UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FERNANDO MOREIRA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação
alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**

Lorena
2010

FERNANDO MOREIRA VASCONCELOS DE OLIVEIRA

**Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação
alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**

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

Orientador: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha

Lorena
2010

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

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

Oliveira, Fernando Moreira Vasconcelos de

Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana / Fernando Moreira Vasconcelos de Oliveira; orientador George Jackson de Moraes Rocha. – Lorena: 2010.

98 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Palha de cana-de-açúcar (Pré-tratamento) 2. Deslignificação 3. Hidrólise enzimática 4. Etanol. I. Título

662.636 - CDU

*Esta dissertação é dedicada aos meus pais,
Fernando e Isabel, pelas palavras e por todo
apoio que me foi concedido*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me agraciar com sabedoria, espiritualidade e força para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, Fernando e Isabel que desde o início apoiaram a minha escolha profissional e tudo fizeram para o meu sucesso.

Ao meu orientador, George Jackson de Moraes Rocha, pela oportunidade de participar do projeto Bioetanol através do Grupo de Conversão de Biomassa, Modelagem e Simulação da EEL-USP, pela sua amizade e por todo seu apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao FINEP e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Adilson Gonçalves por sua grande contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Edgardo Olivares do Centro de Tecnologia Nacional do Bioetanol – CTBE por sua colaboração na elaboração deste trabalho.

Ao Artur, João Gomes e todos os funcionários da Usina Olho D'água S/A pela ajuda prestada na realização das reações de pré-tratamento por explosão a vapor.

Ao técnico José Carlos pela amizade e grande colaboração nas etapas de pré-tratamento.

Às técnicas Cibele Rosa e Jussara Salet, pela amizade e grande apoio prestado para o andamento deste trabalho.

Ao técnico Sidnei do Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS pelo apoio na realização das análises de MEV.

Ao pessoal do laboratório: Bruno, Carol, Naila, Neto, Patrícia, Priscila, Rafael, Vinícius, e a todos os outros pela amizade e ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Aos professores Irapuan Pinheiro e Ana Maria, do Instituto de Ciências Fisiológicas da UPE e do Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela colaboração em parte do trabalho.

À Novozymes Latin America Ltda pelas enzimas gentilmente cedidas.

A todos os professores e técnicos do Departamento de Biotecnologia e demais funcionários da EEL-USP pela ajuda e amizade construída ao longo desse trabalho.

Ao pessoal do DEBIQ: Bruno, Carol, Celso, Cláudio, Fernando, Flávio, Germano, Gina, Guilherme, Juan, Juliana, Mário, Paula, Robson, Sérgio, Tati, Vitor, Wagner, pelos ensinamentos, ajuda e companheirismo durante o mestrado.

Aos alunos Juliana, Isaías, Solange e Vanessa da UFPE por colaborarem na etapa de fermentação dos hidrolisados enzimáticos.

RESUMO

OLIVEIRA, F.M.V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010

No Brasil o etanol é considerado a melhor escolha para reduzir as dependências dos combustíveis fósseis. Para atender as metas de produção desse combustível renovável, fontes de materiais lignocelulósicos podem ser utilizadas com o intuito de se aproveitar a fração celulósica para obtenção de açúcar fermentável. Contudo, é preciso desenvolver métodos de pré-tratamento eficientes e economicamente viáveis custo para reduzir a recalcitrância da biomassa vegetal *in natura*, aumentando dessa forma a eficiência da etapa de hidrólise enzimática. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do pré-tratamento por explosão a vapor e do pré-tratamento com ácido diluído, seguidos ou não de uma etapa de deslignificação alcalina, na hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado em reator de 2,5 m³ sob temperaturas de 180 °C, 190 °C e 200 °C, por 15 min. O pré-tratamento com ácido diluído (1% m:m) foi feito em reator rotatório de 20 L a 180 °C, 185 °C, 190 °C e 195 °C, por 10 min. A etapa de deslignificação com NaOH (1% m:v) foi feita a 100 °C, por 1 h, em reator de 350 L para a palha pré-tratada por explosão a vapor e em ampolas de 500 mL para a palha de cana pré-tratada com ácido diluído. Amostras de todos os tratamentos foram analisadas por FTIR e MEV. Foram feitos ensaios de hidrólise enzimática utilizando Celluclast 1.5L (15 FPU/g de amostra) e β -Glucosidase (10 UI/g de amostra). Os hidrolisados enzimáticos foram usados em testes de fermentabilidade conduzidos a 30 °C por 48 h utilizando *S. cerevisiae* UFPEDA 1238. Através de ambos pré-tratamentos foi possível remover mais de 90% de hemicelulose. O pré-tratamento com ácido diluído provocou uma maior degradação da celulose em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor, bem como uma maior solubilização da lignina. A etapa de deslignificação alcalina somada ao pré-tratamento contribuiu para a remoção de até 80% da lignina. Análises de FTIR e MEV revelaram alterações das bandas de vibração dos grupamentos químicos e mudanças morfológicas das amostras tratadas em relação à palha *in natura*. O pré-tratamento por explosão a vapor a 200 °C promoveu a maior conversão enzimática (80%) e esse percentual foi aumentado para 85% pela aplicação da deslignificação alcalina. A fermentação dos hidrolisados enzimáticos se mostrou satisfatória, apresentando percentuais de eficiência acima de 70%.

Palavras-chave: Palha de cana (Pré-tratamento). Deslignificação. Hidrólise Enzimática. Etanol

ABSTRACT

OLIVEIRA, F.M.V. **Evaluation of different pretreatments and alkaline delignification to saccharification of cellulose from sugarcane straw**. 2010. 98 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010

In Brazil, ethanol is considered the best alternative to reduce dependence on fossil fuels. In order to enhance the production of this renewable fuel, lignocellulosic materials must be used with the goal of harnessing the cellulosic fraction to obtain fermentable sugar. However, an efficient pretreatment method to reduce recalcitrance of raw material is required for increasing the efficiency of enzymatic hydrolysis. This study aimed to evaluate the effect of two pretreatments, steam explosion and dilute acid, followed or not by an alkaline delignification, on enzymatic hydrolysis of sugarcane straw. Steam explosion was conducted in 2.5 m³ reactor at temperatures of 180 °C, 190 °C and 200 °C for 15 min. Dilute acid pretreatment was carried out in 20 L reactor at 180 °C, 185 °C, 190 °C and 195 °C for 10 min, using H₂SO₄ (1% w:w). Alkaline delignification was made with NaOH (1% w:v) at 100 °C for 1 h. Samples of all treatments were analyzed by FTIR and SEM. Enzymatic hydrolysis was performed with commercial cellulase Celluclast 1.5L (15 FPU/w of sample) and β -Glucosidase (10 IU/w of sample). Alcoholic fermentation by *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 was conducted at 30 °C for 48 h. The pretreatments studied were able to remove over 90% of hemicellulose fraction. Higher degradation of cellulose and lignin fractions was observed during diluted acid pretreatment. Alkaline delignification contributed to the removal of more than 80% of lignin. FTIR and SEM analysis revealed changes in the vibration bands of chemical groups and morphological variation of the treated samples compared to raw material. Steam explosion at 200 °C promoted the higher enzymatic conversion (80%) and this percentage was increased to 85% by application of alkaline delignification. Fermentation tests efficiency was above than 70%.

Keywords: Sugarcane straw (pretreatment). Delignification. Enzymatic Hydrolysis. Ethanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Ilustração de um espécime da cana-de-açúcar.....	22
Figura 2.2	Produção de cana-de-açúcar no mundo.....	23
Figura 2.3	Estrutura da parede celular e a distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na fibra vegetal.....	25
Figura 2.4	Representação da molécula de celobiose e do polímero de celulose.....	26
Figura 2.5	Açúcares constituintes das hemiceluloses. (1) D-glucose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-glucurônico.....	27
Figura 2.6	Estrutura de uma hemicelulose presente em gramíneas e seus monômeros constituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabino-furanose; (4-Me)-GlcA = ác. (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico.....	27
Figura 2.7	Via metabólica da xilose e da glicose em leveduras.....	28
Figura 2.8	Unidades de hidroxifenila (a), guaiacila (b) e siringila (c), formadoras da estrutura molecular da lignina.....	29
Figura 2.9	Estrutura molecular da uma lignina e seus tipos de ligações.....	30
Figura 2.10	Produção de etanol a partir da biomassa vegetal.....	31
Figura 2.11	Desestruturação da fibra vegetal pelo efeito de um pré-tratamento.....	32
Figura 2.12	Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP = 3), (4) xilooligômeros de grande massa molecular, (5) oligosacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celooligômeros, (9) furfural, (10) hidroximetilfurfural, (11) ácido levulínico, (12) furano e (13) ácido furóico. Também ocorre formação de ácido fórmico e ácido acético.....	34
Figura 2.13	Modo de ação das celulasas e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose.....	39
Figura 4.1	(1) Visão geral do reator de explosão a vapor, (2) sacos com a palha de cana, (3) transporte dos sacos até a plataforma do reator, (4) carregamento do reator, (5) momento da descompressão e (6) coleta da palha pré-tratada.....	43
Figura 4.2	Reator rotatório REGMED usado nas reações de pré-tratamento com ácido diluído.....	45

Figura 5.1	Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através do pré-tratamento por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C.....	62
Figura 5.2	Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através do pré-tratamento com ácido diluído a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C e (4) 195 °C.....	65
Figura 5.3	Comparação entre o pré-tratamento por explosão a vapor (EV) e o pré-tratamento com ácido diluído (AD) nas mesmas temperaturas bem como seus respectivos rendimentos (R).....	66
Figura 5.4	Rampas de aquecimento das reações de pré-tratamento com ácido diluído no reator REGMED AU/E 20.....	68
Figura 5.5	Correlação linear do percentual de solubilização da hemicelulose em função do índice de severidade do pré-tratamento por explosão a vapor.....	70
Figura 5.6	Correlação linear do percentual de solubilização da hemicelulose e lignina em função do índice de severidade do pré-tratamento com ácido diluído.....	70
Figura 5.7	Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e da deslignificação alcalina.....	72
Figura 5.8	Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento com ácido diluído a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C, (4) 195 °C e da deslignificação alcalina.....	75
Figura 5.9	Espectros de FTIR da palha de cana “in natura” (—) e pré-tratada por explosão a vapor a 180 °C (—), a 190 °C (—) e a 200 °C (—).....	76
Figura 5.10	Espectros de FTIR da palha de cana “in natura” (—) e pré-tratada por explosão a vapor a 180 °C (—), a 190 °C (—) e a 200 °C (—), seguida de deslignificação.....	77
Figura 5.11	Espectros de FTIR da palha de cana “in natura” (—) e pré-tratada com ácido diluído a 180°C (—), a 185°C (—), a 190°C (—) e a 195°C (—).....	77
Figura 5.12	Espectros FTIR da palha de cana “in natura” (—) e pré-tratada com ácido diluído a 180 °C (—), a 185 °C (—), a 190 °C (—) e a 195 °C (—), seguida de deslignificação.....	78
Figura 5.13	Micrografias da palha de cana <i>in natura</i> . Mag. 500x e 1000x.....	79
Figura 5.14	Micrografias da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor. Mag. 500x e 1000x.....	80
Figura 5.15	Micrografias da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada. Mag. 500x e 1000x.....	80

Figura 5.16	Micrografias da palha de cana pré-tratada com ácido diluído. Mag. 500x e 1000x.....	81
Figura 5.17	Micrografias da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada. Mag. 500x e 1000x.....	81
Figura 5.18	Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C.....	82
Figura 5.19	Percentual de glicose obtida pela hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C.....	83
Figura 5.20	Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e deslignificada.....	83
Figura 5.21	Percentual de glicose obtida pela hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e deslignificada.....	84
Figura 5.22	Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada com ácido diluído a (1) 180°C, (2) 185°C, (3) 190°C e (4) 195°C.....	85
Figura 5.23	Percentual de glicose obtida após a etapa de hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada com ácido diluído a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C e (4) 195 °C.....	85
Figura 5.24	Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190°C e (4) 195 °C e deslignificada.....	86
Figura 5.25	Percentual de glicose obtida após a etapa de hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C, (4) 195 °C e deslignificada.....	86
Figura 5.26	Correlação linear da conversão enzimática em função da solubilização de hemicelulose e lignina pelo pré-tratamento com ácido diluído celulósica.....	87
Figura 5.27	Perfil de fermentação do experimento controle, do hidrolisado enzimático da palha <i>in natura</i> e da palha de cana tratada sob diferentes condições.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Índice de monóxido de carbono, hidrocarbonetos, óxidos de nitrogênio e aldeídos emitidos por carros leves no Brasil.....	20
Tabela 2.2	Classificação taxonômica da cana-de-açúcar.....	21
Tabela 4.1	Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respectivos valores de conversão.....	49
Tabela 5.1	Caracterização química da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	60
Tabela 5.2	Composição da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i> descrita por Moriya (2007) e Silva (2009).....	60
Tabela 5.3	Rendimentos das reações de explosão a vapor.....	61
Tabela 5.4	Caracterização química da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor.....	61
Tabela 5.5	Valores de caracterização química da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor corrigidos pelos respectivos rendimentos de reação.....	61
Tabela 5.6	Rendimentos das reações de pré-tratamento com ácido diluído.....	63
Tabela 5.7	Rendimentos do pré-tratamento hidrotérmico obtidos por Oliveira (2008).....	64
Tabela 5.8	Caracterização química da palha de cana pré-tratada com ácido diluído.....	64
Tabela 5.9	Valores de caracterização química da palha de cana pré-tratada com ácido diluído corrigidos pelos respectivos rendimentos de reação.....	64
Tabela 5.10	Volumes dos hidrolisados recuperados (em litros) e concentrações dos principais compostos presentes nos hidrolisados obtidos pelo pré-tratamento com ácido diluído, em g/L.....	69
Tabela 5.11	Rendimentos das reações de deslignificação da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor.....	71
Tabela 5.12	Caracterização química da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada.....	72
Tabela 5.13	Valores de caracterização química da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada, corrigidos pelo rendimento de pré-tratamento e deslignificação.....	72
Tabela 5.14	Rendimentos das reações de deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído.....	73

Tabela 5.15	Caracterizações da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada.....	73
Tabela 5.16	Valores de caracterização química da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada, corrigidos pelos rendimentos de pré-tratamento e deslignificação.....	74
Tabela 5.17	Rendimento e eficiência dos ensaios de fermentação.....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	19
2.2 CANA-DE-AÇÚCAR	20
2.3 PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	23
2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	24
2.4.1 CELULOSE.....	25
2.4.2 HEMICELULOSES	26
2.4.3 LIGNINA.....	28
2.5 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSE	30
2.6 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA VEGETAL	31
2.6.1 EXPLOSÃO A VAPOR (STEAM EXPLOSION)	33
2.6.2 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO (HOT WATER LIQUID)	35
2.6.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO DILUÍDO	36
2.6.4 PRÉ-TRATAMENTO EM MEIO ALCALINO.....	36
2.6.5 OUTROS PRÉ-TRATAMENTOS	37
2.7 SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA BIOMASSA VEGETAL E FERMENTAÇÃO	37
3 OBJETIVOS.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 AQUISIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	41
4.2 PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR	41
4.3 PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA COM ÁCIDO DILUÍDO	43
4.4 DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA DA PALHA DE CANA PRÉ-TRATADA	44
4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA	45
4.5.1 MOAGEM E PENEIRAÇÃO DAS AMOSTRAS	45
4.5.2 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA.....	46
4.5.3 DETERMINAÇÃO DE EXTRATIVOS	46
4.5.4 HIDRÓLISE COM H ₂ SO ₄ 72%	47
4.5.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS	47
4.5.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL E FURFURAL.....	48
4.5.7 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL	49
4.5.8 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL.....	50

4.5.9 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS	50
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	51
4.7 DETERMINAÇÃO DOS RENDIMENTOS DE REAÇÃO E DA SOLUBILIZAÇÃO DOS COMPONENTES DA PALHA DE CANA.....	53
4.8 SEVERIDADE DOS PRÉ-TRATAMENTOS	54
4.9 ANÁLISE DA PALHA DE CANA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	55
4.10 ANÁLISE DA PALHA DE CANA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	55
4.11 TESTE DE FERMENTABILIDADE DA GLICOSE OBTIDA NA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA <i>IN NATURA</i>	58
5.2 PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOÇÃO A VAPOR	59
5.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO DILUÍDO	62
5.4 SEVERIDADE DOS PRÉ-TRATAMENTOS	68
5.5 DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA DA PALHA DE CANA PRÉ-TRATADA POR EXPLOÇÃO A VAPOR	70
5.6 DESLIGNIFICAÇÃO DA PALHA DE CANA PRÉ-TRATADA COM ÁCIDO DILUÍDO	72
5.7 ANÁLISE DA PALHA DE CANA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	74
5.8 MICROSCOPIAS DAS AMOSTRAS DE PALHA DE CANA	77
5.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	81
5.10 FERMENTABILIDADE DA GLICOSE OBTIDA NA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	87
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

Durante o século XX os combustíveis fósseis predominaram como fontes de energia usadas para diversos meios de transporte e atividades industriais. Por se tratarem de recursos energéticos finitos, dentro de algumas décadas o abastecimento mundial poderá ser comprometido, causando instabilidade econômica em muitos países (BIOETANOL [..], 2008). O intenso uso desses recursos também provocou um aumento do índice de gás carbônico na atmosfera, gás associado ao fenômeno efeito estufa. De acordo com dados publicados pela *World Energy, Technology and Climate Policy Outlook*, as emissões de CO₂ no ano de 2030 poderão atingir um nível duas vezes maior em relação ao nível registrado em 1990 (BALLESTEROS et al., 2006).

O etanol tem se mostrado uma das melhores alternativas para a redução do uso de combustíveis derivados do petróleo e, nesse contexto, o Brasil se destaca mundialmente pelo pioneirismo na produção de etanol combustível a partir do caldo da cana-de-açúcar. No início do século XX o etanol começou a ser produzido no país, porém, só ganhou expressão a partir de 1975 com a criação do Pró-Álcool, programa criado com o objetivo de buscar o uso de combustíveis alternativos à gasolina após a 1ª crise do petróleo em 1973 (BIODIESELBR, 2007). Com isso, as lavouras começaram a sofrer um processo de mecanização, com a introdução de guinchos para recolher a cana até os caminhões, além da modernização de técnicas como o aproveitamento da vinhaça para fertirrigação e cultivo de novas variedades da cana (MENEGUETTI, 1999).

Até o ano de 2020 está previsto o aumento da produção de etanol dos atuais 28 bilhões para 65 bilhões de litros por ano (CONAB, 2010; UNICA, 2010). Esses níveis de produção serão alcançados através do aumento da área de plantio, aperfeiçoamento do processo de produção já existente, melhoramento genético da cana-de-açúcar e de microorganismos fermentadores, e também pelo desenvolvimento de tecnologias de conversão dos resíduos agroindustriais lignocelulósicos em fontes de açúcares fermentáveis (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006). Com isso, o Brasil possuirá potencial para torna-se líder na produção e exportação de etanol. Investimentos para ampliação e criação de novas usinas agora partem da iniciativa de empresas privadas, convictas de que o etanol

combustível tem o papel de contribuir para a redução da emissão de gases poluentes e impulsionar a balança comercial do Brasil.

O presente trabalho está inserido no âmbito do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da agroindústria sucroalcooleira, como é o caso da palha de cana, para a obtenção de etanol por meio da sacarificação de sua fração celulósica. Para tornar um processo atrativo e viável economicamente é preciso desenvolver estudos sobre pré-tratamento e hidrólise enzimática eficientes. Entende-se por pré-tratamento, todo tratamento químico, físico ou biológico que visa aumentar o rendimento da etapa de hidrólise enzimática. Já a hidrólise enzimática, especificamente da fração celulósica, consiste no uso de enzimas capazes de converter o polímero de celulose em suas unidades fermentáveis de glicose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

A crescente demanda por energia nas economias emergentes vem exercendo grande pressão na capacidade mundial de extração do petróleo. O maior mercado consumidor de petróleo do mundo são os Estados Unidos, mas sua região é a segunda menor em reservas petrolíferas. Já o continente europeu possui reservas em fase final de exploração, como é o caso do petróleo do Mar do Norte (SIMÕES, 2007). A utilização deste recurso energético deve aumentar significativamente até por volta do ano 2014, quando então o preço do barril de petróleo deverá atingir preços que supostamente implicarão em uma diminuição do consumo deste combustível fóssil (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). Assim, um novo cenário mundial de demanda energética está sendo desenhado para se adequar à queda do suprimento de petróleo e às preocupações com o meio ambiente (ANDREOLI, 2008).

O Brasil tem muito a contribuir na área dos biocombustíveis, pois é detentor de importante conhecimento acumulado, especialmente sobre a produção e o uso de etanol de cana-de-açúcar como combustível automotivo, possuindo uma das matrizes energéticas mais limpas do mundo (SIMÕES, 2007). Os dados da Tabela 2.1, descritos por Negrão e Urban (2005), indicam que as emissões de alguns compostos foram bastante reduzidas: antes de 1980, quando a gasolina era o único combustível usado para carros leves, as emissões de monóxido de carbono eram superiores a 50 g/km e em 2000, esse nível foi reduzido para 0,7 g/Km. As emissões de hidrocarbonetos, óxidos de nitrogênio e aldeídos também foram reduzidas pelo uso do etanol, bem como pela melhoria do desempenho dos motores.

Com o uso de etanol em carros flex, entre março de 2003 e janeiro de 2010 foi evitada a emissão de 83,5 milhões de toneladas de gás carbônico na atmosfera. Seria necessário o plantio e a manutenção por 20 anos de pelo menos 200 milhões de árvores para retirar da atmosfera essa mesma quantidade de CO₂. Os dados foram registrados pelo “Carbonômetro”, ferramenta criada pela União da Indústria de Cana-de-açúcar - UNICA para medir a redução nas emissões de gás carbônico por

carros equipados com motor flex e que utilizam o etanol como combustível (UNICA, 2010).

Tabela 2.1 – Índice de monóxido de carbono, hidrocarbonetos, óxidos de nitrogênio e aldeídos emitidos por carros leves no Brasil

ANO	COMBUSTÍVEL	POLUENTES* (gramas por quilômetro)			
		CO	HC	NO _x	ALDEÍDOS
Antes de 1980	Gasolina	54	4,7	1,2	0,05
1986	Mistura de gasolina e etanol	22	2	1,9	0,04
	Etanol	16	1,6	1,8	0,11
1990	Mistura de gasolina e etanol	13,3	1,4	1,4	0,04
	Etanol	10,8	1,3	1,2	0,11
1995	Mistura de gasolina e etanol	4,7	0,6	0,6	0,025
	Etanol	4,6	0,7	0,7	0,042
2000	Mistura de gasolina e etanol	0,7	0,1	0,2	0,004
	Etanol	0,6	0,2	0,2	0,014

* Médias ponderadas de cada ano-modelo pelo volume da produção

Fonte: NEGRÃO; URBAN, 2005

2.2 CANA-DE-AÇÚCAR

Acredita-se que a cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia e Indonésia, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Quando Alexandre, o Grande invadiu a Índia seus escribas escreveram sobre os habitantes: “mastigavam uma cana maravilhosa que produzia uma espécie de mel sem ajuda das abelhas” (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990). Posteriormente, a cana-de-açúcar disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial por regiões tropicais e subtropicais.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae, a família botânica mais importante para economias humanas pois reúne também cereais como o arroz, o trigo, a cevada, o milho, entre outros. Na agricultura a cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque, estando entre as espécies vegetais mais cultivadas

no mundo, alcançando mais de 80 países. Seu plantio continua crescendo, principalmente, em virtude do aumento do consumo como fonte de açúcar, etanol e energia elétrica (TEIXEIRA, 2006). A Tabela 2.2 apresenta a classificação taxonômica da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar possui porte ereto, com altura máxima em torno de 2-3 m. Apresenta raízes fasciculadas, o que permite melhor fixação ao solo, além de tronco não ramificado do tipo colmo cheio, o qual é rico em reserva de sacarose. Suas folhas são longas, dispostas alternadamente entre os nós do colmo, com nervuras paralelas e uma mediana principal, além de limbos finamente serrilhados (MORFOLOGIA [...], 2010). A Figura 2.1 exemplifica a estrutura de uma planta de cana-de-açúcar.

Tabela 2.2 – Classificação taxonômica da cana-de-açúcar

Reino	Vegetal
Filo	Anthophyta ou Magnoliophyta
Classe	Monocotyledones ou Liliopsida
Ordem	Poales
Família	Poaceae
Gênero	<i>Saccharum</i>
Espécies	<i>S. spontaneum</i> , <i>S. robustum</i> , <i>S. officinarum</i>

A monocultura da cana foi difundida no Brasil ainda no início do período colonial. O clima tropical e o solo propício contribuíram para o país tornar-se o maior produtor de açúcar durante o século XVI e início do século XVII (SANTIAGO et al., 2006). Atualmente o Estado de São Paulo é o principal produtor de cana-de-açúcar no Brasil. Na safra 2008/09, a produção do Estado alcançou 346,3 milhões de ton de cana-de-açúcar, o que representou 60,8% da produção total do Brasil (569 milhões de ton) e 68,5% da produção da região Centro-Sul (UNICA, 2010). O Estado do Paraná, que divide com Minas Gerais o posto de segundo maior processador de cana-de-açúcar do País, deve moer até 55 milhões de ton na safra 2010/2011 (PROTEFER, 2010). Esses índices de produção fazem do Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, de acordo com dados de 2008 apresentados na Figura 2.2.

No ano de 2006, cerca de 90% da produção de cana-de-açúcar foi direcionada ao setor sucroalcooleiro, sendo 55% destinada à produção de açúcar e 35% à produção de etanol. Os 10% restantes foram utilizados para a produção de ração animal, cachaça, rapadura, entre outros, movimentando o equivalente a mais de R\$ 13 bilhões em faturamentos diretos e indiretos (TEIXEIRA, 2006).

O Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES é o maior agente de financiamento a projetos de investimento na expansão do etanol brasileiro. O Banco e seus agentes financeiros contam com uma carteira de R\$ 30 bilhões em financiamentos ao setor, com projetos voltados à produção de açúcar, álcool e geração de energia (BNDES, 2010).

Fonte: <http://science.howstuffworks.com/grasses/sugarcane-info.htm>

Figura 2.1 – Ilustração de um espécime de cana-de-açúcar

Figura 2.2 – Produção de cana-de-açúcar no mundo (BIOETANOL [...], 2008)

2.3 PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A palha de cana-de-açúcar consiste em uma biomassa vegetal residual, gerada a partir do desfolhamento da cana durante o processo de colheita, podendo ser obtido até 140 kg de palha (massa seca) por tonelada de cana moída (LABAT; GONÇALVES, 2008; SAAD et al., 2008). Em muitos Estados, as usinas empregam o método de queima de palha para removê-la do colmo. Essa prática tanto facilita a colheita manual, como diminui bastante o risco de acidentes por picadas de animais peçonhentos. Contudo, a queimada do canavial causa sérios problemas de ordem ambiental e de saúde pública devido à grande produção de fuligem e diversos compostos tóxicos, comprometendo a qualidade do ar nas regiões de plantio, além de provocar acidentes rodoviários (OLIVEIRA, 2008). A sustentabilidade da agricultura também fica comprometida, pois o fogo altera as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, prejudica a reciclagem dos nutrientes e diminui o percentual de açúcares redutores totais (ART) contidos na cana (FERREIRA, 2007).

Em 2003 foi regulamentada a Lei 11.241/02 que dispõe da eliminação gradativa da queima da palha de cana no Estado de São Paulo. Com a tendência do mesmo ocorrer nos demais Estados produtores, uma grande quantidade de palha de cana estará disposta nos campos, deixando o solo coberto com uma espessa camada que pode superar 20 ton/ha, considerando uma produção de cana-de-açúcar de 81 ton/ha (CONAB, 2010).

A cobertura em excesso do solo com palha de cana pode prejudicar as plantas em desenvolvimento, afetar a umidade, luminosidade e temperatura do solo, além de favorecer a propagação de parasitas das sementes (CORREIA; DURIGAN, 2004). Por outro lado, a retirada completa da palha de cana poderia comprometer a fertilidade do solo, desencadear processos erosivos e alterar a retenção de água no solo. Pesquisas sobre o aproveitamento do palhiço (ponteiras, folhas verdes, palhas e frações de colmos remanescentes) da cana, para obtenção de energia elétrica, estão sendo realizadas retirando-se 50% da camada disposta no campo sem comprometer as características do solo (PROTEC, 2008).

2.4 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A parede celular presente nas células vegetais é responsável por sustentar e definir a morfologia do espécime. No início do desenvolvimento dos vegetais superiores a parede celular é constituída apenas por uma camada denominada parede primária. Com o tempo, novas camadas denominadas paredes secundárias são formadas até o estágio de maturidade celular (Figura 2.3). Essas camadas são constituídas predominantemente de celulose, hemicelulose e lignina, estando também presentes terpenos, ácidos graxos, proteínas e outros constituintes, denominados extrativos (GOLDSTEIN, 1981; FENGEL; WEGENER, 1989; RAVEN; EVERT; EICHCHORN, 2001).

Figura 2.3 – Estrutura da parede celular e a distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na fibra vegetal. Adaptado de Silva et al. (2009)

2.4.1 CELULOSE

A celulose é um polímero constituído por unidades de anidroglucopiranosose. Essas unidades de glicose estão organizadas em dímeros de celobiose, dispostas linearmente, como apresentado na Figura 2.4. Duas moléculas adjacentes de glicose são unidas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxilas do carbono 1 e carbono 4, formando o tipo de ligação $\beta(1 \rightarrow 4)$. A ocorrência de uma ligação hemiacetal na molécula de glicose faz com que um grupo aldeído esteja presente no carbono-1, fazendo com que uma das extremidades da cadeia celulósica apresente um terminal redutor (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é encontrada em plantas sob a forma de micro fibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40.000 nm de comprimento, tendo entre 2.000-25.000 unidades de glicose. A enzima celulose sintase, localizada na membrana plasmática, faz a união entre moléculas de glicose a partir de moléculas de sacarose (HELDT, 2005). As ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals entre as cadeias poliméricas formam zonas cristalinas (entre 50-90%), em sua maioria, bastante ordenadas. Porém, outras zonas amorfas ocorrem alternadamente e podem absorver água, tornando a celulose macia e flexível (GOLDSTEIN, 1981; FENGEL; WEGENER, 1989; FERREIRA et al., 2009).

Figura 2.4 – Representação da molécula de celobiose e do polímero de celulose. Adaptado de Ferreira et al. (2009)

2.4.2 HEMICELULOSES

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos ramificados com diferentes graus de polimerização, formados por carboidratos como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-glicose, D-galactose (Figura 2.5), unidos através de diferentes ligações químicas (FENGEL; WEGENER, 1989). Vários grupos acetila e ácidos urônicos encontram-se associados à cadeia principal ou às ramificações existentes (GÓMEZ, 1985). A ausência da propriedade cristalina e da estrutura micro fibrilar orientada da celulose torna a hemicelulose mais susceptível à hidrólise ácida e enzimática (PARAJÓ et al., 1998). A Figura 2.6 apresenta um exemplo de uma cadeia hemicelulósica presente em espécies de gramíneas.

Figura 2.5 – Açúcares constituintes das hemiceluloses. (1) D-glucose, (2) D-galactose, (3) L-arabinose, (4) D-xilose, (5) D-manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico. Adaptado de Pitarello (2007)

Figura 2.6 – Estrutura de uma hemicelulose presente em gramíneas e seus monômeros constituintes. Xyl = D-xilopiranoose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993)

As hemiceluloses podem ser utilizadas para a produção de xilitol, xilooligosacarídeos, furfural, entre outros (SCHUCHARDT; RIBEIRO, GONÇALVES, 2001). A obtenção de etanol a partir de xilose utilizando *Saccharomyces cerevisiae* não é possível, pois esta levedura não é capaz de assimilar açúcares de cinco carbonos. Uma alternativa para a produção de etanol a partir de pentoses é a utilização de outras espécies de leveduras como a *Candida guilliermondii*, *Pichia stipitis* ou microrganismos recombinantes, os quais vêm sendo largamente

estudados, porém, em processos industriais geralmente não são suficientemente estáveis e em muitos casos dependem de meios de cultura complexos (SAAD, 2010). A Figura 2.7 apresenta um esquema da via metabólica de leveduras para a fermentação de xilose e glicose (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

Figura 2.7 – Via metabólica da xilose e da glicose em leveduras

2.4.3 LIGNINA

A palavra lignina significa madeira (do latim *lignum*). Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, possuindo importância no transporte de água, nutrientes, metabólitos, além de conferir resistência mecânica e proteger contra o ataque de microorganismos (FENGEL; WEGENER, 1989). A lignina é de grande interesse científico e econômico devido a sua natureza aromática e muito complexa. Existe uma grande diversidade na

estrutura da lignina quando se passa de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo dentro da mesma espécie, quando são analisadas partes diferentes do vegetal (SALIBA et al., 2001).

A estrutura da lignina é amorfa e de alta massa molecular, fortemente aromática, composta de unidades de *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Figura 2.8). Ela está geralmente associada à celulose e às hemiceluloses através de ligações éter e carbono-carbono. A aplicação de transformações físico-químicas na lignina permite gerar insumos de interesse industrial como vanilina, ácido gálico, óleos, fenol, ácido acético, entre outros (BRIENZO, 2008). Também é possível remover metais pesados de efluentes usando ligninas oxidadas (LABAT; GONÇALVES, 2008), bem como usá-la na fabricação de filmes, poliuretanos, macro monômeros de poliésteres, fibras de carbono, fertilizantes entre outros (HU, 2002). A Figura 2.9 apresenta a estrutura molecular da lignina e seus principais tipos ligações.

Figura 2.8 – Unidades de hidroxifenila (a), guaiacila (b) e siringila (c), formadoras da estrutura molecular da lignina. Adaptado de Saliba et al. (2001)

Figura 2.9 – Estrutura molecular da uma lignina e seus tipos de ligações (CARVALHO et al., 2009)

2.5 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE CELULOSE

O etanol obtido a partir do caldo da cana-de-açúcar no Brasil e do grão de milho nos Estados Unidos foram os primeiros passos para introduzir uma nova fonte de energia renovável na matriz de combustível líquido para o transporte. Porém, a quantidade de etanol necessária para atingir as metas planejadas exigirá muito mais fontes de matéria prima do que o milho e a cana, pois existe uma competição direta entre a produção de combustível e a produção de alimentos para o caso do milho, causando um impacto na sua disponibilidade para usos tradicionais e consequentemente nos preços dos alimentos derivados (ANDREOLI, 2008).

Os resíduos da agroindústria como o bagaço e palha da cana, palha de trigo, entre outros materiais lignocelulósicos estão sendo visados para a obtenção de etanol a partir da celulose e assim complementar a produção do etanol combustível. Contudo, ainda há o desafio de superar alguns obstáculos para a indústria emergente de etanol celulósico e esses desafios incluem a implantação de um sistema logístico para transportar a palha de cana, por exemplo, até a usina e processos de conversão eficientes e viáveis economicamente (PERLACK et al., 2005; ANDREOLI, 2008).

Para superar esses percalços, diversos pesquisadores estão desenvolvendo meios para, em curto prazo, os materiais lignocelulósicos serem utilizados para a produção de combustível. Com isso, em longo prazo, a tecnologia do etanol celulósico servirá de base para a produção sustentável de commodities, tais como diversos produtos químicos e materiais obtidos a partir do fracionamento da biomassa, surgindo assim as biorrefinarias (SILVA, 2009). A Figura 2.10 mostra um fluxograma geral da produção de etanol a partir de um material lignocelulósico.

Figura 2.10 – Produção de etanol a partir da biomassa vegetal

2.6 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA VEGETAL

A conversão da celulose em glicose pode ocorrer por hidrólise ácida ou enzimática. Embora o processo de hidrólise enzimática seja mais promissor, essa via em escala industrial ainda não se mostra viável economicamente devido à ausência de enzimas celulolíticas com elevada atividade que permitam sua

utilização a custos compensadores. Para facilitar a exposição da celulose à ação enzimática é necessário realizar um pré-tratamento para diminuir a recalcitrância da biomassa vegetal *in natura*. A presença de hemicelulose e lignina dificulta o acesso das enzimas à celulose, reduzindo a eficiência dessa etapa. Portanto, a remoção desses compostos aumenta a porosidade do material, tornando mais eficiente o processo de hidrólise (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). A Figura 2.11 apresenta uma ilustração do efeito do pré-tratamento na fibra vegetal.

Figura 2.11 – Desestruturação da fibra vegetal pelo efeito de um pré-tratamento. Adaptado de Gonçalves (2008)

As condições de pré-tratamento podem ter dois efeitos opostos. Se o pré-tratamento for muito drástico, ocorre a degradação da fração celulósica, além da formação de inibidores da fermentação; se for muito brando, a acessibilidade da enzima continuará sendo baixa (SENDELIUS, 2005). No primeiro caso, pode-se realizar um tratamento do hidrolisado para remover alguns inibidores como o furfural e hidroximetilfurfural (HMF), além do o ácido sulfúrico e ácido acético, aplicando-se, por exemplo, os métodos de overlime, eletrodialise e carvão ativo. A formação de furfural e HMF é decorrente da reação de desidratação da xilose e da glicose, respectivamente. Esses compostos quando presentes no licor a ser fermentado

podem danificar a parede celular dos microorganismos bem como prolongar a fase “lag” de crescimento (MUSSATO; SANTOS; ROBERTO, 2004; CHENG et al., 2008).

O pré-tratamento pode ser físico (moagem da biomassa, aplicação de radiação), químico (pré-tratamento hidrotérmico, oxidação úmida – Wet Oxidation, pré-tratamento em meio ácido ou básico), biológico (microorganismos decompositores da madeira) ou a combinação desses. A escolha das condições de pré-tratamento dependerá de uma avaliação global do processo, rendimento e manutenção da integridade dos insumos de interesse (GALBE; ZACHI, 2002).

2.6.1 EXPLOÇÃO A VAPOR (STEAM EXPLOSION)

O pré-tratamento por explosão a vapor consiste na descompressão súbita de um sistema pressurizado contendo vapor d'água saturado à elevada pressão e a biomassa vegetal. Essa descompressão é feita abrindo-se rapidamente a válvula de descarga do reator de forma que todo o material é encaminhado para um tanque à pressão atmosférica. O vapor penetra no material lignocelulósico e condensa, formando água líquida dentro das fibras. Após a descompressão, essa água que está em equilíbrio com o vapor a alta pressão é rapidamente evaporada gerando literalmente uma explosão no interior das fibras (MASON¹, 1926 apud SAAD, 2010; ALLEN et al., 2001). Isso promove a hidrólise dos polissacarídeos por auto-hidrólise, principalmente a hemicelulose e a degradação parcial da lignina (CHEN; HAN; CHU, 2008). A Figura 2.12 apresenta o efeito da explosão a vapor na fração polissacarídica da biomassa lignocelulósica.

¹ MASON, W. H. Process and apparatus for disintegration of wood and the like. **US Patent 1.578.609**, 1926.

Figura 2.12 – Hidrólise de 4-O-metil-glucuranoxilana e celulose. (1) Arabinose, (2) xilose, (3) xilooligômeros acetilados (GP=3), (4) xilooligômeros de grande massa molecular, (5) oligosacarídeos, (6) glicose, (7) celobiose, (8) celooligômeros, (9) furfural, (10) hidroximetilfurfural, (11) ácido levulínico, (12) furano e (13) ácido furílico. Também ocorre formação de ácido fórmico e ácido acético (RAMOS, 2003)

Em geral o pré-tratamento é feito a temperaturas variando entre 160-260°C, o que corresponde a pressões de 0,62-4,7 MPa (WYLEN; SONNTAG, 1985) e tempo de reação variando de alguns segundos a poucos minutos antes da descompressão (BRIENZO, 2008). Com relação a custo de produção, verifica-se que os processos de explosão a vapor são mais baratos de operar que os de hidrólise, especialmente no caso da explosão a vapor não catalisada. Isto se deve especialmente as elevadas relações entre água e biomassa no processo de hidrólise ácida ou alcalina,

por exemplo, o que requer um sistema de aquecimento do reator mais caro devido ao elevado volume reacional. Também apresenta vantagem no aumento da acessibilidade da celulose às enzimas (SAAD, 2010).

O processo em que se impregna a biomassa com amônia líquida é denominado Ammonia Freeze Explosion (AFEX) (HOLTZAPPLE et al., 1991; BALLESTEROS et al., 2006). A biomassa também pode ser impregnada com ácido diluído, provocando o aumento da solubilização de hemicelulose, permitindo usar menores temperaturas e tempos de reação. Chen, Han e Xu (2008) observaram que o percentual de hemicelulose na palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor a 200 °C por 10 min foi reduzida de 33,3% para 13,6% enquanto o percentual de lignina foi aumentado de 11,6% para 23,2%. Segundo os autores, tem sido aceito que o pré-tratamento por explosão a vapor promove a degradação da hemicelulose e a transformação da lignina.

2.6.2 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO (HOT WATER LIQUID)

Sob temperaturas e pressões elevadas, a água pode ser usada para fracionar a biomassa vegetal em seus constituintes através da clivagem dos complexos lignina-carboidrato, além de romper as ligações glicosídicas dos polissacarídeos. O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atua como catalisador da reação da hidrólise da biomassa promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo auto-catalítico). Em temperaturas na faixa entre 180-220 °C e em curtos períodos de reação, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas com água e o grau de polimerização da celulose pode diminuir (GÓMEZ, 1985; ALLEN et al., 2001; SILVA, 2009).

Allen et al. (2001) obtiveram uma fração sólida rica em celulose quando realizaram um pré-tratamento hidrotérmico usando uma carga de 5% de fibra de milho a 215 °C e uma maior recuperação de pentoses em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor feito com uma carga de 70% de fibra de milho. Também ocorre uma menor formação de furfural em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor (SCHUCHARDT; RIBEIRO, GONÇALVES, 2001; MARTÍN et al., 2006).

2.6.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO DILUÍDO

Dos três principais componentes da biomassa vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), a hemicelulose é a mais susceptível à hidrólise, seguida da celulose (PARAJÓ et al., 1998). Dessa forma, o pré-tratamento com ácido diluído é empregado para se obter um hidrolisado contendo açúcares fermentáveis, principalmente açúcares pentoses. Este tipo de pré-tratamento é feito usando ácidos fortes, geralmente H_2SO_4 ou HCl (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Opta-se por usar ácidos diluídos para evitar problemas como a corrosão dos equipamentos e a alta demanda de energia necessária para a recuperação do ácido. Também ocorre uma menor formação de furfural e HMF (GÓMEZ, 1985; PARAJÓ, 1998; GALBE; ZACCHI, 2002) e o pH do hidrolisado hemicelulósico obtido do processo necessita ser corrigido para a sua utilização nos processos fermentativos, sem que haja inibição dos microrganismos por um pH desfavorável à sua eficiente bioconversão (SAHA, 2003).

2.6.4 PRÉ-TRATAMENTO EM MEIO ALCALINO

A polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação Kraft e polpação organossolv são alguns métodos conhecidos para remover a lignina da biomassa vegetal (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Essas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos *in natura*, os quais apresentam uma estrutura morfológica rígida e recalcitrante, necessitando assim de condições de reação mais severas (concentração de álcali > 10% e temperatura acima de 150 °C).

O pré-tratamento alcalino deve ser feito em uma etapa posterior à remoção da hemicelulose, uma vez que o ácido acético gerado interfere na ação do álcali (OLIVEIRA, 2007). A remoção da lignina de um material que já foi submetido a uma etapa de pré-tratamento é feito usando-se o método de extração alcalina, o qual consiste no mesmo processo da polpação soda, porém em condições de reação mais amenas (concentração de álcali no máximo 4% e temperaturas na ordem de 70 °C) (SILVA, 2009). Sua ação se baseia na clivagem da estrutura da lignina pela

saponificação dos grupos ésteres, tornando a fração celulósica mais reativa (GÓMEZ, 1985; MACHADO, 2000).

2.6.5 OUTROS PRÉ-TRATAMENTOS

Além dos pré-tratamentos citados, outros tipos podem ser usados para obtenção de produtos de interesse a partir de materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento organosolv é um processo onde uma mistura contendo solvente orgânico (acetona, etanol)/ água, com a presença de um catalisador, como HNO_3 , HCOOH , H_2SO_4 , NH_3 , NaOH é usado para remover tanto a hemicelulose quanto a lignina (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). A vantagem no uso deste tipo de pré-tratamento está na facilidade de recuperação, abundância e baixo custo dos solventes orgânicos (GONÇALVES; RUZENE, 2003).

Já o pré-tratamento conhecido como oxidação úmida (wet oxidation) tem como reagente o peróxido de hidrogênio que reage com grupos aromáticos e alifáticos da estrutura da lignina. O processo é otimizado adicionando um álcali (NaOH), causando a decomposição do peróxido de hidrogênio em ânion peróxido, principal agente de degradação (GALBE; ZACHI, 2002; BRIENZO, 2008). Além do pré-tratamento usando reagentes como ácidos, bases ou solventes orgânicos, pode-se aplicar microorganismos decompositores da madeira, como por exemplo, o fungo *Ceriporiopsis subvermispota*, usado em processos de biopolpação (COSTA; GONÇALVES; ESPOSITO, 2001; GONÇALVES et al., 2008).

2.7 Sacarificação enzimática da biomassa vegetal e fermentação

O processo de sacarificação enzimática consiste no uso de enzimas hidrolíticas que atuam em sacarídeos (celulose e hemiceluloses) obtendo assim os seus monômeros constituintes. A conversão da celulose em monômeros de glicose é feita empregando-se enzimas celulolíticas tais como as celobiohidrolases (CBHs), também chamadas de exo-1,4- β -glucanases, as endo-1,4- β -glucanases (EGs) e as

β -glicosidases (BGs). Estas atuam em diferentes sítios da cadeia celulósica de forma sinérgica: as CBHs atuam clivando ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia, obtendo-se como produto as unidades de celobiose; as EGs clivam regiões amorfas internas da cadeia celulósica e as BGs clivam a celobiose, como ilustra a Figura 2.13 (GALBE; ZACCHI, 2002).

As celulasas podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. O fungo *Trichoderma reesei* é o microrganismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulasas, entretanto, como desvantagem, a sua produção de β -glicosidase é relativamente pequena. Assim, a aplicação de extrato enzimático proveniente de *T. reesei* para a degradação da celulose gera altas concentrações de oligômeros. Dessa forma, para conseguir um sistema de enzimas mais eficiente é necessário um suplemento de β -glicosidase proveniente de outros microrganismos, como o *Aspergillus* sp. (SAAD, 2010).

Figura 2.13 – Modo de ação das celulasas e um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose. Adaptado de Pitarelo (2007)

A conversão da celulose presente na biomassa vegetal é influenciada pelas características estruturais do material utilizado. A lignina é considerada uma barreira física e um elemento competitivo adsorvente que reduz a quantidade de celulasas disponíveis no meio, bloqueando seu progresso de hidrólise ao longo da cadeia celulósica (HOLTZAPPLE et al., 1990). A cristalinidade é outro fator estrutural que interfere na conversão enzimática, além de outros fatores tais como a temperatura, pH do meio, tempo de reação e concentração do produto (glicose). Alkasrawi et al. (2003) afirmam que a presença de surfactantes no meio reacional, como o Tween-20, aumenta o potencial de conversão de celulose em glicose. O mecanismo de ação do surfactante ainda não está claramente elucidado, porém algumas hipóteses são sugeridas: (i) os surfactantes mudam a ultra estrutura do substrato, tornando a celulose mais acessível; (ii) aumentam a estabilidade da enzima, reduzindo a desnaturação pelo efeito da temperatura e (iii) reduzem a inativação da enzima pelo efeito da adsorção.

No processo de obtenção de etanol a partir da celulose, as etapas de hidrólise enzimática e fermentação podem ser feitas por Hidrólise e Fermentação Separada (HFS) ou por Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS). O processo HFS permite que cada etapa seja conduzida nas melhores condições para as enzimas e para os microorganismos, ou seja, hidrólise enzimática a 45-50 °C e fermentação a 30 °C. Já a Sacarificação e Fermentação Simultânea permite o consumo imediato do produto (glicose) pelos microorganismos fermentadores, diminuindo assim o efeito de inibição enzimática pelo produto formado, além de ser economicamente mais favorável em termos de concentração final de etanol, menor carga enzimática e menor consumo de energia (DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; GALBE; ZACCHI, 2002). Em contra partida, existe a dificuldade de se usar linhagens de leveduras termotolerantes para fermentar nas melhores temperaturas de hidrólise enzimática (40-45 °C). Contudo, dados encontrados na literatura mostram que as leveduras do gênero *Kluyveromyces* e *Flabospora* foram capazes de fermentar a 43 °C e 46 °C, respectivamente (BALLESTEROS et al., 2004).

3 OBJETIVOS

Geral

Estudar o efeito do pré-tratamento por explosão a vapor, do pré-tratamento com ácido diluído e da deslignificação alcalina na etapa de sacarificação enzimática da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar, visando à obtenção de etanol.

Específicos

- Caracterizar quimicamente a palha de cana na sua forma *in natura*, pré-tratada, e pré-tratada seguida de deslignificação alcalina;
- Avaliar os tipos de pré-tratamentos aplicados e as condições experimentais empregadas em relação a uma maior eficiência na remoção da hemicelulose e lignina;
- Analisar a influência da deslignificação alcalina dos materiais pré-tratados no rendimento de hidrólise enzimática;
- Observar mudanças na estrutura química e morfológica da palha de cana pré-tratada e pré-tratada seguida de deslignificação alcalina;
- Avaliar a obtenção de glicose a partir da hidrólise enzimática da palha de cana na sua forma *in natura*, pré-tratada, e pré-tratada seguida de uma etapa de deslignificação;
- Testar a fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos obtidos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A palha de cana usada em todo trabalho foi oriunda da variedade de cana-de-açúcar RB863129, referente à safra 2008/2009. Essa variedade possui algumas características como resistência ao déficit hídrico, bem como a algumas doenças como a doença do mosaico, do carvão e da escaldadura. O termo “palha” refere-se às folhas da cana removidas ainda verdes (viáveis), coletadas manualmente por funcionários da Usina Olho D’água, localizada no Estado de Pernambuco. As palhas de cana foram armazenadas em 150 sacos, sendo esses posteriormente enumerados e pesados. Desse total, 147 sacos foram usados nas reações de explosão a vapor e o restante da palha de cana foi moída em moinho de martelo tipo forrageira, para ser utilizada nas reações de pré-tratamento com ácido diluído.

4.2 Pré-tratamento da palha de cana por explosão a vapor

As reações de pré-tratamento por explosão a vapor da palha de cana foram realizadas na Usina Olho D’Água S/A, em reator com capacidade para 2,5 m³. Foi detectado alguns problemas no reator, como por exemplo, entupimentos nos bicos de injeção de vapor, fazendo com que o mesmo não fosse distribuído uniformemente, além do reator possuir algumas regiões internas oxidadas. A Figura 4.1 apresenta a sequência de etapas que envolveram o pré-tratamento. As condições experimentais de todos os tratamentos da palha de cana (pré-tratamentos e deslignificação alcalina) foram determinadas com base em resultados obtidos anteriormente pelo Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem e Simulação da Escola de Engenharia de Lorena.

Antes de iniciar as reações de pré-tratamento foram feitas duas sequências de pressurização com vapor e depressurização súbita, com o objetivo de aquecer o reator e remover resíduos de reações anteriores. Para cada reação foram usados 49

sacos, escolhidos aleatoriamente. A relação entre a massa de palha de cana/volume do reator foi de aproximadamente 1/12, pois cada reação foi feita, em média, com 136 kg de palha de cana não moída (massa seca), com aproximadamente 15% de umidade.

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6)

Figura 4.1 – (1) Visão geral do reator de explosão a vapor, (2) sacos com a palha de cana, (3) transporte dos sacos com palha de cana até a plataforma do reator, (4) carregamento do reator, (5) momento da descompressão súbita e (6) coleta da palha pré-tratada

A etapa de carregamento foi realizada com o auxílio de um trator para transportar os sacos até a plataforma, onde funcionários da usina carregavam o reator com a palha de cana. Após o fechamento da tampa do reator, a válvula de injeção de vapor foi aberta e o aumento da temperatura foi monitorado até a temperatura de pré-tratamento desejada. Foram feitas 3 reações a 180 °C, 190 °C e 200 °C, todas por 15 min. Após o término do tempo de reação a válvula de descompressão foi aberta, provocando uma explosão e consequente arraste do material para o ciclone acoplado ao reator.

A palha de cana pré-tratada foi armazenada em tonéis perfurados de 200 L para ser lavada exaustivamente, promovendo assim a remoção dos componentes que foram hidrolisados. Optou-se por não guardar uma amostra da água de lavagem para posterior quantificação de açúcares e inibidores. Ao fim da lavagem todo material foi estocado em sacos para posterior transporte até o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco onde foi feita a secagem em temperatura ambiente. Após essa etapa, a palha de cana pré-tratada foi enviada para a Escola de Engenharia de Lorena, onde foi analisada e utilizada para as reações de deslignificação alcalina e hidrólise enzimática.

4.3 Pré-tratamento da palha de cana com ácido diluído

O pré-tratamento com ácido diluído foi realizado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco utilizando um reator rotatório Regmed modelo AUE/20 (Figura 4.2). Cada reação foi feita usando 1 kg de palha de cana picada (massa seca), com aproximadamente 15% de umidade, e uma solução ácida preparada com 10 L de água destilada e 10 g de H_2SO_4 . As temperaturas de reação foram: 180 °C, 185 °C, 190 °C e 195 °C, mantidas constantes por 10 min.

Após o término do tempo reacional, a palha pré-tratada e o hidrolisado ácido foram transferidos para um saco de algodão que funcionou como meio filtrante. O volume do hidrolisado ácido foi quantificado e uma amostra foi armazenada para posterior determinação de açúcares, ácidos orgânicos, HMF e furfural. Em seguida a palha de cana pré-tratada foi lavada exaustivamente com água destilada a

aproximadamente 70 °C. Todo material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente enviado ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, onde foi analisado e utilizado para as reações de deslignificação alcalina e hidrólise enzimática.

Figura 4.2 - Reator rotatório REGMED usado nas reações de pré-tratamento com ácido diluído

4.4 Deslignificação alcalina da palha de cana pré-tratada

A deslignificação da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor foi processada em reator de 350 L devido à grande quantidade de material disponível. Cada reação foi feita com 10 kg de palha pré-tratada (massa seca) contendo aproximadamente 10% de umidade, moída previamente em moinho de martelo, misturada a uma solução alcalina preparada com 100 L de água e 1,5 kg de NaOH. A reação ocorreu a 100 °C, por 1 h e sob agitação de 100 rpm. Após o término do tempo reacional, a fração sólida misturada ao licor negro foi transferida para um tonel de 200 L, sendo posteriormente filtrada em saco de pano e lavada

exaustivamente para a remoção da lignina residual. Em seguida todo material foi espalhado em lona para secagem em temperatura ambiente.

A deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído foi processada em reator tipo ampola de 500 mL devido a uma menor quantidade de material existente. Cada reação foi feita com 40 g de palha pré-tratada (massa seca) contendo aproximadamente 10% de umidade, misturada a uma solução alcalina preparada com 400 mL de água destilada e 4 g de NaOH. A reação ocorreu a 100 °C, por 1 h, sem agitação. Após o término do tempo reacional, a fração sólida misturada ao licor negro foi filtrada em funil de Buchner utilizando um tecido como meio filtrante. O material foi lavado sucessivamente com água destilada a aproximadamente 70 °C para a remoção da lignina residual, sendo posteriormente seco em temperatura ambiente.

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA

As amostras de palha de cana *in natura*, pré-tratadas e pré-tratadas seguida de deslignificação foram caracterizadas quimicamente conforme um método validado para a caracterização química do bagaço de cana, descrito por Gouveia et al. (2009) e detalhado a seguir. Os ensaios de caracterização química foram realizados em triplicata e os dados foram expressos em percentuais médios juntamente com os respectivos desvios padrões.

4.5.1 MOAGEM E PENEIRAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras reservadas para a caracterização química da palha *in natura*, pré-tratadas e deslignificadas foram moídas e peneiradas a 20 mesh, utilizando moinho Willey.

4.5.2 DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA

O percentual de umidade das amostras foi determinado usando uma balança de infravermelho Marte ID50 e esse dado foi usado para calcular a massa seca das amostras através da Equação 4.1.

$$M = \frac{M_A \cdot (100 - \% \text{ umidade})}{100} \quad (4.1)$$

Sendo:

M: massa seca da amostra;

M_A: massa da amostra com umidade;

4.5.3 DETERMINAÇÃO DE EXTRATIVOS

Para a determinação de extrativos, uma amostra de 15 g (massa seca) de palha de cana *in natura*, com 12% de umidade, foi armazenada em dois pequenos sacos feitos com papel de filtro qualitativo, sendo em seguida inseridos em um extrator Soxhlet. A extração foi feita utilizando etanol 95% como solvente, por um período de 8 h. Ao término do período de extração a palha de cana foi espalhada em placa de Petri para secagem em temperatura ambiente. O percentual de extrativos foi determinado pela Equação 4.2.

$$E = \frac{M_i - M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Sendo:

E: percentual de extrativos da palha de cana;

M_i: massa inicial da amostra de palha *in natura* (massa seca);

M_f: massa final após extração (massa seca);

4.5.4 HIDRÓLISE COM H_2SO_4 72%

Amostras de 2 g de palha de cana (massa seca) com aproximadamente 10% de umidade, contidas em béquer de 100 mL, foram tratadas com 10 mL de H_2SO_4 72% em banho térmico a 45 °C. A reação ocorreu durante 7 min sob vigorosa agitação usando bastão de vidro. A reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada e em seguida o conteúdo do béquer foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL com auxílio de um funil. Tanto o béquer quanto o bastão foram lavados com 225 mL de água destilada, totalizando um volume de 275 mL.

O erlenmeyer foi tampado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a 121 °C para hidrólise completa dos oligômeros remanescentes. Em seguida, o hidrolisado contendo o resíduo sólido (lignina insolúvel e cinzas) foi filtrado em papel de filtro qualitativo (previamente seco e tarado) e transferido para um balão volumétrico de 500 mL, lavando-se bem o erlenmeyer e o papel de filtro para não haver perda dos produtos gerados. O papel de filtro contendo o resíduo sólido foi lavado com 1,5 L de água destilada para total remoção do ácido residual e seco em estufa a 105 °C até peso constante, sendo posteriormente usado para determinação de lignina insolúvel.

4.5.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os açúcares e ácidos orgânicos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir de uma amostra de hidrolisado ácido previamente filtrada em cartucho Sep-Pak C_{18} (Waters). A coluna de separação utilizada foi a Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm Bio-Rad Laboratories Ltd), a fase móvel usada foi H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ à vazão de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura de 45 °C e período de análise de 20 min. Os compostos foram identificados através de um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A e suas concentrações foram determinadas com base nas respectivas curvas analíticas. As massas de celulose e hemicelulose foram obtidas multiplicando-se as massas de cada monômero

correspondente pelos respectivos fatores de conversão (Tabela 4.1), com base na estequiometria das reações.

Tabela 4.1 – Principais monômeros precursores da celulose e hemicelulose e seus respectivos valores de conversão

Monômero	Fator de Conversão	Polímero
Celobiose	0,95	Celulose
Glicose	0,90	Celulose
Xilose	0,88	Hemicelulose
Arabinose	0,88	Hemicelulose
Ácido Fórmico	3,09	Celulose
Ácido Acético	0,72	Hemicelulose
Hidroximetilfurfural	1,37	Celulose
Furfural	1,29	Hemicelulose

4.5.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROXIMETILFURFURAL E FURFURAL

Para determinação de HFM e furfural, uma amostra de hidrolisado ácido foi previamente filtrada em membrana millipore 0,42 μm visando a remoção de partículas sólidas presentes. A coluna de separação usada foi a LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), a fase móvel utilizada foi acetonitrila/água 1:8 (v/v) e ácido acético 1%, à vazão de 0,8 mL.min⁻¹, temperatura de 25 °C e período de análise de 15 min. Os compostos foram identificados por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10 em 280 nm. As concentrações de HMF e furfural foram determinadas com base em suas respectivas curvas analíticas. Esses valores foram multiplicados pelos fatores de conversão (Tabela 4.1) para compor o percentual de celulose e hemicelulose da amostra de palha de cana.

4.5.7 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL

Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado ácido foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6 mol.L⁻¹ (pH final próximo a 12). Após agitação, o volume foi completado com água destilada e a solução resultante foi analisada no espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer Lambda 25 com comprimento de onda ajustado para 280 nm. A Equação 4.3 corresponde à curva analítica de lignina solúvel de palha de cana e a Equação 4.4 corresponde à determinação da concentração de lignina solúvel presente no hidrolisado ácido, onde foi considerada a presença de HMF e furfural, pois assim como a lignina, esses dois compostos têm uma máxima absorvância de luz UV em 280 nm.

$$C_{Lig} = \frac{Abs_{Lig} - 3,2 \cdot 10^{-2}}{19,6} \quad (4.3)$$

Sendo:

C_{Lig} : concentração de lignina solúvel (g/L)

Abs_{Lig} : absorvância da lignina solúvel em 280 nm

$$C_{Lig} = \frac{A_{Hid} - (C_{HMF} \cdot \epsilon_{HMF} + C_{furf.} \cdot \epsilon_{furf.}) - 3,2 \cdot 10^{-2}}{19,6} \quad (4.4)$$

Sendo:

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

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

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

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

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

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

4.5.8 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL

O papel de filtro contendo o resíduo insolúvel (lignina + cinzas) foi seco em estufa a 105 °C até peso constante. Em seguida foi feita a calcinação do material utilizando um cadinho previamente tarado: inicialmente a temperatura foi elevada para 800 °C com o cadinho tampado, desligando-se a mufla logo em seguida. Após a temperatura atingir 400 °C, a tampa do cadinho foi retirada, elevando-se a temperatura da mufla novamente para 800 °C por um período de 2 h. Posteriormente o cadinho contendo as cinzas da amostra foi deixado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, fazendo-se em seguida a sua pesagem. O percentual de lignina insolúvel foi determinado pela diferença entre o resíduo sólido e a massa de cinzas, conforme apresentado na Equação 4.5.

$$L_I = \frac{(M_{R2} - M_{R1}) - (M_{C2} - M_{C1})}{M_A} \cdot 100 \quad (4.5)$$

Sendo:

L_I : percentual de lignina insolúvel;

M_{R2} : massa do papel de filtro com resíduo insolúvel;

M_{R1} : massa do papel de filtro

M_{C2} : massa do cadinho com cinzas;

M_{C1} : massa do cadinho;

M_A : massa da amostra utilizada para a caracterização química;

4.5.9 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

A determinação de cinzas totais foi feita de maneira semelhante ao item 4.5.8: aproximadamente 2 g (massa seca) de palha de cana, com cerca de 10% de umidade, foi colocada em cadinho previamente seco e tarado. Inicialmente a temperatura foi elevada para 800 °C com o cadinho tampado, desligando-se a mufla logo em seguida. Após a temperatura atingir 400 °C, a tampa do cadinho foi retirada,

elevando-se a temperatura da mufla novamente para 800 °C por um período de 2 h. Posteriormente o cadinho contendo as cinzas da amostra foi deixado em um dessecador até atingir a temperatura ambiente, fazendo-se em seguida a sua pesagem. O percentual de cinzas totais foi determinado pela Equação 4.6.

$$C_T = \frac{(M_{C2} - M_{C1})}{M_A} \cdot 100 \quad (4.6)$$

Sendo:

C_T = percentual de cinzas totais;

M_{C2} : massa do cadinho com cinzas;

M_{C1} : massa do cadinho;

M_A : massa da amostra (massa seca);

4.6 Hidrólise Enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados utilizando enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e β -glucosidase (Novozym 188), ambas gentilmente doadas pela Empresa Novozymes Latin America Ltda – Araucária – PR. A atividade enzimática da Celluclast 1.5 L foi previamente determinada empregando-se a metodologia padrão de Mandels; Andreotti e Roche (1976). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 4,8) e 50 mg de papel de filtro Whatman n°1 como substrato. O tubo de ensaio foi colocado em banho térmico a 45 °C por 1 h. Em seguida foi empregado o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1956) para determinar a quantidade de glicose liberada. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS e em seguida o tubo de ensaio foi fervido por 5 min. Após o resfriamento, foi feita a leitura da absorbância em 540 nm utilizando um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer Lambda 25, sendo posteriormente calculada a atividade enzimática.

A atividade da enzima β -glicosidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002). Em um tubo de

ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução 0,1% (m:v) de p-NPG (para-nitrofenol β -1,4 glicosídeo). O meio foi incubado em banho térmico a 45 °C por 30 min e após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10% (m:v) de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A quantidade de glicose liberada foi determinada pela equivalência molar do p-NP (para-nitrofenol) na clivagem do p-NPG ($1 \text{ p-NPG} \rightarrow 1 \text{ glicose} + 1 \text{ p-NP}$), utilizando a absorvidade molar do p-NP ($\epsilon_{410\text{nm}} = 15.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Por fim a amostra teve a absorbância medida em 410 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer Lambda 25, sendo posteriormente calculada a atividade enzimática.

A hidrólise enzimática das amostras de palha de cana *in natura*, pré-tratada e pré-tratada seguida de deslignificação alcalina foi feita usando 30 mL de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 4,8) e 3 g de amostra (massa seca) com aproximadamente 10% de umidade, colocados em erlenmeyer de 125 mL. As cargas enzimáticas utilizadas foram de 15 FPU/g de amostra para o complexo Celluclast 1.5 L e de 10 UI/g de amostra para a enzima β -glicosidase. Em seguida o erlenmeyer foi colocado em uma incubadora Tecnal TE-420 sob agitação de 100 rpm, a 45 °C por 72 h. O hidrolisado juntamente com o resíduo de hidrólise foi fervido por 5 min, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro qualitativo previamente tarado. O resíduo de hidrólise ainda foi lavado com aproximadamente 50 mL de água destilada para recuperar a glicose remanescente. O hidrolisado enzimático e a água de lavagem foram avolumados e analisados por CLAE para determinação de açúcares, enquanto o papel de filtro contendo o resíduo de hidrólise foi reservado para determinar o rendimento da reação (item 4.7). A conversão enzimática da celulose foi calculada pela Equação 4.7.

$$C = \frac{M_g \times f_h}{M_i \times y_i} \cdot 100 \quad (4.7)$$

Sendo:

C: percentual de conversão enzimática da celulose;

M_g: massa de glicose presente no hidrolisado;

M_i: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise enzimática;

y_i: teor de celulose no material lignocelulósico;

f_h: fator de conversão de glicose em celulose (0,9)

4.7 Determinação dos rendimentos de reação e da solubilização dos componentes da palha de cana

Os rendimentos (expressos em relação à fração sólida) das reações de pré-tratamento, deslignificação e hidrólise enzimática foram calculados utilizando a Equação 4.8. O rendimento de pré-tratamento foi determinado em relação à massa inicial de palha de cana *in natura* e o rendimento de deslignificação foi determinado em relação à massa inicial de palha de cana pré-tratada.

$$R = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (4.8)$$

Sendo:

R: percentual de rendimento da reação;

M_{final}: massa final após a reação (massa seca);

M_{inicial}: massa inicial (massa seca);

Já as perdas de celulose, hemicelulose e lignina foram calculadas pela Equação 4.9. Os percentuais de solubilização de hemicelulose e lignina obtidos pelo pré-tratamento por explosão a vapor e pelo pré-tratamento com ácido diluído foram correlacionados com os percentuais de conversão enzimática, na tentativa de se

obter uma relação entre a conversão enzimática da celulose em função da solubilização de hemicelulose e lignina.

$$P = 100 \cdot \left(1 - \frac{R}{100} \cdot \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (4.9)$$

Sendo:

P: percentual de perda do componente;

R: percentual de rendimento da reação de pré-tratamento ou de designificação;

y_f : teor do componente da palha de cana após a reação;

y_i : teor do componente da palha de cana antes da reação;

4.8 Severidade dos pré-tratamentos

O índice de severidade descrito por Overend; Chornet (1987) permite avaliar o quão severo foi o pré-tratamento empregado na biomassa vegetal através da relação entre a temperatura do pré-tratamento, o tempo reacional (temperatura constante) e uma temperatura referencial de 100 °C (Equação 4.10). Um pré-tratamento com índice de severidade entre 0~3 é considerado brando e entre 4~6 é considerado severo (HEITZ et al., 1991). Os índices de severidade calculados para as reações de pré-tratamento por explosão a vapor e pré-tratamento com ácido diluído foram correlacionados com os percentuais de solubilização de hemicelulose e lignina, na tentativa de se obter uma relação entre a solubilização desses componentes em função da severidade do pré-tratamento.

$$\log(r_o) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (4.10)$$

Sendo:

$\log(r_o)$ = índice severidade;

t = tempo de reação (min);

T = temperatura (°C);

T_{ref} = 100 °C;

4.9 Análise da palha de cana por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Análises de FTIR foram realizadas para identificar mudanças na estrutura química da palha de cana pré-tratada e pré-tratada seguida de deslignificação, utilizando espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum GX. Amostras bastante moídas foram previamente secas em estufa a 60 °C, juntamente com KBr, sendo posteriormente resfriadas por 30 min em dessecador com P₂O₅ sob vácuo. Em seguida foram preparadas pastilhas com 250 mg de KBr e 1,5 mg da amostra, bem como uma pastilha de referência contendo apenas KBr. Todas as pastilhas foram compactadas em uma prensa manual Marconi a uma pressão de 0,98 MPa, sob vácuo, por 5 min. Por fim os espectros de todas as amostras foram medidos na região de número de ondas de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.10 Análise da palha de cana por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de palha de cana *in natura*, pré-tratada e pré-tratada seguida de deslignificação foram previamente fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento metálico com ouro em um metalizador Sputter Coater BAAL- TEC SCD 050. As microscopias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5900 LV com detector OXFORD (elétron secundário), com potência do feixe de elétrons de 10 kV (equipamento disponível no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS).

4.11 Teste de fermentabilidade da glicose obtida na etapa de hidrólise enzimática

Os hidrolisados enzimáticos e as águas de lavagem foram usados para avaliar a fermentabilidade da glicose obtida na etapa de sacarificação da celulose. Cinco tipos de hidrolisados enzimáticos foram testados: (1) hidrolisado obtido da palha de cana *in natura*, (2) da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor, (3)

da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada, (4) da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e (5) da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada. Todos os hidrolisados enzimáticos foram previamente analisados por CLAE para quantificação de glicose, HMF e furfural, utilizando as metodologias descritas nos itens 4.5.5 e 4.5.6.

O teste de fermentabilidade foi feito no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, usando 100 mL de hidrolisado enzimático contidos em erlenmeyer de 250 mL, exceto o hidrolisado enzimático da palha de cana *in natura* em que foi usado 50 mL devido a um menor volume disponível. Os hidrolisados enzimáticos foram enriquecidos com os seguintes componentes: $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (1 g/L), K_2HPO_4 (0,5 g/L), MgSO_4 (0,25 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e peptona (1 g/L) (SANTOS et al., 2010). Também foi feito um meio de cultivo-controle contendo todos os componentes citados e glicose (20 g/L) como fonte de carbono. Os hidrolisados tiveram o pH ajustado para 5 e em seguida foram autoclavados a 121 °C por 15 min.

Paralelamente foi preparado o inóculo a partir do repique da levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA1238 em tubo de ensaio contendo o meio GLP (glicose, extrato de levedura e peptona) sólido, o qual foi mantido em estufa a 30 °C por 24 h. Após esse período foi feito um novo repique em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio GLP líquido com pH=7, mantido a 30 °C por 20 h a 250 rpm (SANTOS et al., 2010). Após esse período o hidrolisado enzimático da palha *in natura* foi inoculado com 0,8 mL de inóculo e os demais com 1,58 mL, de modo que a concentração inicial de célula fosse 1 g/L. Em seguida os hidrolisados foram colocados em shaker New Brunswick Scientific C25KC sem agitação a 30 °C por 48 h, retirando-se uma amostra de 5 mL no início da fermentação (tempo 0), 28 h e 48 h.

As amostras dos hidrolisados fermentados contendo células de levedura foram filtradas a vácuo usando membranas milipore 45 µm previamente taradas, as quais foram reservadas para determinar o crescimento celular. Os hidrolisados fermentados foram armazenados em frasco para posterior quantificação de açúcares e etanol por CLAE. O cromatógrafo utilizado foi o Agilent Serie 1200 e a metodologia usada foi a mesma descrita no item 4.5.5. Os rendimentos do processo fermentativo foram determinados pela relação entre a quantidade de etanol produzido e a quantidade de glicose consumida, enquanto que as eficiências das fermentações

foram determinadas pela relação entre o rendimento obtido e o rendimento teórico (0,51), conforme a estequiometria da reação:

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CANA *IN NATURA*

A caracterização química da palha de cana *in natura* e os desvios médios de cada componente estão apresentados na Tabela 5.1. Os dados obtidos foram comparados com trabalhos anteriores desenvolvidos pelo Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem e Simulação da Escola de Engenharia de Lorena, em que a palha de cana também foi utilizada como objeto de estudo.

Moriya (2007) e Silva (2009) utilizaram a mesma metodologia descrita por Gouveia et al. (2009) para caracterizar a palha de cana *in natura* (Tabela 5.2) e alcançaram resultados semelhantes aos da Tabela 5.1. A regularidade nos resultados indica que a metodologia (desenvolvida para determinar a composição química do bagaço de cana) também pode ser aplicada à palha de cana. Além disso, os percentuais dos principais componentes totalizaram 100% ou valores muito próximos.

O percentual de celulose presente na palha de cana usada neste trabalho é de 39,82%. Dados comparativos mostram valores similares (36,1%-38,1%), revelando que a palha possui um percentual de celulose mais baixo em relação ao encontrado na literatura para bagaço da cana (42%~45,4%), de acordo com Alkasrawi et al., (2003), Gonçalves (2008) e Rodrigues et al. (2010). Mesmo assim, o teor de celulose da palha de cana é considerado alto e torna a palha de cana uma biomassa vegetal interessante para a produção de etanol celulósico.

Saad et al. (2008) afirmam que o processamento de 1 ton de cana gera em torno de 140 kg de palha (massa seca). Isso significa que a partir da colheita de 1 ton de cana seria possível a obtenção de 53 kg de celulose. Considerando que a previsão para a safra 2009/2010 foi estimada em 651 milhões de ton de cana processada em todo país (CONAB, 2010), isso representa 91 milhões de toneladas de palha, ou seja, 34,4 milhões de ton de celulose. Para uma remoção de 50% da palha disposta no campo, a quantidade de celulose disponível como matéria prima para obtenção de etanol seria de 17,2 milhões de ton.

Tabela 5.1 – Caracterização química da palha de cana-de-açúcar *in natura*

Celulose	39,8% ± 0,3
Hemicelulose	28,6% ± 0,2
Lignina total	22,5% ± 0,1
Cinza	2,4% ± 0,3
Extrativos	6,2% ± 0,3
Total	99,6% ± 1,2

Tabela 5.2 – Composição da palha de cana-de-açúcar *in natura* descrita por Moriya (2007) e Silva (2009)

Componente	Moriya (2007)	Silva (2009)
Celulose	36,1% ± 0,5	38,1% ± 0,2
Hemicelulose	28,3% ± 0,1	29,2% ± 0,3
Lignina	26,2% ± 0,5	24,2% ± 0,2
Cinzas	2,1% ± 0,2	2,4% ± 0,1
Extrativos	5,2% ± 0,1	5,9% ± 0,2
Total	97,9% ± 1,4	99,8% ± 1,0

5.2 PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR

Os rendimentos das reações de pré-tratamento por explosão a vapor (Tabela 5.3) apresentaram percentuais semelhantes para as três temperaturas estudadas. Portanto, em torno de 40% dos componentes da palha foram solubilizados e removidos através das lavagens realizadas logo após o pré-tratamento. É pertinente ressaltar que durante as etapas de pré-tratamento, coleta do material pré-tratado, transporte para o local de secagem e recolhimento para pesagem, tomou-se bastante cuidado a fim de se evitar grandes perdas de material.

Pitarelo (2007) obteve um rendimento de 59% para o pré-tratamento por explosão a vapor a 195 °C, por 9 min, percentual semelhante ao obtido para a temperatura de 180 °C, por 15 min. Dessa forma, os rendimentos das reações não foram alterados significativamente pelos problemas existentes no reator utilizado. A Tabela 5.4 apresenta os resultados de caracterização química da palha de cana pré-tratada sob as três condições empregadas. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais foram multiplicados pelos respectivos

rendimentos de reação para analisar as alterações na composição da palha pré-tratada em relação à palha *in natura* (Tabela 5.5).

Tabela 5.3 – Rendimentos das reações de explosão a vapor

Condição de pré-tratamento	Rendimento* (%)
180 °C, 15 min	58
190 °C, 15 min	57
200 °C, 15 min	56

*Rendimento em relação à fração sólida

Tabela 5.4 – Caracterização química da palha pré-tratada por explosão a vapor

	180 °C	190 °C	200 °C
Celulose (%)	47,8 ± 0,2	48,6 ± 0,7	48,7 ± 0,5
Hemicelulose (%)	16,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2	3,7 ± 0,1
Lig. Total (%)	32,5 ± 0,1	38,1 ± 0,2	41,8 ± 0,2
Cinza (%)	3,5 ± 0,1	5,2 ± 0,2	5,2 ± 0,1
Total (%)	100,0 ± 0,7	99,1 ± 1,3	99,33 ± 1,0

Tabela 5.5 – Valores de caracterização química da palha pré-tratada por explosão a vapor corrigidos pelos respectivos rendimentos

	Palha <i>in natura</i>	180 °C	190 °C	200 °C
	-	R = 58%	R = 57%	R = 56%
Celulose (%)	39,8	27,7	27,7	27,3
Hemicelulose (%)	28,6	9,4	4,1	2,1
Lig. Total (%)	22,5	18,8	21,7	23,4
Cinza (%)	2,4	2,0	4,0	3,0
Extrativos (%)	6,2			

Memória de cálculo: 180 °C: Celulose = 47,8 x 0,58 = 27,7

A Figura 5.1 apresenta o percentual de solubilização determinado a partir da relação entre quantidade do componente na palha de cana pré-tratada e na palha de cana *in natura*. Pôde-se observar uma grande solubilização da hemicelulose,

alcançando um percentual máximo de 93% para o pré-tratamento a 200 °C. A preservação da fração celulósica é outro aspecto importante relacionado à eficiência do pré-tratamento, uma vez que essa é a matéria-prima de interesse para a produção de etanol. Nas três condições estudadas ocorreu uma perda de 30% de celulose. Esse fato pode estar associado a uma degradação, principalmente, da fase amorfa da cadeia celulósica, sendo a fase cristalina conservada ou apenas parcialmente degradada.

Com relação à lignina, a maior remoção aconteceu a 180 °C (16,8%), sendo a sua solubilização diminuída em temperaturas mais elevadas. Uma hipótese para este comportamento refere-se à ocorrência de reações de condensação que podem ocorrer na estrutura molecular da lignina, entre seus grupos fenólicos, e fragmentos fenólicos de outros compostos presentes na palha, oriundos, por exemplo, dos extrativos (FENGEL; WEGENER, 1989; CHEN; HAN; CHU, 2008). Desta forma, pode ter ocorrido um rearranjo na estrutura da lignina, resultando no aumento na sua massa molecular.

Figura 5.1 – Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através do pré-tratamento por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C

5.3 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO DILUÍDO

Os rendimentos das reações de pré-tratamento com ácido diluído a 180 °C, 185 °C, 190 °C e 195 °C estão apresentados na Tabela 5.6. As reações provocaram uma maior solubilização dos componentes da palha de cana, conforme o aumento da temperatura de pré-tratamento. Silva (2009) obteve um rendimento de 57% quando realizou um pré-tratamento com ácido diluído a 120 °C, 10 min, H₂SO₄ 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v) e agitação de 100 rpm. Comparando com o valor de 54% de rendimento encontrado para a menor temperatura de reação (180 °C), percebe-se que os valores são próximos. Este fato pode ser justificado pela maior quantidade de ácido sulfúrico utilizado pelo autor, o que pode ter favorecido uma maior solubilização dos componentes da palha, mesmo sob efeito de uma temperatura mais branda.

Tabela 5.6 – Rendimentos das reações de pré-tratamento com ácido diluído

Condição de pré-tratamento	Rendimento* (%)
180 °C, 10 min	54
185 °C, 10 min	48
190 °C, 10 min	46
195 °C, 10 min	38

*Rendimento em relação à fração sólida

A Tabela 5.7 apresenta os percentuais de rendimentos obtidos por Oliveira (2008), usando o mesmo reator rotatório Regmed para o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana nas mesmas condições de temperatura e tempo de reação. O autor obteve rendimentos maiores para todas as temperaturas de trabalho, chegando a uma diferença de aproximadamente 19% para a reação realizada a 195 °C. Portanto, a presença de ácido, mesmo em pequena concentração, favoreceu uma maior solubilização dos componentes da palha de cana.

Tabela 5.7 – Rendimentos do pré-tratamento hidrotérmico obtidos por Oliveira (2008)

Condição de pré-tratamento	Rendimento* (%)
180°C, 10 min	55
185°C, 10 min	52
190°C, 10 min	48
195°C, 10 min	47

*Rendimento em relação à fração sólida

A Tabela 5.8 apresenta os resultados de caracterização química da palha de cana pré-tratada sob as quatro condições empregadas. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais foram multiplicados pelos respectivos rendimentos de reação para analisar as alterações na composição da palha de cana pré-tratada em relação à palha de cana *in natura* (Tabela 5.9).

Tabela 5.8 – Caracterização química da palha pré-tratada com ácido diluído

	180 °C	185 °C	190 °C	195 °C
Celulose (%)	57,2 ± 0,4	59,2 ± 0,2	59,4 ± 0,8	60,3 ± 0,3
Hemicelulose (%)	11,8 ± 0,3	8,5 ± 0,2	6,8 ± 0,3	3,5 ± 0,1
Lig. Total (%)	26,1 ± 0,2	27,8 ± 0,7	28,3 ± 0,3	32,0 ± 0,2
Cinza (%)	3,7 ± 0,8	3,8 ± 0,5	4,5 ± 0,5	4,3 ± 0,1
Total (%)	98,8 ± 1,7	99,4 ± 1,6	99,0 ± 2,0	100,0 ± 0,7

Tabela 5.9 – Valores de caracterização química da palha de cana pré-tratada com ácido diluído corrigidos pelos respectivos rendimentos

	Palha <i>in natura</i>	180 °C	185 °C	190 °C	195 °C
	-	R = 54%	R = 48%	R = 46%	R = 38%
Celulose (%)	39,8	31,0	28,4	27,3	23,0
Hemicelulose (%)	28,6	6,4	4,1	3,1	1,3
Lig. Total (%)	22,5	14,1	13,4	13,0	12,1
Cinza (%)	2,4	2,0	1,8	2,1	1,6
Extrativos (%)	6,2	-	-	-	-

Memória de cálculo: 180 °C: Celulose: 57,2 x 0,54 = 31,0

A Figura 5.2 apresenta o percentual de solubilização determinado a partir da relação entre quantidade do componente na palha de cana pré-tratada e na palha de cana *in natura*. O polímero hemicelulósico sofreu forte hidrólise a 195 °C, havendo a solubilização de 95,3%. Quanto à remoção de lignina, houve uma remoção média de 41,6% para este tipo de pré-tratamento, sendo a maior remoção obtida a 195 °C. A remoção de hemicelulose e lignina obtida por Silva (2009) foi de 66,9% e 31,9%, respectivamente. Oliveira (2008) trabalhando com palha de cana pré-tratada hidrotermicamente a 190 °C por 10 min, no mesmo reator, alcançou uma remoção de lignina de 42,0%, valor semelhante ao encontrado neste trabalho (42,1%) para a mesma condição de temperatura e tempo de reação.

Figura 5.2 - Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas através do pré-tratamento com ácido diluído a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C e (4) 195 °C

Em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor, sob as mesmas temperaturas de 180 °C e 190 °C, o pré-tratamento com ácido diluído se mostrou mais eficiente na remoção de hemicelulose e lignina (Figura 5.3). A 180 °C houve a remoção de 77,6% de hemicelulose e 37,5% de lignina (13% e 55% a mais em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor). Da mesma forma, a 190 °C ocorreu a remoção de 89,1% de hemicelulose e 42,1% de lignina (4% e 92% a mais em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor). Com relação à preservação da

celulose, o pré-tratamento com ácido diluído a 180 °C manteve um maior percentual de celulose (77,6%) conservada na fibra da palha de cana. Entretanto, sob a temperatura de 190 °C houve um percentual de solubilização semelhante (30,3% e 31,4%) para os dois pré-tratamentos.

Figura 5.3 – Comparação entre o pré-tratamento por explosão a vapor (EV) e o pré-tratamento com ácido diluído (AD) nas mesmas temperaturas

Durante o pré-tratamento, a auto-hidrólise da celulose e hemicelulose tem início a partir de temperaturas acima dos 100 °C (ALLEN et al., 2001). Dessa forma, para o pré-tratamento cujo reator não possui sistema de injeção de vapor saturado, deve-se considerar que o tempo total de reação não ocorre apenas durante as temperaturas definidas para o trabalho, mas sim durante todo o período em que a temperatura do reator permanece acima 100 °C. A Figura 5.4 apresenta as curvas de aquecimento de todas as reações de pré-tratamento com ácido diluído. As reações de hidrólise tiveram início em torno de 30 min antes da contagem dos 10 min em temperatura constante. Ao término do tempo de reação, o resfriamento do reator foi acelerado abrindo-se a válvula de despressurização. Mesmo assim, a temperatura permaneceu acima dos 100 °C, em média, por 40 min.

continua

conclusão

Figura 5.4 – Rampas de aquecimento das reações de pré-tratamento com ácido diluído no reator REGMED AU/E 20

A Tabela 5.10 apresenta os volumes de cada hidrolisado recuperado, bem como as concentrações dos componentes gerados a partir das reações de pré-tratamento com ácido diluído. A 195 °C foi obtido um hidrolisado as maiores concentrações de açúcares, principalmente xilose (8 g/L) e a presença de glicose evidencia a ocorrência de hidrólise da fração celulósica. Os compostos HMF e furfural também foram gerados a partir da degradação dos açúcares. Entretanto, suas concentrações estão abaixo do valor esperado. A abertura da válvula de despressurização do reator para acelerar o resfriamento causou uma grande liberação de vapor, o que pode ter ocasionado um processo de concentração desses açúcares no hidrolisado remanescente, bem como a volatilização dos compostos inibidores da fermentação. Em relação ao ácido glucurônico, possíveis oligômeros presentes nos hidrolisados podem ter sido identificados no cromatógrafo este ácido orgânico, fazendo com que o mesmo tenha apresentado valores acima do esperado.

Tabela 5.10 – Volumes dos hidrolisados recuperados (em litros) e concentrações dos principais compostos presentes nos hidrolisados obtidos pelo pré-tratamento com ácido diluído, em g/L

	180 °C	185 °C	190 °C	195 °C
Volume do hidrolisado recuperado (L)	4,4	4,6	4,7	5,3
Ác. Glucorônico	4,0	5,2	5,0	3,0
Glicose	1,2	1,2	1,0	2,4
Xilose	4,0	7,0	6,0	8,0
Arabinose	3,0	3,0	2,2	2,5
Ác. Acético	1,0	1,0	1,0	1,5
HMF	0,5	0,5	0,4	1,0
Furfural	0,4	0,4	0,4	1,0

5.4 Severidade dos pré-tratamentos

As reações de pré-tratamento por explosão a vapor apresentaram os seguintes índices de severidade: 3,53 para o pré-tratamento a 180 °C; 3,83 para o pré-tratamento a 190 °C e 4,12 para o pré-tratamento a 200 °C. Portanto, de acordo Heitz et al. (1991), os pré-tratamentos a 180 °C e 190 °C apresentaram índices de severidade considerados brandos, enquanto que o pré-tratamento a 200 °C apresentou índice de severidade considerado severo. Já as reações de pré-tratamento com ácido diluído apresentaram índices de severidade considerados brandos, sendo eles: 3,36 para a reação a 180 °C; 3,50 para a reação a 185 °C; 3,65 para a reação a 190 °C e 3,80 para a reação a 195 °C.

Os dados de solubilização dos componentes macromoleculares e dos índices de severidade de cada pré-tratamento foram utilizados na tentativa de se estabelecer uma correlação entre os mesmos. Para o pré-tratamento por explosão a vapor foi possível estabelecer uma correlação linear apenas para a hemicelulose (Figura 5.5) e para o pré-tratamento com ácido diluído foi observada a existência de uma linearidade tanto para a hemicelulose quanto para a lignina (Figura 5.6).

Figura 5.5 – Correlação linear do percentual de solubilização da hemicelulose em função dos índices de severidade dos pré-tratamentos por explosão a vapor

Figura 5.6 – Correlação linear do percentual de solubilização da hemicelulose e lignina em função dos índices de severidade dos pré-tratamentos com ácido diluído

5.5 Deslignificação alcalina da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor

Uma fração da palha de cana pré-tratada foi deslignificada para remover uma maior quantidade de lignina remanescente na fibra. Dessa forma foi possível avaliar o efeito da deslignificação na etapa de hidrólise enzimática em relação à palha de cana apenas pré-tratada. Os rendimentos das reações de deslignificação (Tabela 5.11) mostram que entre 41-46% dos componentes da palha de cana pré-tratada foram removidos.

Tabela 5.11 – Rendimentos das reações de deslignificação da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor

Amostra	Rendimento* (%)
Palha de cana pré-tratada a 180 °C (PEV 180)	59
Palha de cana pré-tratada a 190 °C (PEV 190)	55
Palha de cana pré-tratada a 200 °C (PEV 200)	54

*Rendimento em relação à fração sólida

A Tabela 5.12 apresenta os resultados de caracterização química da palha de cana pré-tratada e deslignificada. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais foram multiplicados pelos respectivos rendimentos das reações de pré-tratamento e de deslignificação para analisar as alterações na composição da palha de cana pré-tratada e deslignificada em relação à palha de cana *in natura* (Tabela 5.13).

A Figura 5.7 apresenta os percentuais de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento e da deslignificação alcalina. A quantidade de celulose perdida nas duas etapas de tratamento da palha de cana foi, em média, de 40%. Em relação à hemicelulose, houve uma solubilização média de 92%, sendo a maior remoção (94%) observada para a condição de pré-tratamento a 200 °C. As duas etapas de tratamento fizeram com que 87% da lignina fosse solubilizada.

Tabela 5.12 – Caracterização química da palha pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada

	PEV 180	PEV 190	PEV 200
Celulose (%)	73,0 ± 0,2	74,8 ± 0,3	74,6 ± 0,5
Hemicelulose (%)	9,5 ± 0,7	6,1 ± 0,6	5,9 ± 0,4
Lig. Total (%)	8,8 ± 0,4	10,3 ± 0,3	14,0 ± 0,4
Cinza (%)	7,1 ± 0,8	8,5 ± 0,8	7,0 ± 0,7
Total (%)	99,3 ± 2,2	99,7 ± 2,0	101,3 ± 2,0

Tabela 5.13– Valores de caracterização química da palha pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada, corrigidos pelos rendimentos de pré-tratamento e deslignificação

	Palha <i>in natura</i>	PEV 180	PEV 190	PEV 200
	-	R =34%	R = 31%	R = 30%
Celulose (%)	39,8	24,9	23,5	22,5
Hemicelulose (%)	28,6	3,3	1,9	1,8
Lig. Total (%)	22,5	3,0	3,2	4,2
Cinza (%)	2,4	2,4	2,7	2,1
Extrativos (%)	6,3	-	-	-

Memória de cálculo: 180 °C: $R = 0,58 \times 0,59 = 0,34$
 180 °C: Celulose = $72,9 \times 0,34 = 24,9$

Figura 5.7 – Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e da deslignificação alcalina

5.6 Deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído

Uma fração da palha de cana pré-tratada com ácido diluído foi deslignificada para avaliar o efeito da deslignificação na etapa de hidrólise enzimática em relação à palha de cana apenas pré-tratada. Os rendimentos das reações de deslignificação estão apresentados na Tabela 5.14. Na Tabela 5.15 estão os resultados de caracterização química da palha de cana pré-tratada e deslignificada. Os percentuais de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais foram multiplicados pelos respectivos rendimentos das reações de pré-tratamento e deslignificação para analisar as alterações na composição química da palha de cana pré-tratada e deslignificada em relação à palha de cana *in natura* (Tabela 5.16).

Tabela 5.14 – Rendimentos das reações de deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído

Amostra	Rendimento* (%)
Palha de cana pré-tratada a 180 °C (RPTP 180)	75
Palha de cana pré-tratada a 185 °C (RPTP 185)	76
Palha de cana pré-tratada a 190 °C (RPTP 190)	76
Palha de cana pré-tratada a 195 °C (RPTP 195)	73

*Rendimento em relação à fração sólida

Tabela 5.15 – Caracterizações da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada

	RPTP 180	RPTP 185	RPTP 190	RPTP 195
Celulose (%)	67,0 ± 0,5	71,2 ± 0,4	76,4 ± 0,8	78,4 ± 0,7
Hemicelulose (%)	7,4 ± 0,5	8,0 ± 0,6	4,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2
Lig. Total (%)	24,8 ± 0,5	20,2 ± 0,3	17,2 ± 0,5	15,5 ± 1,0
Cinza (%)	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,9 ± 0,4
Total (%)	100,4 ± 2,2	101,0 ± 1,5	100,0 ± 1,8	99,1 ± 2,2

Tabela 5.16 – Valores de caracterização química da palha pré-tratada com ácido diluído e deslignificada, corrigidos pelos rendimentos de pré-tratamento e deslignificação

	Palha <i>in natura</i>	RPTP 180	RPTP 185	RPTP 190	RPTP 195
	-	R = 41%	R = 36%	R = 35%	R = 28%
Celulose (%)	39,8	27,1	26,0	26,7	21,8
Hemicelulose (%)	28,6	3,0	2,8	1,5	0,6
Lig. Total (%)	22,5	10,0	7,3	6,0	4,3
Cinza (%)	2,4	0,5	0,6	0,8	0,8
Extrativos (%)	6,3	-	-	-	-

Memória de cálculo: 180 °C: $R = 0,54 \times 0,75 = 0,41$

180 °C: Celulose = $66,9 \times 0,41 = 27,1$

A Figura 5.8 apresenta os percentuais de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento e da deslignificação alcalina. A quantidade de celulose perdida nas duas etapas de tratamento da palha de cana foi, em média, de 35% atingindo percentual máximo de 45% para a condição de pré-tratamento a 195 °C. Em relação à hemicelulose, houve uma solubilização média de 93%, sendo a maior remoção (97,8%) observada para a condição de pré-tratamento a 195 °C. A combinação do pré-tratamento e da deslignificação fez com que uma grande quantidade de lignina fosse solubilizada, atingindo percentual máximo de 81% para a condição de pré-tratamento a 195 °C.

Silva (2009) realizando pré-tratamento com ácido diluído e deslignificação alcalina da palha de cana obteve uma perda semelhante de celulose (30%) e hemicelulose (89%), e uma maior remoção de lignina. Oliveira (2008) empregou o pré-tratamento hidrotérmico e deslignificação alcalina nas mesmas condições de tempo e temperatura deste trabalho, obtendo entre 88-97% de remoção da hemicelulose e entre 75-86% de lignina.

Figura 5.8 – Solubilização de celulose, hemicelulose e lignina pelo efeito do pré-tratamento com ácido diluído a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C, (4) 195 °C e da deslignificação alcalina

5.7 Análise da palha de cana por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 5.9 apresenta uma combinação dos espectros da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e da palha de cana *in natura*. Percebe-se a presença de bandas de vibração em 3300 e em 3000 cm^{-1} , característico de ligações O-H e C-H, as quais apresentam bandas de vibração na faixa de 3800-2700 cm^{-1} . Outras bandas de vibração em 1700 cm^{-1} são atribuídas a estruturas químicas com ligações C=O e C=C, as quais apresentam bandas de vibração na faixa de 1900-1100 cm^{-1} e são relacionadas a ácidos carboxílicos e anéis aromáticos.

As bandas vibracionais em 1700 cm^{-1} dos espectros da palha de cana pré-tratada apresentaram uma menor absorvância em relação ao espectro da palha de cana *in natura*. Esse fato pode estar associado à redução do percentual de hemicelulose na fibra vegetal, a qual possui grupos carboxílicos associados a sua estrutura ramificada. Também ocorreu diminuição das bandas referentes às ligações C-H e C=C. A etapa de deslignificação pode ter provocado uma redução da intensidade das bandas vibracionais, principalmente entre 1700-1300 cm^{-1} , em decorrência da remoção da lignina e da hemicelulose remanescente (Figura 5.10).

A Figura 5.11 apresenta uma combinação dos espectros da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e da palha *in natura*. O efeito do pré-tratamento pode ter ocasionado a redução das bandas vibracionais na faixa característica de grupos carboxílicos (1700 cm^{-1}), em decorrência da remoção de hemicelulose. Houve também uma redução das bandas referentes a anéis aromáticos (entre $1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$). A Figura 5.12 apresenta os espectros da palha de cana pré-tratada e deslignificada, onde a etapa de deslignificação pode ter provocado uma redução da intensidade das bandas vibracionais, principalmente entre $1700\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, em decorrência da remoção da lignina e da hemicelulose remanescente.

Figura 5.9 – Espectros de FTIR da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e pré-tratada por explosão a vapor a 180 °C (—), a 190 °C (—) e a 200 °C (—)

Figura 5.10 – Espectros de FTIR da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e pré-tratada por explosão a vapor a 180 °C (—), a 190 °C (—) e a 200 °C (—), seguida de deslignificação

Figura 5.11 – Espectros de FTIR da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e pré-tratada com ácido diluído a 180 °C (—), a 185 °C (—), a 190 °C (—) e a 195 °C (—)

Figura 5.12 – Espectros de FTIR da palha de cana-de-açúcar “in natura” (—) e pré-tratada com ácido diluído a 180°C (—), a 185°C (—), a 190°C (—) e a 195°C (—), seguida de deslignificação

5.8 Microscopias das amostras de palha de cana

Os processos de pré-tratamento e deslignificação aplicados na palha de cana provocam a remoção de grande quantidade de hemicelulose e lignina, tornando a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas. Isso promove uma modificação na estrutura morfológica da palha de cana tratada em relação à palha *in natura*, variando de acordo com a severidade do tratamento empregado. Essas modificações podem ser visualizadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura.

A Figura 5.13 apresenta fragmentos da palha de cana *in natura*, onde é possível a identificação de células parenquimáticas, além de elementos de vasos (células alongadas com diversas perfurações) (RAVEN; EVERT; EICHCHORN, 2001). O pré-tratamento por explosão a vapor (Figura 5.14) provocou uma maior fragmentação dos tecidos vegetais em relação ao pré-tratamento com ácido diluído, tornando mais expostas as fibras (um tipo de célula do tecido esclerenquimático) e as células do parênquima. Ao sofrer um processo de deslignificação (Figura 5.15), as fibras e micro fibras ricas em celulose ficaram mais evidentes. Já o pré-tratamento com ácido diluído (Figura 5.16) provocou a exposição dos tecidos

internos, podendo ser observadas tanto as fibras como também os elementos de vaso. O processo de deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído (Figura 5.17) proporcionou um realce das fibras ricas em celulose.

Figura 5.13 – Micrografias da palha de cana *in natura*. Mag. 500x e 1000x

Figura 5.14 – Micrografias da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor. Mag. 500x e 1000x

Figura 5.15 – Micrografias da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada. Mag. 500x e 1000x

Figura 5.16 – Micrografias da palha de cana pré-tratada com ácido diluído. Mag. 500x e 1000x

Figura 5.17 – Micrografias da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada. Mag. 500x e 1000x

5.9 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A seguir serão apresentados os resultados de hidrólise enzimática das amostras de palha de cana pré-tratada, e pré-tratada seguida de deslignificação. As condições de pré-tratamento por explosão a vapor empregadas neste trabalho proporcionaram uma conversão enzimática da fração celulósica acima de 60%. O maior índice foi alcançado pelo pré-tratamento a 200 °C, em que 80% da celulose foi hidrolisada (Figura 5.18).

Figura 5.18 – Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C

As concentrações de glicose nos hidrolisados enzimáticos estão apresentadas na Figura 5.19. A hidrólise enzimática das amostras de palha de cana que foram pré-tratadas a 180 °C e a 190 °C gerou um hidrolisado com 35,6 g/L e 40,2 g/L, respectivamente. A maior concentração de glicose (46,6 g/L) foi identificada no hidrolisado enzimático da amostra de palha de cana pré-tratada a 200 °C, corroborando com os resultados de conversão enzimática.

A etapa de deslignificação da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor proporcionou um aumento da conversão enzimática da fração celulósica. O percentual de conversão enzimática foi maior para a palha pré-tratada a 180 °C, em que 85% da celulose foi hidrolisada (Figura 5.20).

Figura 5.19 – Percentual de glicose obtida pela hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C e (3) 200 °C

Figura 5.20 – Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e deslignificada

As concentrações de açúcar nos hidrolisados enzimáticos da palha pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada estão apresentadas na Figura 5.21. O hidrolisado com maior concentração de açúcar (70,2 g/L) foi obtido da palha de cana deslignificada e previamente pré-tratada a 200 °C. As demais concentrações foram: 68,6 g/L e 63,8 g/L para as amostras de palha de cana deslignificada e previamente pré-tratada a 180 °C e 190 °C, respectivamente. Portanto, em relação aos

percentuais de conversão enzimática, os valores de glicose presente nos hidrolisados não diferiram na mesma intensidade. Isso pode ter acontecido em decorrência a uma maior diluição do hidrolisado enzimático, já que os dados são expressos em g/L.

Figura 5.21 – Percentual de glicose obtida pela hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor a (1) 180 °C, (2) 190 °C, (3) 200 °C e designificada

A Figura 5.22 apresenta a conversão enzimática das amostras de palha de cana pré-tratada com ácido diluído. A conversão enzimática aumentou conforme uma maior temperatura de pré-tratamento empregado na palha de cana, alcançando percentual máximo de 72,4%, valor semelhante ao obtido pelo pré-tratamento por explosão a vapor a 200 °C (71,5%). Porém, nas demais condições de pré-tratamento por explosão a vapor (180 °C e 190 °C), a conversão enzimática atingiu valores maiores. Já em relação à obtenção de glicose, a maior concentração obtida foi 52,5 g/L para o pré-tratamento a 195 °C (Figura 5.23).

Figura 5.22 – Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada a (1) 180°C, (2) 185°C, (3) 190°C e (4) 195°C

Oliveira (2008) realizou um pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana a 195 °C por 15 min e obteve uma conversão enzimática de 53%, valor semelhante ao alcançado para o pré-tratamento com ácido diluído a 180 °C. Silva (2009) alcançou uma conversão enzimática de 55% quando pré-tratou a palha com ácido sulfúrico diluído 1% (m/v), a 120 °C por 10 min.

Figura 5.23 – Percentual de glicose obtida após a etapa de hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C e (4) 195°C

A deslignificação da palha de cana pré-tratada com ácido diluído favoreceu a etapa de sacarificação, fazendo com que o percentual de conversão atingisse 84,5% (Figura 5.24). Esses valores de conversão enzimática são semelhantes aos valores obtidos pela deslignificação da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor. A concentração média de glicose presente nos hidrolisados enzimáticos foi 63 g/L (Figura 5.25).

Figura 5.24 – Conversão enzimática da palha de cana pré-tratada a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C, (4) 195 °C e deslignificada

Figura 5.25 – Percentual de glicose obtida após a etapa de hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada a (1) 180 °C, (2) 185 °C, (3) 190 °C, (4) 195 °C e deslignificada

A quantidade de hemicelulose e lignina na biomassa vegetal é um fator bastante influente na eficiência da hidrólise enzimática. Essa informação pode ser corroborada pela Figura 5.26, onde foi expressa uma correlação linear do aumento da conversão enzimática em função do aumento da solubilização de hemicelulose e lignina, obtida através do pré-tratamento com ácido diluído. Para o pré-tratamento por explosão a vapor, bem como para as etapas de deslignificação, os coeficientes de relação atingiram valores não satisfatórios.

As correlações feitas neste trabalho de solubilização dos componentes em função da severidade (ver Figura 5.6) e da conversão enzimática em função da solubilização dos componentes (Figura 5.26) permitem estimar o quanto de conversão enzimática poderia ser alcançado realizando um pré-tratamento com ácido diluído nas condições de tempo e temperatura que resultassem em um valor de severidade dentro da faixa de valores obtidos neste trabalho, bem como realizando a hidrólise enzimática nas mesmas condições empregadas.

Figura 5.26 – Correlação linear da conversão enzimática da fração celulósica em função da solubilização de hemicelulose e lignina pelo pré-tratamento com ácido diluído

5.10 FERMENTABILIDADE DA GLICOSE OBTIDA NA ETAPA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os hidrolisados enzimáticos obtidos na etapa de sacarificação foram testados quanto à fermentabilidade da glicose utilizando a levedura *S. cerevisiae* UFPEDA 1238. Os perfis de fermentação estão apresentados na Figura 2.27. O hidrolisado enzimático da palha *in natura* apresentou uma baixa concentração de glicose (2,6 g/L), resultando assim em uma pequena quantidade de etanol produzida (menos de 1 g/L). A concentração de etanol nos hidrolisados fermentados da palha de cana apenas pré-tratada atingiu valores menores em relação ao experimento controle (4,6 g/L no hidrolisado da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e 6 g/L no hidrolisado da palha de cana pré-tratada com ácido diluído). Entretanto deve-se considerar que a concentração inicial de glicose foi menor em relação ao experimento controle, o que pode justificar a menor produção de etanol.

A fermentação dos hidrolisados da palha de cana que foi pré-tratada e deslignificada foi iniciada com uma concentração de glicose semelhante ao experimento controle (20 g/L) e com isso o perfil de fermentação apresentou-se similar. A concentração de etanol atingiu 8,8 g/L no hidrolisado fermentado da palha de cana pré-tratada por explosão e deslignificada e 8,7 g/L no hidrolisado fermentado da palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslignificada.

Em todos os hidrolisados foi observado um consumo de mais de 95% de glicose após 28 h de fermentação, exceto para os hidrolisados da palha de cana *in natura* e da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor. Em relação à eficiência do processo fermentativo (Tabela 5.17), o hidrolisado fermentado da palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslignificada apresentou máximo valor (86,3%), maior do que o experimento controle (82,3%). Os demais experimentos apresentaram eficiência acima de 70%.

continua

conclusão

Figura 5.27 – Perfil de fermentação do experimento controle, do hidrolisado enzimático da palha *in natura* e da palha tratada sob diferentes condições

Tabela 5.17 – Rendimento e eficiência dos ensaios de fermentação

Hidrolisado	Glicose. consumida (g)	Etanol produzido (g)	Rendimento	Eficiência (%)
Controle	2,0	0,84	0,42	82,3
Palha de cana <i>in natura</i>	0,3	0,1	0,23	45,2
Palha de cana pré-tratada por explosão a vapor	1,1	0,5	0,42	83,0
Palha de cana pré-tratada por explosão a vapor e deslig.	2,0	1,0	0,44	86,3
Palha de cana pré-tratada com ácido diluído	1,6	1,0	0,37	73,5
Palha de cana pré-tratada com ácido diluído e deslig.	2,2	1,0	0,40	79,0

6 CONCLUSÕES

- A palha de cana se mostra uma biomassa lignocelulósica interessante para a obtenção de etanol celulósico por conter um alto teor de celulose e por apresentar resultados de pré-tratamento e deslignificação similares aos do bagaço de cana;

Quanto aos pré-tratamentos:

- As condições de pré-tratamento por explosão a vapor e de pré-tratamento com ácido diluído estudadas garantiram uma eficiente remoção de hemicelulose;
- O pré-tratamento com ácido diluído provocou uma maior degradação da celulose e também uma maior remoção de lignina em relação ao pré-tratamento por explosão a vapor;

Quanto à deslignificação alcalina:

- A deslignificação alcalina contribuiu para a remoção de até 80% da lignina e provocou a solubilização da hemicelulose remanescente da palha pré-tratada;

Quanto à hidrólise enzimática:

- O pré-tratamento por explosão a vapor a 200 °C promoveu a maior conversão enzimática (80%).
- A conversão enzimática foi aumentada pela aplicação do processo de deslignificação alcalina, chegando a 85%

Quanto às severidades dos pré-tratamentos:

- As condições de pré-tratamento por explosão permitiram estabelecer uma correlação entre severidade e solubilização de hemicelulose;
- As condições de pré-tratamento com ácido diluído permitiram estabelecer correlações entre severidade, solubilização de hemicelulose e lignina, e conversão enzimática da celulose;

Quanto à fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos:

- A fermentação dos hidrolisados enzimáticos se mostrou satisfatória, apresentando percentuais de eficiência acima de 70%;

REFERÊNCIAS

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNEDLD, F.; ZACCHI, G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 71-78, 2003.

ALLEN, S.G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M.J.; LASER, M.; LYND, L.R. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 40, p. 2934-2941, 2001.

ANDREOLI, C. Convergência de agricultura e energia: I. produção de biomassa celulósica para biocombustíveis e eletricidade. **Economia e Energia**. v. 66, 2008.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 1843-1848, 2004.

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.129, p. 496-508, 2006.

BIODIESELBR - PRÓ-ÁLCOOL – PROGRAMA BRASILEIRO DO ÁLCOOL. 2007. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm>>. Acesso em 07 de março de 2007.

BIOETANOL DA CANA-DE-AÇÚCAR - Energia para o Desenvolvimento sustentável, 2008, disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2009.

BNDES - CONSOLIDAÇÃO NO SETOR DE ETANOL. 2010. Disponível em:<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Sala_de_Imprensa/Comunicados/2010/20100219_ETHBrenco.html>. Acesso em 15 de março de 2010

BRIENZO, M. **Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de pentoses e xilooligossacarídeos**, Exame de qualificação (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**. v. 32 I. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84, 2000.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry**. v. 5-9, 2008.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOU, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**. v. 38, p. 105-109, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento de safra. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em 23 de março de 2010.

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

COSTA, S.M., GONÇALVES, A.R., ESPOSITO, E. *Ceriporiopsis subvermispora* used in delignification of sugarcane bagasse prior to soda/anthraquinone pulping. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 04, p. 121-124, 2005.

DIEN, B.S. COTTA, M.A. JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Environmental Microbiology**. p. 258-266, 2003.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, M. E. T. **A queimada de cana e seu impacto sócio-ambiental**, 2007, Disponível em: <www.adital.com.br/SITE/noticia.asp?lang=PT&cod=26600>, acesso em: 24/02/2010.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**. v. 32, n.3, p. 623-638, 2009.

GALBE, M., ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**. p. 618-628, 2002.

GOLDSTEIN, I. S. **Organics Chemicals from Biomass**. Florida. Boca Raton, 1981, cap I p. 10-15.

GÓMEZ, R.J.H.C. **Sacarificação de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. UNICAMP, 1985.

GONÇALVES, A.R. **Fracionamento do bagaço e palha da cana visando aos novos desafios para obtenção de etanol**, 2008. Disponível em:<http://www.apta.sp.gov.br/cana/ver_work.php?work_id=59>. Acesso em 05 de agosto de 2009.

GONÇALVES, A.R.; RUZENE, D.S. Influence of pressure in ethanol/water pulping of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 105, p. 195-204, 2003.

GONÇALVES, A.R.; MORIYA, R.Y.; OLIVEIRA, L.R.; SAAD, M.B. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 43, n. 2, p. 157-163, 2008.

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

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

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 933-942, 1994.

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

HELDT, H.W. **Plant biochemistry and Molecular Biology**. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier, 2005.

HOLTZAPPLE, M.T.; JUN, J-H.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S.L.; DALE, B.E.; Ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatment of lignocellulosic wastes. In: AMERICAN INSTITUTE OF CHEMICAL ENGINEERS NATIONAL MEETING. Chicago, 1990.

HOLTZAPPLE M.T., JUN, J-H.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S.L.; DALE, B.E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: A practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 28-29, i. 1, p. 59-74, 1991.

HU, T.Q. **Chemical modification, properties, and usage of lignin**. New York. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.

ICIDCA-GEPLACEA-PNUD. **Manual de los derivados de la caña de azúcar**. 2. ed. México, 1990.

LABAT, G.A.A.; GONÇALVES, A.R. Oxidation in Acidic Medium of Lignins from Agricultural Residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. p. 151-161, 2008.

MACHADO G.O. **Preparação e caracterização de CMC e CMC Grafítizada**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, 2000.

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

MARTÍN C.; GONZÁLEZ Y.; FERNÁNDEZ T.; THOMSEN A.B.; Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 81, n. 10, p. 1669 – 1677, 2006.

MARTÍN C.; KLINKE H.B.; THOMSEN A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, n. 3-5, p. 426-432, 2007.

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

MENEGUETTI, N.A. **A reestruturação produtiva do setor sucroalcooleiro no Brasil de 1975 a 1999**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, 1999.

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

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

MORFOLOGIA DO CULTIVO – A FOLHA – SUGARCANECROPS, 2010. Disponível em: <http://sugarcanecrops.com/p/growth_morphology/the_leaf/>. Acesso em 25 de fevereiro de 2010.

MORIYA, R.Y. **Uso de xilanases e lacases de microrganismos no branqueamento de polpas organosolv de palha de cana-de-açúcar e estudo dos derivados celulósicos obtidos.** 2007. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C.; ROBERTO, I.C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology.** v. 79, n. 6, p. 590-596, 2004.

NEGRÃO, L.C.P.; URBAN M.L.P. Álcool como “commodity” internacional. **Economia & Energia.** v. 47, p. 8, 2005.

OLIVEIRA, F.M.V. **Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol.** 2007. 49 p. Monografia apresentada no curso de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco. Recife, 2007.

OLIVEIRA, L.R.M. **Estudo de alternativas viáveis de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose.** Relatório FAPESP, 2008.

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

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

PERLACK, R.D.; WRIGHT, L.L.; TURHOLLOW, A.F.; GRAHAM, R.L.; STOKES, B.J.; ERBACH, D.C. **Biomass as feedstock for bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a Biollion-Ton Annual Supply.** Oak Ridge National Laboratory. Oak Ridge/TN, 2005.

PITARELO, A.P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar à Bioconversão Via Pré-Tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática.** Dissertação (Mestre em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

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

PROTEFER - SAFRA DE CANA 2010/2011 DEVE CRESCER 20% NO PARANÁ. 2010, disponível em: <<http://www.protefer.com/noticias.php?ver=2125>>. Acesso em 22 de fevereiro de 2010.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHCHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B.; ROCHA, G. J.; RODRIGUES, D.; FILHO, H. J.; FELIPE, M.G.; PESSOA, A., Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**. v. 101, n. 4, 1247-1253, 2010.

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.

SAAD, M.B.; OLIVEIRA, L.R.; 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, p. 220-225, 2008.

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

SALIBA, E.O.; RODRIGUEZ, N.M.; MORAIS, S.A.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**. v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

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

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

SANTIAGO, A.D.; IVO, W.M.P.; BARBOSA, G.V.S.; ROSSETO, R. Impulsionando a produtividade e a produção agrícola da cana-de-açúcar no Brasil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON TROPICAL AGRICULTURE DEVELOPMENT. Julho, 2006.

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

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. 2005. Master of Science - Department of Chemical Engineering, Lund University. Sweden, 2005.

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

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SIMÕES A.J.F. **Petróleo, gás natural e biocombustíveis: desafio estratégico no mundo e no Brasil, O Brasil no mundo que vem aí**. In: I CONFERÊNCIA NACIONAL DE POLÍTICA EXTERNA E POLÍTICA INTERNACIONAL. 6 e 7 de julho de 2006. Rio de Janeiro. – Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, p. 144, 2007.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**. v. 2, p. 472-499, 2007.

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

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. DADOS E COTAÇÕES. 2010. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>, acesso em: 08/03/2010.

WYLEN, G.J.V; SONNTAG R.E. **Fundamentals of Classical Thermodynamics**. 3rd. ed. New York: John Wiley, 1985.