total de açúcares para as misturas de biomassa

Após o pré-tratamento, todas as 5 amostras foram submetidas a hidrólise enzimática, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente (Figura 52). Houve diferenças de digestibilidade entre palha, bagaço e as misturas. Dentre todas as amostras, o máximo de conversão de celulose foi após 72 horas, chegando a alcançar valores entre 67 e 71%.



Figura 52: Conversão enzimática para a palha, bagaço e todas as misturas após pré-tratamento.

Fonte: Arquivo Pessoal.

É possível observar que não há diferença significativa nos valores de conversão enzimática entre as amostras estudadas. As amostras, praticamente, apresentaram o mesmo comportamento, sofrendo pequenas variações nos intervalos de tempos avaliados. Entretanto, percebeu-se que todas as misturas apresentaram melhores valores de conversão de celulose em glicose, quando comparado com a biomassa tratada separadamente. A mistura 50% palha / 50% bagaço apresentou o melhor valor de conversão (71%).

Os teores de lignina e hemicelulose podem estar relacionados aos melhores resultados de digestibilidade para todas as misturas avaliadas, visto que estas amostras foram as que apresentaram baixos teores desses componentes. Porém, é importante analisar

outros parâmetros que influenciam a hidrólise do material, como o tamanho de partícula e cristalinidade da celulose.

De posse destes dados, é possível determinar a recuperação total de açúcares antes e após a hidrólise enzimática, como ilustra a Figura 53 a seguir.





Dentre todas as condições analisadas, as amostras 90% bagaço / 10% palha e 50% bagaço / 50% palha foram as que obtiveram os maiores valores de recuperação de açúcares antes da etapa de hidrólise enzimática. Todas as misturas apresentaram valores de recuperação superiores quando comparados com as biomassas tratadas isoladamente. Não obstante, dentre todas as misturas estudadas, as amostras que apresentaram baixa recuperação de açúcares foram aquelas com maior proporção de palha.

Após a etapa de conversão enzimática, verificou-se que a recuperação total de açúcares, para todas as misturas de biomassa, obteve valores superiores com relação a palha e bagaço tratados separadamente, e que a mistura 50% bagaço / 50% palha foi a que apresentou melhores números de recuperação de glicose e xilose, principalmente. Porém, ainda assim, a recuperação de açúcar pós hidrólise enzimática ainda é baixa devida à baixa digestibilidade da fração sólida. Faz-se necessário estudar outras condições de tratamento e também outras proporções para a mistura de biomassa.

Ficou evidente o efeito sinergístico existente entre palha e bagaço e, portanto, as misturas de biomassa podem ser uma alternativa eficaz para o desenvolvimento e melhoria

na produção de etanol celulósico, uma vez que é possível aumentar consideravelmente a recuperação de açúcares fermentescíveis.

## 5.3.3 Análise Física

## 5.3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura das misturas de biomassa

As figuras 54 e 55 a seguir, tratam-se das micrografias da palha e do bagaço prétratados separadamente na condição otimizada (190°C, 5 min, 3%SO<sub>2</sub>) e de todas as misturas avaliadas neste trabalho, respectivamente. Percebe-se que a palha apresenta uma estrutura mais fibrosa, enquanto o bagaço apresenta fibras e certas aglomerações.

Figura 54: Microscopias da palha e do bagaço pre-tradado (aumento de 200x).



Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 55: Microscopias das misturas de biomassas pré-tratadas (aumento de 200x).

Fonte: Arquivo Pessoal.

Para as microscopias da Figura 54, nota-se que palha e bagaço realmente se encontram bem misturadas. Na mistura em que há 90% de palha, percebe-se que há uma maior quantidade de fibras que sofreram a ação do pré-tratamento, porém ainda sim possuem certo grau de organização, semelhante a amostra de 100% palha. Na amostra em há 90% de bagaço, a aparência é de fibras aglomeradas, semelhante a amostra de 100% bagaço, apenas com poucas fibras, "supostamente", de palha. E a amostra em que há 50% de cada biomassa aparenta um equilíbrio entre fibras e formas aglomeradas. Estas micrografias também evidenciam que o bagaço é mais suscetível ao pré-tratamento, o que explicaria os maiores valores de solubilização de hemicelulose e conversão enzimática nas amostras com maiores proporções de bagaço. No entanto, ainda seria preciso analisar melhor as imagens (com técnicas adequadas) e estudar mais a fundo os efeitos que a

combinação de biomassas pode trazer para a produção de etanol 2G. Há o sinergismo entre estas biomassas, uma vez que todas as combinações/misturas avaliadas apresentaram valores de recuperação de açúcares superiores ao da biomassa sozinha. Não se pode afirmar que este sinergismo acontece para todas as biomassas, porém, para a palha e o bagaço, os resultados iniciais foram favoráveis e este pode ser o caminho para melhorar a produção futura do etanol celulósico.

## 6. CONCLUSÃO

Constatou-se que é possível converter os subprodutos sucroalcooleiros (bagaço e palha de cana) em açúcares fermentáveis, podendo ser aproveitados para elevar a produção de etanol sem a necessidade de aumentar a área cultivável do setor. Entretanto, os dados obtidos mostraram que ainda é necessário aperfeiçoar as etapas da conversão da biomassa a fim de reduzir ao máximo as perdas de celulose presente nos materiais lignocelulósicos estudados.

Das três técnicas de pré-tratamento avaliadas (explosão a vapor catalisada por  $SO_2$ , hidrotérmico e ultrassom), somente os métodos baseados em vapor/calor foram eficientes na desagregação dos constituintes dos subprodutos sucroalcooleiros. Esses métodos foram capazes de remover grande parte da hemicelulose e uma parte da lignina, elevando a digestibilidade da celulose pelas enzimas celulolíticas. O método de pré-tratamento com ultrassom provocou o aumento da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos tanto para o agente deslignificante (soda cáustica) como para as celulases, sendo, portanto, um método não indicado, dentro da faixa das condições avaliadas, para um processo de conversão dos subprodutos sucroalcooleiros em açúcares fermentáveis. Ficaria como sugestão para trabalhos futuros avaliar outras condições para efetuar este tipo de pré-tratamento, com análises mais elaboradas (como análise de imagem) a fim de obter resultados mais promissores com a técnica.

A severidade do pré-tratamento é um importante fator a ser avaliado, assim como a o grau de cristalinidade da celulose após o pré-tratamento e deslignificação. Este último é um fator de extrema relevância para a escolha de um pré-tratamento e deslignificação que preferencialmente diminua consideravelmente a cristalinidade deixando assim a celulose mais susceptível à etapa seguinte de hidrólise enzimática. Em todas as condições (hidrotérmico e ultrassom), houve uma diminuição da cristalinidade da celulose, uma vez que grande parte da fração amorfa foi removida.

A etapa de deslignificação com soda cáustica foi essencial para elevar a digestibilidade do bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico e por ultrassom. Para os materiais lignocelulósicos pré-tratados com ultrassom, principalmente, essa etapa foi fundamental para aumentar a conversão de celulose.

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram importantes para averiguação do aconteceu com o material antes e após as etapas de pré-tratamento e deslignificação. Foi possível confirmar algumas hipóteses por meio das imagens, como no caso das amostras pré-tratadas por ultrassom, em que foi possível visualizar apenas as mudanças superficiais das fibras, diferentemente do que ocorre com as amostras submetidas ao tratamento hidrotérmico ou por explosão a vapor, em que ocorre a nítida desconstrução da estrutura lignocelulósica, principalmente após a deslignificação alcalina.

Para o tratamento hidrotérmico, a melhor condição foi R6 (170°C, 10 min), apresentando conversão global de celulose em glicose de 65% (considerando todas as perdas das etapas de pré-tratamento e deslignificação). Para o ultrassom, os melhores resultados obtidos foram paras as polpas previamente pré-tratadas em meio aquoso. Ainda há a necessidade de se estudar melhor o efeito de cada técnica de tratamento na palha de cana.

## - Para as misturas de biomassa:

O tratamento por explosão a vapor é um dos mais efetivos métodos de prétratamentos do material lignocelulósico. A adição de SO<sub>2</sub> como um catalisador ácido aumenta a eficiência do pré-tratamento, pois provoca a diminuição do tempo de residência e o uso de menores temperaturas. Nesse estudo, palha e bagaço de cana foram pré-tratados pelo método citado acima, utilizado três diferentes condições (para cada biomassa). A temperatura variou de 190 a 200°C, e o tempo de residência foi fixado em 5 minutos. Após encontrar a condição ótima para cada biomassa (190°C, 5 min, 3% SO<sub>2</sub>), a segunda parte deste trabalho foi realizada com o objetivo de testar 3 diferentes proporções de misturas de palha e bagaço e observar e o efeito sinergístico entre as biomassas, além de verificar a recuperação total de açúcares ao final do processo.

Baseado nos resultados encontrados, é possível concluir que:

✓ O pré-tratamento por explosão a vapor catalisado por SO₂ pode simultaneamente processar matéria-prima mista (neste caso, mistura de palha e bagaço). Este é um fato muito importante, visto que são fontes celulósicas altamente abundantes, presentes em quantidades diferentes em distintas épocas do ano e mistura-las pode melhorar a produção global de etanol;

- Misturar palha e bagaço de cana afeta positivamente o processo de bioconversão. Todas as misturas apresentaram resultados de recuperação de açúcares superiores quando comparados com as biomassas tratadas isoladamente, sendo que a melhor proporção, ou seja, a que apresentou os mehores valores de recuperação de açúcares, foi a amostra 50% Palha / 50% Bagaço;
- Há potencial para o uso das misturas destas biomassas para a produção não só de etanol celulósico, mas também para produção de outros químicos e bioprodutos dentro do conceito de biorrefinaria;
- ✓ Este trabalho pode mudar o pensamento negativo sobre o impacto que a heterogeneidade dessas biomassas pode causar durante o bioprocessamento;
- ✓ Em geral, há um efeito sinergístico entre palha e bagaço. Mesmo sendo dois matérias de características heterogêneas, as misturas se mostram mais eficientes. Este efeito deve ser estudado cuidadosamente para que haja o entendimento de como o processo funciona e como pode melhorar mais a produção de bioetanol e outros produtos derivados da biorrefinaria. O MEV das amostras deu pistas para o entendimento do sinergismo, porém são apenas especulações. Será necessário avaliar novas proporções e utilizar técnicas diferencias de análise.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, poderiam ser avaliados/feitos:

- Condições diferentes de pré-tratamento por ultrassom, onde se possa variar a potência do equipamento;
- Análise de imagem para investigar melhor o efeito dos pré-tratamentos na fibra lignocelulósica;
- Trabalhar com modelagem e simulação;
- Análise do ciclo de vida e análise econômica do processo;
- > Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados ricos em glicose;
- Estudar novas proporções de misturas de palha e bagaço e também fazer o teste com outros pré-tratamentos.
## REFERÊNCIAS

ADEWUYI, Y.G. Sonochemistry: environmental science and engineering **Applications. Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 22, p. 4681-4715, 2001.

AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.

AGRO. **Colheita mecanizada abrange 65% da área de cana em SP**. Disponível em: <a href="http://souagro.com.br/colheita-mecanizada-abrange-mais-de-90-da-area-de-cana-em-sp">http://souagro.com.br/colheita-mecanizada-abrange-mais-de-90-da-area-de-cana-em-sp</a>. Acesso em: 06 set. 2011.

AIMIN, T.; HONGWEI, Z.; GANG, C.; GUOHUI, X.; WENZHI, L. Influence of ultrasound treatment on accessibility and regioselective oxidation reactivity of cellulose. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 6, p. 467–472, 2005.

AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v.4, p. 875-877, 2007.

ALENCAR, K. Análise do balanço entre demanda por etanol e oferta de cana-deaçúcarno Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v .101, p. 4851–4861, 2010.

AVVARU, B.; PATIL, M.N.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. Ultrasonic atomization: effect of liquid phase properties. **Ultrasonics**, v. 44, n. 2, p. 146–158, 2006.

BABCOCK, L.W. Method of Producing Fermentable Sugars and Alcohol from Wood. US 1825464, 26 abr. 1932.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; Lv, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bioethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 32, p. 60-88, 2015.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Convers. Manage**, v. 52, p. 52-85, 2012.

BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. **Progress Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.

BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 130, n. 1-3, p. 496-508, 2006.

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, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

BANSAL, P. et al. Modeling celulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Rev.**, v. 13 p. 25-58, 2004.

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGUM; BOERJAN, W. Biosynthesis andgenetic engineering of lignin. Crit. **Rev. Plant Sci**, v. 17 p. 125–97, 1998.

BAUGH, K. D.; LEVY, J. A.; & MCCARTY, P. L. Thermochemical pretreatment of lignocellulose to enhance methane fermentation: II. Evaluation and application of pretreatment model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 62-70, 1988.

BERGGREN, R.; MOLIN, U.; BERTHOLD, F.; LENNHOLM, H.; LINDSTRÖN, 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.B.; 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.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Prog. Polym. Sci.**, v.19, p.797–841, 1994.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Biotechnol Prog**, v. 25, p. 315-322, 2009.

BURA, R.; EWANICK, S.; GUSTAFSON, R. Assessment of Arundo donax (giant reed) as feedstock for conversion to ethanol. **Tappi journal**, v.11, p. 59-66, 2012.

BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast Rhodotorula mucilaginosa strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. Journal of industrial microbiology & biotechnology, v. 39, p. 1003-1011, 2012.

BRADSHAW, M. J. Global energy dilemmas: a geographical perspective. Geogra J., 2010.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Cioresource Technology**, p. 4862-4874, nov. 2009.

BROWNELL, H. H.; YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. **Biotechnol. Bioeng**., v.28, p. 792-801, 1986.

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, n. 2, p. 423-429, 2006.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. Journal of Scientific and Industrial Research, v.67, p.849-864, 2008.

CARVALHO, M. Lucas de. Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1291-1296, 2002.

CERRI, C. Mudança de estoque de carbono no solo. In: WORKSHOP ON THE IMPACT OF NEW TECHNOLOGIES ON THE SUSTENTABILITY OF THE SUGARCANE. 2009. Brasil.

CHANDRA, R. P., BURA, R., MABEE, W., BERLIN, A., PAN, X., & SADDLER, J. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Biofuels**, 2012.

CHEN, Y., CHENG, J. J., & CREAMER, K. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4044-4064, 2008.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresour. Technol**, v. 102, p. 71–81, 2011.

CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renew. Energy**, v. 36, 2011.

CHU, S.; MAJUMDAR, A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. **Nature**, p. 294-303, 2012.

CHUM, H. L., JOHNSON, D. K., BLACK, S. K., & OVEREND, R. P. Pretreatmentcatalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1990.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - Safra 2014/2015. Brasília. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 16 jul. 2015.

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.

CYBULSKA, I.; BRUDECKI, G.; LEI, H. Chapter 4: Hydrothermal pretreatment of lignocelulosic biomass. Green Biomass Pretreatment for Bioefuels Production, SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustaintability. T.Gu. (ed), 2013.

DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Pretreatment of sugar cane bagasse for enhanced ruminal digestion. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 57/58, p. 171-182, 1996.

DIAS, O.S.M.; ENSINAS, V.A.; NEBRA, A.S.; FILHO, M.R.; ROSSELL, E.V.C.; MACIEL, R.W.M.Production of bioethanol and other biobased materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical engineering research and design**, v. 87, p. 1206–1216, 2009.

DÍAZ, M.J.; CARA, C.; RUIZ, E.; PÉREZ-BONILLA, M.; CASTRO, E. Hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3225–3229, 2011.

DONALDSON, L.A. Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. **Phytochemistry**, v. 57, p.859–73, 2001.

DORAN, J.B.; ALDRICH, H.C.; INGRAN, L.O. Saccharification and fermentation of sugar cane bagasse by Klebsiella oxytoca P2 containing chromasomally integrated genes encoding the Zymomonas mobilis ethanol pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 2, p. 240-247, 1994.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Pulp and paper chemistry and technology. Berlin: Walter de Gruyter, 2009, v.1.

**EPA**. Environmental Protection Agency. **Sulfur Dioxide (SO<sub>2</sub>) Primary National Ambient Air Quality Standards**. National Ambient Air Quality Standards (NAAQS). Endereço: <u>http://www.epa.gov/oaqps001/sulfurdioxide/index.html</u>. Acesso em: 10 ago. 2010.

EWANICK, S.; BURA, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yieldsfrom steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2651-2658, 2011.

EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of steam- exploded poplar wood. **Biotechnol. Bioeng**.,v. 38, p. 1308-1317, 1991

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

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004, cap. 6, p. 215-244.

FOX, D. J.; GRAY, P. P.; DUNN, N. W.; MARSDEN, W. L. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimised pretreatment conditions. **J. Tech. Biotechnol.**, v. 44, p. 135-146, 1989.

GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y. Effects of diferente pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.144, p.396-400, 2013.

GARDNER, N.; RODRIGUE, N.; CHAMPAGNE, C. P. Combined effects of sulfites, temperature, and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, p. 2022-2028, 1993.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werkst**, v.57, p. 191–202,1999.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, C.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775-4800, 2010.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMNETO, 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**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

GUPTA, V.K., POTUMARTHI, R., O'DONOVAN, A., KUBICEK, C.P., SHARMA, G.D., TUOHY, M.G., Chapter 2 – bioenergy research: an overview on technological developments and bioresources. **Bioenergy Research: Advances and Applications**, 2015.

HAN, G.; DENG, J.; ZHANG, S.; BICHO, P.; WU, O. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 28–33, 2010.

HEITZ, M.; CHORNET, E.; CAPEK, E.; KOEBERLE, P.; GAGNÉ, J.; OVEREND, R. P.; TAYLOR, J. D.; YU, E. Fractionation of Populus Tremuloides at the Pilot Plant Level: Optimization of Pretreatment Conditions Via Steam Explosion Using the STAKE II Technology. In: CANADIAN BIOENERGY R&D SEMINAR, 7., 1989.

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.; DING.S.Y.; JONHSON 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.

HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, WENSHAN. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresources Thecnology**, v. 169, p. 742-749, 2014.

HOLTZAPPLE, M. T.; JUN, J.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S. L.; DALE, B. D. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. A practical lignocellulose pretreatment. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 28/29, p. 59-74, 1991.

HONGZHANG, C.; LIYING L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v.98, p. 666-676, 2007.

HROMADKOVA, Z.; KOVACIKOVA, J.; EBRINGEROVA, A. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of corn cob xylan. **Industrial Crops and Products**, v. 9, n. 2, p. 101-109, 1999.

HUANG, X. F.; SANTHANAM N.; BADRI, D V, HUNTER W J, MANTER D K, DEKER S R, et al. Isolation and characterization of lignin-degrading bactéria from rain forest soils. **Biotechnol Bioeng**, 2013.

IBRAHIM, M.M.; EL-ZAWAWY, W.K.; ABDEL-FATTAH, Y.R.; SOLIMAN, N.A.; AGBLEVOR, F.A. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 720–726, 2011.

**IEA**, International Energy Agency. **Key World Energy Statistics**, 2009, disponivel em: http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2009/key\_stats\_2009.pdf. Acesso em: 10 jul. 2010.

**IEA**, International Energy Agency. **Sustainable production of second-generation biofuels:** potential and perspectives in major economies and developing countries. Paris, IEA/OECD, 2010.

IEA, International Energy Agency. World Energy Outlook 2013. Paris, IEA/OECD, 2013.

IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 2, p. 79-83, 2004.

IPCC - Intergovernmental panel on climate change. Climate Change 2013 – The Physical Science Basis. Inglaterra, 2013.

JIN, S.; CHEN, H. Superfine grinding of steam-exploded rice straw and its enzymatic hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 3, p. 225–230, 2006.

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

KADIMALIEV, D.A.; REVIN, V.V.; ATYKYAN, N.A.; SAMUILOV, V.D. Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 488–492, 2003.

KARDOS, N.; LUCHE, J.L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. Carbohydrate Research, v. 332, n. 2, p. 115-131, 2001.

KELLER, F.A. Integrated bioprocess development. In: WYMAN, C.E. (Ed.) **Handbook on bioethanol**: production and utilization. Washington: Taylor & Francis, 1996. cap. 17, p. 381-394.

KITANI, O.; HALL, C.W. Biomass handbook. Boston, Routledge Publisher, 1989.

KITAMAKI, Y.; ZHU, Y. B.; INAGAKI, S.; MATSUO, M.; TANIGUCHI, S.; NUMATA, M. et al. Determination of sulfur in bioethanol certified reference material. **J. Petrol Inst**, v. 5, p. 56-171, 2013.

## KONDO, T. J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Physics v. 35, p. 717, 1997.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? **Bioresour. Technol.**, v.100, p. 4193–4202, 2009.

LABAT, G.A.A.; GONÇALVES, A.R. Oxidation in acidic medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 151-161, 2008.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, G. S.; LICHWA, J.; ANTAL, JR. M.J.; LYND, R.L. 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.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? **Bioresour. Technol.**, v.100,p. 4193–4202, 2009.

LEE, R. A., LAVOIE, J.M. From first-to third-generation biofuels: challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. **Anim. Front**, v. 3, p. 6–11, 2013.

LEUSTEAN, I. Bioethanol from lignocellulosic materials. Journal of Agroalimentary Processes & Technologies, v.15, p.94-101, 2009.

LEVAN, S.L.; ROSS, R.J.; WINANDY, J.E. **Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures.** Disponivel em: http://128.104.77.228/documnts/fplrp/fplrp498.pdf Acesso em 27 de março de 2012.

LI, C.; YOSHIMOTO, M.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 155–164, 2004.

LI, C.; YOSHIMOTO, M.; OGATA, H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 5, p. 373–384, 2005.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLRSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061-3068, 2007.

LIU, S. H.; LIU, X. F. Technological development of non-grain based fuel etanol production. Liquor Making, v. 37, 2010.

LIU, C.F.; SUN, R.C.; YE, J Structural and thermal characterization of sugarcane bagasse phthalates prepared with ultrasound irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 280-288, 2006.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress Energ. Combust. Sci.** 2012.

LUCHE, J.-L. Synthetic organic sonochemistry. New York: Plenum Press, 1998.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LOMAX, T. D.; MACKIE, K. L.; MEDER, R.; CROUCHER, M.; BURTON, R. J. Steam explosion of Pinus radiata bark. **J. Wood Chem. Technol.**, v. 14, n. 4, p. 539-561, 1994.

MA, Y.-Q.; CHEN, J.-C.; LIU, D.-H.; YE, X.-Q. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 1, p. 57–62, 2009.

MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using Penicillium funiculosum and Trichoderma harzianum cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p.1196-1201, maio 2011.

MANDELS, M.; ANDREOTT, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 2-34, 1976.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol Prog**, v. 15, 1999.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose utilizing Saccharomyces cerevisiae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 274-282, 2011.

MENDES, F. M. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. 2010. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

MARTINEZ, A.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARE-RO, S.; GUILLEN, F., et al. Bio-degradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int. J. Microbiol**, v. 8, p. 8-30, 2005.

MASON, W.H. Process and apparatus for disintegration of wood and the like. US 1578609, 1926.

MAZIERO, P. Estudos topoquímicos durante obtenção de etanol a partir de celulose de bagaço e palha de cana-de-açúcar. 2013. 171p. Tese (Doutorado em Ciências)-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2013.

MENDU, V.; SHEARIN, T.; CAMPBELL, J. E.; STORK, J.; JAE, J.; CROCKER, M., et al. Global bioenergy potential from high-lignin agricultural residue. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1956.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of Lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium. **Biodeteriot. Biodegr.**, v. 50, p. 101-105, 2002. MONIRUZZAMAN, M. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. **Bioresource Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 111-117, 1996.

MORIYA, R.Y.; GONÇALVES, A.R.; DUARTE, M.C.T. Ethanol/water pulps from sugarcane straw and their biobleaching with xylanase from Bacillus pumilus. **Applied Biochem Biotechnol**, p.136-140,2007b.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; HOLTZAPPLE, Y.Y.L.M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol**, v. 96, p.673–86, 2005a.

NEUREITER, M. et al. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49-58, 2002.

**NREL**. National Renewable Energy Laboratory. **Biomass Research**: Disponivel em <u>http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.htm</u>. Acesso em 10 abr. 2009.

OLIVEIRA, L.R.M. Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose. 2012. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, 1996.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, n. 1561, p.523-536, 1987.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of Saccharomyces cerevisiae in batch culture. **Biotechnology** and **Bioengineering**, 1999.

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**, v. 124, n. 1-3, p. 1069-1079, 2005.

PANDEY, A. et al. (Ed). **Biofuels**: Alternative Feedstocks and Conversion Processes. San Diego: Academic Press Publisher, 2011.

PARAJÓ, J. C; ALONSO, J. L.; SANTOS, V. Enzymatic hydrolysis of wood: na engineering assessment. **Bioproc. Eng.**, v. 12, p. 253-261, 1995a.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PLANT. Detailed chemical structure of a portion of lignina molecule. Disponível em: <u>http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=24</u>. Acesso em: 14 mar. 2012.

PILKINGTON, B. J.; ROSE, A. H. Reactions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* to Sulphite. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 2823-2830, 1988.

PRASAD S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as na alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resour Conserv Recycl.**, v. 50, p. 1-39, 2007.

RABELO, S.C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7887–7895, 2011.

RAHIKAINEN, J.; MIKANDER, S.; MARJAMAA, K.; TAMMINEN, T.; LAPPAS, A.; VIIKARI, L.; KRUUS, K. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation of lignin-rich surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108(12), p. 2823-2834, 2011.

RAMOS, L. P., BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 34/35, p. 37-48, 1992b.

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

RAMOS, R. A. Correlação entre propriedades físico-químicas de celuloses e sua solubilização e derivatização em LiCl/DMAc e DMSO/TBAF.3H<sub>2</sub>O. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química de São Calos, USP,São Carlos, 2005.

REDDY, N.; YANG, Y. Trends Biotechnol. 2005.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology** for **Biofuels**. v.4, 2011, doi:10.1186/1754-6834-4-54

RICHARDS, W.T.; LOOMIS, A.L. The chemical effect of high frequency sound waves. **Journal of American Chemical Society**, v. 49, p. 3086–3100, 1927.

ROCHA, G.J.M.; GONCÁLVES A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p. 274–279, 2012.

ROCHA, G. J. M; MARTÍN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M; BAUDEL, H. M; ABREU, C. A. M. Diluted mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bionergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

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, 1., 1997, Curitiba. **Anais**...Curitiba: UFPR. p. 3-8.

RODRIGUES, S.; PINTO, G.A.S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (Cocos nucifera) shell powder. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 869–872, 2007.

SAAD, M.B.W.; OLIVEIRA, L.R.M.; CÂNDIDO, R.G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 220-225, 2008.

SAAD, M. B. W. Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

SCHÜTT, F.; HAAS NILS, P.; DEHNE, L.; KOCH, G.; JANZON, R.; SAAKE, B. Steam pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar wood: comparison of optimal conditions with and without SO<sub>2</sub> impregnation. **Biotechnology Bioenergy**, v. 67, 2013.

SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. **Biotechnol. Bioeng**., v. 24, p. 1389-1402, 1982.

SAEMAN, J. F. Key factors in the hydrolysis of cellulose. In: KLASS, D. L. (Ed.). Biomass as a nonfossil fuel source. Washington: ACS, 1981. v. 144, p. 185-197.

SAKA, S.; GORING, D.A.I. Localization of lignins in wood cell walls. In: **BIOSYNTHESIS** and biodegradation of wood componentes. Estados Unidos: Ed. T Higuchi, 1985. p. 51–62.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from diferente feedstocks. **Bioresour. Technology**, v. 99, p. 52-70, 2008.

SANGAVE, P.C.; PANDIT, A.B. Ultrasound pre-treatment for enhanced biodegradability of the distillery wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 3-4, p. 197–203, 2004.

SAN MARTIN, R.; PEREZ, C.; BRIONES, R. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (Pinus radiata) using steam explosion. **Biores. Technol.**, v. 53, p. 217-223, 1995.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-deaçúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SÃO PAULO, **Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo**. Lei nº 11.241, de 19 set. 2002. Disponível em: <a href="http://www.al.sp.gov.br/legislacao/norma.do?id=217">http://www.al.sp.gov.br/legislacao/norma.do?id=217</a>>. Acesso em 09 abr. 2011.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renew. Energy**, v. 37, 2012.

SAWADA, T.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F.; KUWAHAR, M.; WATANABLE. T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 48, p. 719-724, 1995.

SCHUCHARDT, U.; GONÇALVES, A.R. Hydrogenolysis of Lignins. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 98-100, n. 1-9, p. 1213-1219, 2002.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de Lund, Suécia, 2005.

SILVA, Vinícius.F. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 2009. Dissertação (Mestrado) - USP – Escola de Engenharia de Lorena, 2009b.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 38, n. 7, 809-817, 2011.

SIMS, R.E.H., MABEE, W., SADDLER, J.N., TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresour. Technology**, v. 101, p. 1570–1580, 2010.

SMITH, D. C.; WOOD, T. M. Xylanase production by Aspergillus awamori, development of a médium and optimization of the fermentation parameters for the production of extracelular xylanase and xylosidase while maintainin glow protease production. **Biotechnol Bioeng.**, v. 90, 1991.

STAR-COLIBRI. Joint european biorefinery vision for 2030 strategic targets for 2020. In: **EU FRAMEWORK PROGRAM**, 7., 2011.

STICKLEN, B.M. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature reviews genetics**, v.9, p. 433-443, 2008. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic material for etanol production: a review. **BioresourTechnol.**, p. 96-103, 2002.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.

SUN, R.C.; TOMKINSON, J. Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 3, p. 263–271, 2002.

SWADDLE, T. W. **Inorganic Chemistry** - an industrial and environmental perspective. Estados Unidos: Elsevier, 1990.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007a.

TANIGUCHI, M.; TAKAHASHI, D.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; KOUYA, T.; TANAKA, T. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with Pleurotus ostreatus for the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 449–452, 2010.

TAPPI Standard Methods T-222 om-98: Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Atlana: TAPPI Press, 1998.

ÚNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Bioeletricidade**: a energia verde e inteligente do brasil. Disponível em: <www.unicadata.com.br>. Acesso em: 22 jul. 2015.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-193, 2010.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7119–7123, 2011.

VIGNON, M. R.; JALDON, G.; DUPEYRE, D. Steam explosion of woody hemp chenevotte. **Biotecnology Bioeng.**, v. 12, p. 22-42, 1995.

VINK, H. Degradation of cellulose and cellulose derivatives by acid hydrolysis. **Makromolekulare Chemie**, v. 94, n. 1, p. 1-14, 1966.

WANG, X.; FANG, G.; HU, C.; DU, T. Application of ultrasonic waves in activation of microcrystalline cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 5, p. 2762–2767, 2008.

WANG, G. S., PAN, X. J., ZHU, J. Y., GLEISNER, R., & ROCKWOOD, D. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. **Biotechnol Prog**, v. 25, p. 1086-1093, 2009.

WEIL, J., SARIKAYA, A., RAU, S.-L., GOETZ, J., LADISCH, C. M., BREWER, M., LADISCH, M. R. Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 68, p. 21-40, 1997.

WEIL, J.; WESTGATE, P.; KOHLMAN, K.; LADISH, M. R. Cellulose pretreatment of lignocellulosic substrate. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, 1994.

WILDERER, P. A. Global crises challenge environmental science and biotechnology. Science. Biotechnology, v. 8, 2009.

WYMAN, C. E.; YANG, B. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. **Biofuels**, v. 63, 2009.

WINANDY, J.E. Effects of fire retardant treatments after 19 months of exposure at 150F. Disponível em: http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/fplrn/fplrn264.pdf. Acesso em: 20 março 2012.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

XIANG, Q. Conversion of lignocellulosic substrate into chemicals: kinetic study of dilute acid hydrolysis and lignin utilization. 2002. 163f. Tese (Doutorado) – Universidade de Auburn, Alabama, 2002.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. Biofuels, **Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p.26-40, 2008.

YANG, L.; CAO, J.; JIN, Y.; CHANG, H. M.; JAMEEL, H.; PHILLIPS, R.; LI, Z. Effects of sodium carbonate pretreatment on the chemical compositions and enzymatic saccharafication of rice straw. **Bioresource Technology**, v.124, p.283-291, 2012.

YOUNG, F.R. Cavitation. New York: McGraw-Hill, 1989. 434 p.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 903–908, 2009.

ZHANG, Y.; FU, E.; LIANG, J. Effect of ultrasonic waves on the saccharification processes of lignocellulose. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 10, p. 1510-1515, 2008.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2008.

ZHENG, Y. I.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Appl. Energy, 2009.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; LABAVITCH, J.; WANG, D. Adsorption characteristics of cellulase and  $\beta$ -glucosidase to lignin, cellulose and pretreated creeping wild ryegrass. In: ANNUAL INTERNATIONAL MEETING SPONSORED ASABE, 2007, Minneapolis.