UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA - EEL

LUIS RICARDO MARTINS OLIVEIRA

**Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do
bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de
etanol a partir de celulose**

Lorena - SP

2012

LUIS RICARDO MARTINS OLIVEIRA

Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do
bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a
partir de celulose

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

Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto
Gonçalves

Lorena - SP

2012

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em
Engenharia de Materiais
USP/EEL

Oliveira, Luis Ricardo Martins

Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose/ Luís Ricardo Martins Oliveira; Orientador Adilson Roberto Gonçalves. - Lorena, 2012.

109f.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo.

1. Bagaço e Palha de Cana 2. Pré-tratamento 3. Deslignificação 4. Hidrólise Enzimática 5. Etanol Celulósico
I. Título.

CDU 662.754

*Dedico essa tese de doutorado à
minha esposa Thaís, minha mãe
Floripes e irmãs Cássia e Elaine, pelo
amor, carinho e apoio concebido a
mim para conclusão desse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe Floripes, às minhas irmãs Cássia e Elaine por todo carinho, apoio e incentivo que me deram ao longo desses anos.

À minha esposa por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo desse trabalho.

Aos Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves e George Jackson de Moraes Rocha pela orientação, aprendizado, paciência e principalmente pela grande amizade nestes últimos oito anos. Obrigado professores.

Aos professores Dr. André Ferraz e Dra. Adriane Milagres pela disponibilidade de seus laboratórios e pelos ensinamentos da área enzimática e química de lignocelulósicos.

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

À Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Biotecnologia da EEL – USP por colocar à disposição a área experimental e o laboratório e tornar possível a realização deste trabalho.

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

Às Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário, pela disponibilidade de realização do pré-tratamento por explosão a vapor em escala industrial.

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

Aos amigos do Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem Matemática e Simulação por todos os bons momentos que passamos juntos.

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

"O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contacto com o desconhecido."

Blaise Pascal

RESUMO

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

Após as crises de petróleo ocorridas no século passado, vários países buscaram o desenvolvimento de novos combustíveis a fim de reduzir a dependência deste recurso natural. O Brasil foi um deles e criou o Programa Nacional do Alcool (Pró-Alcool) para incentivar a produção de etanol. Hoje, mais de 80% da frota nacional de veículos rodam ou somente com etanol ou com a mistura de gasolina e etanol. Para atender a crescente demanda de etanol, sem competir com áreas cultiváveis voltadas para produção de alimentos, fontes de materiais lignocelulósicos podem ser utilizadas com o intuito de se aproveitar a fração celulósica para obtenção de açúcar fermentável. Neste trabalho propôs-se avaliar o efeito de tecnologias de pré-tratamento dos subprodutos sucroalcooleiros (bagaço e palha de cana), seguida ou não de uma etapa de deslignificação, sobre a conversão enzimática da celulose de cada biomassa vegetal. Os materiais lignocelulósicos foram pré-tratados por explosão a vapor (bagaço), impregnação a vapor (palha) e por ultrassom (bagaço e palha). A etapa de pré-tratamento por explosão a vapor foi realizada no reator industrial de 5 m³ sob a condição de 200°C por 7min, das Usinas de Açúcar, Alcool e Biodiesel Vale do Rosário. A etapa de pré-tratamento por impregnação de vapor foi realizada em reator de 20 L sob as condições de 180, 185, 190, 195 °C por 10 min e 190°C por 15 min. Já a etapa de pré-tratamento por ultrassom foi realizada em banho de ultrassom a 55°C por 40 min e radiação de 40 kHz/120W. Os materiais pré-tratados foram deslignificados sob a condição de NaOH 1% (m/v), 100°C por 1h, variando somente o tamanho reator em função da quantidade de biomassa disponível. Para o bagaço explodido a vapor, a deslignificação organosolv também foi testada, variando as condições numa matriz de planejamento L18 de Taguchi. Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados empregando Celluclast 1.5L (15 FPU/g de amostra) e β -Glucosidase (10 UI/g de amostra). Das três técnicas de pré-tratamento avaliadas (explosão a vapor, impregnação a vapor e ultrassom), somente os métodos baseados em vapor foram eficientes na desagregação dos constituintes dos subprodutos sucroalcooleiros. Esses métodos foram capazes de remover grande parte da hemicelulose (acima de 70%) e uma parte da lignina (<40%), elevando a digestibilidade da celulose pelas enzimas celulolíticas (conversão de 66 a 68%). O método de pré-tratamento com ultrassom provocou o aumento da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos tanto para o agente deslignificante (soda cáustica) como para as celulasas, sendo, portanto, um método não indicado, dentro da faixa das condições avaliadas, para um processo de conversão dos subprodutos sucroalcooleiros em açúcares fermentáveis. A etapa de deslignificação com soda cáustica foi essencial para elevar a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por explosão a vapor ou com ultrassom. Entretanto, para a palha pré-tratada hidrotermicamente, a etapa de extração alcalina não promoveu um efeito positivo sobre a conversão enzimática de celulose. De forma geral, observou-se que o bagaço de cana apresenta um potencial ligeiramente maior para conversão em açúcares fermentáveis em comparação com a palha de cana.

Palavras-chave: Bagaço e Palha de Cana. Pré-tratamento. Deslignificação. Hidrólise Enzimática. Etanol Celulósico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L.R.M. **Alternatives study of pretreatment and hydrolysis of sugar cane bagasse and straw for cellulosic ethanol**. 2012. 109 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

After the oil crises occurred in the last century, many countries have been to develop new fuels to reduce dependence on this natural resource. Brazil was one of them and created the National Alcohol Program (Pro-álcool) to promote the production of ethanol. Today, more than 80% of the national vehicles run on ethanol or with a mixture of gasoline and ethanol. To supply the growing demand for ethanol, without it to affect the food production farmland, sources of lignocellulosic materials can be used in order to take advantage of the cellulosic fraction for production of fermentable sugar. This work had objective to evaluate the effect of pretreatment technologies of sugarcane byproducts (bagasse and straw), followed or not by a stage of delignification, on the cellulose enzymatic conversion of each biomass. The lignocellulosic materials were pretreated by steam explosion (bagasse), vapor impregnation (straw) and ultrasound (bagasse and straw). The steam explosion pretreatment was carried out in 5 m³ industrial reactor under the condition of 200 °C for 7 min, from Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário. The steam impregnation pretreatment was carried out in 20 L reactor under conditions of 180, 185, 190, 195 °C for 10 min and 190 °C for 15 min. The ultrasound pretreatment was performed in the ultrasonic bath at 55 °C for 40 min and 40 kHz/120W radiation. The pretreated materials were deslignified on condition of 1% (w/v) NaOH, 100 °C for 1 h, using different sizes of reactors due to amount of biomass available. For the steam exploded bagasse, one stage of organosolv delignification was also tested varying the conditions in a L₁₈ Taguchi matrix. The enzymatic hydrolysis tests were performed using Celluclast 1.5L (15 FPU/g of material) and β -Glucosidase (10 IU/g of material). From three pretreatment techniques evaluated (steam explosion, steam impregnation and ultrasonic), only the vapor-based methods were efficient in the breakdown of the constituents of sugarcane byproducts. These methods were able to remove most of the hemicellulose (above 70%) and a part of the lignin (<40%), increasing the cellulose digestibility by cellulolytic enzymes (conversion 66-68%). The ultrasound pretreatment increases the recalcitrance of lignocellulosic materials both for the caustic soda and for cellulases. Therefore, this pretreatment method is not indicated, within the conditions range assessed, for a conversion process of sugarcane byproducts to fermentable sugars. The delignification stage with caustic soda was essential to increase the digestibility of lignocellulosic materials pretreated by steam explosion or ultrasound. However, for the straw pretreated hydrothermally, the alkaline extraction did not cause a positive effect on the enzymatic conversion of cellulose. Overall, it was observed that sugarcane bagasse has a slightly higher potential for conversion to fermentable sugars in relation to sugarcane straw.

Keywords: Sugarcane Bagasse and Straw. Pretreatment. Delignification. Enzymatic Hydrolysis. Cellulosic Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa do custo total do palhiço recolhido nos vários sistemas, em três distâncias (15, 50 e 100 km) (MICHELAZZO, 2005).....	9
Figura 2 - Arranjo tridimensional da estrutura de lignocelulósico. As células das plantas são formadas pelas fibrilas, as quais são constituídas pelas microfibrilas de celulose (adaptado de http://genomics.energy.gov/gallery/gtl/detail.np/detail-36.html).....	11
Figura 3 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranosurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).....	12
Figura 4 - Unidades fenilpropano precursoras da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).....	13
Figura 5 - Modelo da estrutura da parede celular de traqueídeos de madeira mole e de fibras libriformes de madeira dura. ML = lamela média, P = parede primária, S1 = parede secundária 1, S2 = parede secundária 2, T = parede terciária e W = camada de verrugas (FENGEL; WEGENER, 1989).	14
Figura 6 - Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos, destacando a desagregação que ocorre sobre a estrutura da biomassa (adaptado de MOSIER et al., 2005).....	18
Figura 7 - Ilustração esquemática dos processos de produção de etanol a partir de biomassa vegetal. SHF (hidrólise e fermentação em etapas separadas), SSF (hidrólise e fermentação simultâneas). Adaptado de SENDELIUS (2005).	25
Figura 8 - Celulases em um sistema enzimático cooperativo na degradação de celulose. Cada tipo de enzima catalisa uma reação específica (figura extraída de WYMAN (1994)).	27
Figura 9 - Fluxograma de conversão de bagaço ou palha de cana em açúcares fermentáveis.	32
Figura 10 - Fotos dos reatores de explosão a vapor das Usinas de Açúcar, Alcool e Biodiesel Vale do Rosário. À esquerda, foto da parte inferior do reator e, à direita, parte superior.....	34
Figura 11 - Foto do reator rotatório modelo REGMED AU/E-20 do Departamento de Antibióticos da UFPE, em que foi realizado o pré-tratamento por impregnação a vapor da palha de cana-de-açúcar.....	35
Figura 12 - Rampa de aquecimento do ensaio de extração alcalina convencional do bagaço pré-tratado por explosão a vapor. As setas indicam o período em que a temperatura do reator permaneceu em 100°C e o momento em que o material foi adicionado no reator. Material adicionado ao reator em 120 min.	37
Figura 13 - Rampa de aquecimento do ensaio de extração alcalina convencional da palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15 min. As setas indicam o período em que a temperatura do reator permaneceu em 100°C.....	38
Figura 14 - Diagrama de Pareto dos parâmetros avaliados no planejamento com 95% de confiança. A: pH; B: Temperatura.	47

Figura 15 - Superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático da análise do planejamento experimental CCR da Celluclast 1.5L.	49
Figura 16 - Projeção da superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático na análise do planejamento experimental CCR para a atividade enzimática da Celluclast 1.5L (FPU/mL).	49
Figura 17 - Foto do bagaço in natura (A) e do explodido a vapor (B).	50
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 vezes, para o bagaço in natura (imagem superior), do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (imagem central) e da polpa de bagaço pré-tratado e deslignificado por extração alcalina convencional (imagem inferior).	54
Figura 19 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A porcentagem de deslignificação foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	58
Figura 20 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A recuperação de etanol foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	60
Figura 21 - Gráfico da porcentagem de conversão de celulose em função do teor de lignina da polpa obtida após a deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão.	62
Figura 22 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A conversão enzimática da celulose foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	63
Figura 23 - Rampa de aquecimento do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana. Condições: 190°C/15 min.	68
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 e 300 vezes, para a palha in natura (imagem superior), da palha pré-tratada hidrotermicamente (imagem central) e da polpa de palha pré-tratada e deslignificada por extração alcalina convencional (imagem inferior).	69
Figura 25 - Rampa de aquecimento e resfriamento para os pré-tratamentos hidrotérmicos da palha de cana-de-açúcar.	73
Figura 26 - Simulação do modelo de degradação da lignina (mecanismo F) devido ao pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor (SAAD, 2010).	73
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura de uma fibra de celulose da palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15min. Resolução de 300 vezes.	77
Figura 28 - Efeito da severidade (Log Ro) do pré-tratamento hidrotérmico na conversão enzimática da celulose de palha de cana.	79
Figura 29 - Gráfico da porcentagem de conversão de celulose em função do teor de lignina presente nas palhas pré-tratadas	

	hidrotermicamente e das suas respectivas polpas obtida após a deslignificação.	82
Figura 30 -	Fotos do bagaço in natura moído 20 mesh (A), bagaço pré-tratado por ultra-som (B), palha in natura moída 20 mesh (C) e palha pré- tratada por ultra-som (D).	83
Figura 31 -	Cromatogramas dos licores de pré-tratamento por ultrassom do bagaço de cana (à esquerda) e da palha de cana (à direita).	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de várias espécies de planta (em %).	10
Tabela 2 - Diversos tipos de métodos de pré-tratamento para biomassa vegetal. Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2007a).	19
Tabela 3 - Comparação entre as hidrólises com ácido diluído e enzimática. Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2007a).	25
Tabela 4 - Matriz L18 de Taguchi usada na deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor.	39
Tabela 5 - Fatores codificados para a matriz CCR.	41
Tabela 6 - Matriz de Planejamento CCR para dois fatores.	42
Tabela 7 - Matriz de Planejamento CCR para os dois fatores (pH e temperatura) e variável resposta (atividade enzimática).	46
Tabela 8 - Análise de Variância para a atividade total de Celluclast 1.5L.	48
Tabela 9 - Composição química (em porcentagem) do bagaço in natura, da pré- tratado por explosão a vapor e da polpa de bagaço pré-tratado.	51
Tabela 10 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e da polpa obtidas após extração alcalina.	52
Tabela 11 - Dados do teste de conversão enzimática do bagaço in natura, pré- tratado por explosão a vapor e da polpa de bagaço pré-tratado após a extração alcalina convencional.	55
Tabela 12 - Matriz de Taguchi L18 usada no planejamento experimental da deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de etanol e NaOH, temperatura, tempo e relação sólido:líquido são os fatores avaliados. A porcentagem de deslignificação e a conversão enzimática de celulose são as variáveis de resposta.	57
Tabela 13 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A porcentagem de deslignificação foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	59
Tabela 14 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A recuperação de etanol foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	61
Tabela 15 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A conversão enzimática da celulose foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.	64
Tabela 16 - Dados das variáveis de respostas do ensaio de deslignificação organosolv na condição mais adequada sugerida pela análise dos dados do planejamento [etanol 60% (v/v), temperatura 130°C, tempo de 30 min, NaOH 1% (m/v) e relação sólido:líquido 1:7,5 (m:v)].....	65
Tabela 17 - Composição química (em porcentagem) da palha in natura, da pré- tratada hidrotermicamente a 190°C/15 min e da polpa de palha pré- tratada.	66

Tabela 18 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente a 190°C/15 min e das polpas obtidas após extração alcalina.	67
Tabela 19 - Composição química (em porcentagem) da palha in natura e pré-tratada hidrotérmicamente em diversas condições de pré-tratamento. ..	70
Tabela 20 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente considerando somente o rendimento mássico da etapa.	71
Tabela 21 - Composição química (em porcentagem) da palha in natura e pré-tratada hidrotérmicamente em diversas condições de pré-tratamento. ..	74
Tabela 22 - Perda/Solubilização (em porcentagem) dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente (t = 0 min) considerando somente o rendimento mássico da etapa.	75
Tabela 23 - Composição química (em porcentagem) das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente em diversas condições. Deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h.....	76
Tabela 24 - Perdas/Solubilizações dos componentes macromoleculares das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente em diversas condições, considerando somente o rendimento da etapa de deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h. Valores em parênteses representam as perdas/Solubilizações totais associadas ao pré-tratamento hidrotérmico e à etapa de deslignificação.	78
Tabela 25 - Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas hidrotérmicamente e das respectivas polpas obtidas.	81
Tabela 26 - Composição química (em porcentagem) da palha e bagaço pré-tratados por ultrassom. As duas últimas colunas da direita correspondem às perdas/solubilizações de cada componente macromolecular para a etapa de pré-tratamento por ultrassom.	84
Tabela 27 - Perda/Solubilização de componente na etapa de pré-tratamento por ultrassom para o bagaço e palha de cana.....	86
Tabela 28 - Composição química (em porcentagem) das polpas de palha e bagaço pré-tratados por ultrassom. Também estão expostas as composições químicas das polpas de bagaço e palha in natura (ensaio branco).....	88
Tabela 29- Perdas/Solubilização dos componentes macromoleculares das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas por ultrassom, considerando somente o rendimento da etapa de deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h.	89
Tabela 30 - Sacarificação enzimática da celulose do bagaço e palha pré-tratados por ultrassom e das respectivas polpas obtidas.....	91
Tabela 31 - Conversão total de celulose para os diversos processos avaliados nesse relatório. Condição de sacarificação enzimática: relação sólido:líquido 1:10, carga de enzima de 15 FPU/g de material lignocelulósico (Celluclast 1.5L) e 10 UI/g de material lignocelulósico (Novozym 188), pH 4,8 a 45°C por 72h.....	94

LISTA DE SIGLAS

AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ANOVA	Análise de Variância
CCR	Matriz Composta Central Rotacional
CETESB	Companhia Ambiental Do Estado Do São Paulo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioetanol
FPU	Filter Paper Unit. Atividade enzimática utilizada para celulasas. Uma unidade de FPU é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor de papel de filtro por minuto.
HMF	5-Hidroximetilfurfural
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PTUS	Pré-Tratamento por Ultrassom
SHF	Hidrólise e Fermentação em Etapas Separadas
SIMBIO	Simpósio da Biodiversidade
SIMTEC	Simpósio Internacional e Mostra de Tecnologia da Agroindústria Sucroalcooleira
SSF	Hidrólise e Fermentação Simultâneas
UI	Unidade Internacional de Atividade Enzimática. Uma UI é a quantidade de enzima que catalisa a reação de 1 μmol de substrato por minuto.
UIPAC	União Internacional de Química Pura e Analítica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Crise Energética	5
2.2 Palha e Bagaço de Cana	7
2.3 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos	9
2.3.1 Celulose	10
2.3.2 Hemicelulose.....	11
2.3.3 Lignina	12
2.3.4 Outros Compostos	13
2.3.5 Estrutura Morfológica	13
2.4 Produção de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos	14
2.5 Projeto Bioetanol FINEP (Convênio – Chamada Pública 4183/05).....	16
2.6 Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos	17
2.7 Explosão a Vapor	20
2.9 Hidrólise de Lignocelulósicos	24
2.9.1 Hidrólise Ácida.....	26
2.9.2 Hidrólise Enzimática	27
2.10 Remoção de lignina.....	29
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODO	32
4.1 Fluxograma do Projeto	32
4.2 Materiais Lignocelulósicos.....	32
4.3 Métodos de Pré-tratamento	33
4.3.1 Explosão a Vapor	33
4.3.2 Hidrotérmico	34
4.3.3 Ultrassom	36
4.4 Deslignificação dos materiais lignocelulósicos.....	36
4.4.1 Extração alcalina convencional	36
4.4.2 Deslignificação alcoólica alcalina	38
4.5 Hidrólise Enzimática.....	40
4.6 Determinação das condições ótimas da enzima Celluclast 1.5L.....	41
4.7 Análise de Composição Química do Material Lignocelulósico	42
4.7.1 Caracterização do material lignocelulósico.....	42
4.7.2 Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos por CLAE	43
4.7.3 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido (Lignina Klason)	43
4.7.4 Determinação do Teor de Cinzas (Lignina Klason)	43
4.7.5 Determinação da Lignina Solúvel	43
4.7.6 Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural.....	44

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.9 Grau de Cristalinidade por Difração de Raio-X	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Determinação das condições ótima para a enzima Celluclast 1.5L.....	46
5.2 Dados dos ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor	50
5.2.1 Pré-tratamento por explosão a vapor	50
5.2.2 Deslignificação por extração alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas	53
5.2.3 Deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas.....	56
5.3 Dados dos experimentos realizados com palha de cana pré-tratada hidrotermicamente.....	66
5.3.1 Pré-tratamento Hidrotérmico.....	66
5.3.2 Deslignificação por extração alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas	76
5.3.3 Digestibilidade Enzimática das palhas pré-tratadas hidrotermicamente	79
5.4 Dados dos experimentos realizados com bagaço e palha de cana pré-tratados com ultrassom	83
5.4.1 Pré-tratamento com Ultrassom.....	83
5.4.2 Deslignificação por Extração alcalina do Bagaço e Palha Pré-tratados por Ultrassom	87
5.4.3 Digestibilidade de Bagaço e Palha Pré-tratados por Ultrassom	90
5.5 Eficiência da conversão de celulose a glicose entre os materiais lignocelulósicos	91
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE A	108

1 INTRODUÇÃO

Uma das primeiras utilizações da biomassa pelo homem para obtenção de energia se iniciou com a utilização do fogo para cozimento e iluminação. O domínio do fogo permitiu ao homem a exploração dos metais, marcando novo período antropológico. A madeira foi, por muito tempo, a principal fonte energética para a cocção, siderurgia e cerâmica. Óleos vegetais e animais também eram usados em menor escala. O grande salto no consumo da biomassa se deu com a lenha na siderurgia, no período da Revolução Industrial.

Nas crises de abastecimento de petróleo, a importância da biomassa se evidenciou pela utilização de seus derivados como álcool, gás de madeira, biogás e óleos vegetais nos motores de combustão. Atualmente, os recursos de biomassa são extremamente promissores, uma vez que são generalizadas, baratas e disponíveis na maioria dos países. A biomassa já constitui cerca de 10% da demanda mundial de energia primária, e é usada principalmente em aplicações ineficientes e tradicionais nos países em desenvolvimento **(FAO GBEP, 2007; U.S. Energy Information Administration, 2009)**. Dada a variedade de aplicações para as fontes de biomassa, é extremamente importante selecionar as opções mais promissoras visando perspectivas ambientais e econômicas. Eletricidade e calor podem ser fornecidos por várias fontes alternativas renováveis (vento, sol, água, biomassa, e assim por diante), enquanto biomassa é muito provável que seja a única alternativa viável aos recursos fósseis para a produção de combustíveis para o setor de transporte e de produtos químicos. Hoje, mais de 90% do carbono fóssil é usado apenas pelo seu conteúdo energético **(MARQUARDT et al., 2010)**. Este padrão não será provável de ser seguido no futuro para a biomassa, devido à menor eficiência da conversão de biomassa em energia e as menores densidades energéticas da biomassa em relação aos recursos fósseis. Em função dessas considerações, alguns autores convincentemente argumentaram que a eletricidade deve ser produzida por uma parte crescente de fontes renováveis, enquanto o uso de biomassa será restrito à produção de biocombustíveis e produtos químicos **(AGRAWAL; SINGH, 2010; MARQUARDT et al., 2010)**.

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas, sendo a área cultivada com cana-de-açúcar correspondente a 8,43 milhões de ha **(COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011)**. Ao produzir álcool e açúcar, o processamento da cana gera vários subprodutos, como a palha, o bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuais. Estima-se que para cada tonelada de cana colhida geram-se 140 kg de bagaço e também 140 kg de palhas **(LABAT; GONÇALVES, 2008; SAAD et al., 2008)**.

A safra de cana-de-açúcar do Brasil de 2010/2011 foi de 623,9 milhões de toneladas, segundo estimativas do Governo Federal (**COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011**). No estado de São Paulo, maior produtor do país, 65% da área plantada de cana-de-açúcar é colhida mecanicamente (**AGRO, 2011**). E a presença das colheitadeiras nos canaviais tende a se tornar mais forte nos próximos anos, até porque, pelo menos em São Paulo, a legislação ambiental definiu um cronograma para que, em médio prazo, a queima antes da colheita seja uma prática completamente abolida.

Além disso, o total de bagaço gerado no processamento da cana para este ano está estimado em aproximadamente 87 milhões de toneladas. A grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte de energia dentro da própria usina que, atualmente, já se tornaram auto-suficientes em geração de vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço. Com uma eficiência de 80 a 85% na combustão, um excedente da ordem de 10% tem sido gerado em usinas que utilizam caldeiras de baixa pressão e um excedente de 30% que pode chegar a 50% em usinas com caldeiras mais modernas de alta pressão (maior que 20 atmosferas), segundo **Gonçalves** (informação pessoal)¹. Assim, para as usinas que não contém cogeração de energia, e são minorias atualmente, um grande volume de bagaço seria acumulado nos pátios das usinas, gerando problemas como a disposição do material e o risco de incêndio. De fato, a maior parte desse excedente é transformada em eletricidade por cogeração (bioeletricidade) ou em complementos de ração animal.

Dessa forma, a palha e o bagaço de cana têm sido considerados os principais subprodutos gerados no setor sucroalcooleiro. E o que fazer com esses subprodutos vem sendo objeto de muitos estudos e experiências em um setor que, nos últimos anos, destacou-se pela capacidade de transformar restos em produtos valorizados, como a energia elétrica (**FURTADO; SCANDIFFIO; CORTEZ, 2010; MUAÉS, 2007**). Vários aspectos se verificam para a transformação desses materiais lignocelulósicos em álcool, aumentando a produção de etanol em até 30% com a mesma área agrícola utilizada para a cultura da cana, isso considerando apenas o que é hoje usado para queimar nas caldeiras. O rendimento teórico se todos os polissacarídeos fossem convertidos em etanol, chegaria a 100% a mais, ou seja, dobraria a produção de etanol com a mesma área plantada, considerando o uso de todo o bagaço gerado no setor sucro-alcooleiro.

¹ Gonçalves A. R. Mensagem recebida por adilson@debiq.eel.usp.br em 23 de maio de 2011.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Crise Energética

Após as crises de petróleo nos anos 70, o mundo se empenhou em encontrar uma solução duradoura para o seu problema energético. E associado ao rápido crescimento populacional mundial e aos inúmeros países que se industrializaram no último século, o consumo de energia vem aumentando constantemente, na ordem de 1,6% por ano (**GHATAK, 2011**). O consumo de energia esperado para 2030 é 700 EJ/ano, com mais de 80% da produção da energia primária mundial ainda proveniente da combustão de matérias-primas fósseis, principalmente o petróleo. **Nashawi et al. (2010)** estimaram que a produção mundial de petróleo alcançará o seu pico máximo em 2015 e que se declinará em 70% por volta do ano de 2050. Além disso, as reservas mundiais de petróleo irão acabar em menos de 100 anos.

Devido à economia de diversos países ser substancialmente dependente do petróleo, as consequências de uma inadequada disponibilidade desse combustível seriam drásticas, podendo ocasionar outras crises de petróleo como as anteriores. Portanto, existe um grande interesse em explorar outras fontes alternativas de energia (**CHENG; QIU, 2010; NIGAM; SINGH, 2011; RABELO et al., 2011; SAIDUR et al., 2011; SINGH; SMYTH; MURPHY, 2010**).

Entre as diversas fontes de energias renováveis, a biomassa é vista como a mais interessante por várias razões. A principal delas é que a bioenergia pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região que a utiliza, além de os recursos estarem frequentemente disponíveis no próprio local e o investimento de capital para a conversão em energia ser baixo (**PANDEY et al., 2011**). Além do mais, a energia proveniente de biomassa pode desempenhar uma função importante na redução das emissões de gases do efeito estufa, já que a biomassa é formada a partir de CO₂ e H₂O, aproveitando a energia solar. Assim, o Brasil reduziria ainda mais as emissões de dióxido de carbono, resultando em muitas vantagens em relação ao Protocolo de Kyoto.

Segundo estimativa de **Murphy et al. (2011)**, os biocombustíveis terão quatro fases de desenvolvimento. Na primeira fase, de curto prazo (até 2020), as pesquisas estarão direcionadas no melhoramento das tecnologias já existentes para etanol e biodiesel (1ª geração), além do desenvolvimento dos biocombustíveis de 2ª geração (proveniente de materiais lignocelulósicos) e a construção das primeiras plantas de demonstração dos biocombustíveis dessa geração. Entre 2020 e 2030, surgiram as primeiras unidades industriais que conterão tanto processos para

combustíveis de 1ª como para os de 2ª geração, além do desenvolvimento de biorefinarias a partir de resíduos florestais. Para o período entre 2030 a 2040, os combustíveis de 2ª geração serão os predominantes e haverá o início de desenvolvimento dos combustíveis de 3ª geração (produzidos a partir de microrganismos, ex. algas). Ainda nesse período, as matérias-primas utilizadas para a geração dos combustíveis de 1ª geração passarão a ser destinadas apenas para o uso alimentar. Por fim, entre 2040 a 2050, os biocombustíveis de 2ª e 3ª geração serão os predominantes e amplamente utilizados em todos os setores do transporte (rodoviário, aéreo e marítimo).

Para um país tropical como o Brasil, os substitutos naturais do petróleo serão os biocombustíveis, principalmente o etanol. Desde a criação do Pró-Álcool (Programa Nacional do Álcool) na década de 1970 o Brasil vem demonstrando a viabilidade de substituir os derivados do petróleo por biocombustíveis. Hoje, mais de 80% da frota nacional de veículos rodam ou somente com bioetanol ou com a mistura de gasolina e etanol. Também já estão sendo desenvolvidos motores para aeronaves movidas por etanol **(SOCCOL et al., 2010)**. Além de combustível, o etanol também pode ser utilizado na preparação de diversos compostos petroquímicos (etileno, propileno, buteno e butadieno) através de reações de síntese orgânica **(PANDEY et al., 2011; SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001)**. O plástico verde, produto desenvolvido pelos pesquisadores do Centro de Inovação e Tecnologia da Braskem **(BRASKEM, 2011)**, já é um exemplo valioso da possibilidade de substituir derivados do petróleo a partir de matérias-primas renováveis. Atualmente a empresa comercializa eteno gerado a partir de etanol da cana-de-açúcar.

Com a política de biocombustíveis, o Brasil vem se preparando para as futuras crises de petróleo, mas alguns desafios ainda precisam ser solucionados. Um deles seria desenvolver políticas e tecnologias para elevar a produção nacional de etanol sem competir com as áreas agricultáveis destinadas aos alimentos e sem provocar impacto ao desmatamento de florestas nativas do Brasil. Nesse sentido, o Governo Federal tem criado o projeto de Lei (PL 6.077/2009) que trata sobre o Zoneamento Agroecológico da Cana-de-açúcar – ZAE visando a expansão e produção sustentável de cana-de-açúcar no território brasileiro. Esse projeto limita a construção de novas unidades industriais ou a expansão da área cultivável em aproximadamente em 50% do território nacional, impedindo a expansão para áreas de cobertura vegetal nativa como Pantanal e Amazonas **(SOCCOL et al., 2010)**. Para o desenvolvimento de novas tecnologias para elevar a produção nacional de etanol o Governo Federal criou o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioetanol (CTBE). Este centro de tecnologia tem o objetivo de contribuir para o desenvolvimento do bioetanol de 2ª geração, biocombustível gerado a partir de resíduos lignocelulósicos.

2.2 Palha e Bagaço de Cana

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil logo após seu descobrimento. Ela cresce na maioria dos países tropicais e subtropicais e é usada principalmente para a obtenção de açúcar e álcool. Além disso, a cana-de-açúcar é uma excelente lavoura: tem crescimento rápido, é resistente e pode ser colhida duas vezes ao ano por cinco consecutivos anos **(SENDELIUS, 2005)**.

Para a safra de 2010/11, o Brasil colheu cerca de 623,9 milhões de toneladas de cana, produzindo 28 milhões de m³ de etanol e 39 milhões toneladas de açúcar **(COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011)**. Ao produzir álcool e açúcar, o processamento da cana gera vários resíduos agrícolas, como a palha, o bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuárias. Para cada tonelada de cana produzida são gerados 140 kg de bagaço **(LABAT; GONÇALVES, 2008; SAAD et al., 2008)** e a produção de bagaço para a safra de 2010/11 foi estimada em aproximadamente 87 milhões de toneladas.

A grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Atualmente, elas já são auto-suficientes em vapor e energia elétrica através da combustão do bagaço e algumas já até possuem termoelétricas acopladas, gerando energia adicional para as concessionárias elétricas da região. Com uma eficiência de 80 a 85% na combustão, um excedente da ordem de 10% tem sido gerado em usinas que utilizam caldeiras de baixa pressão e um excedente de 30% que pode chegar a 50% em usinas com caldeiras mais modernas de alta pressão (maior que 50 bar) **(GONÇALVES, 2011 – Informação pessoal²)**. Assim, um grande volume de bagaço é acumulado nos pátios das usinas, gerando vários problemas, como a disposição do material e o risco de incêndio.

Outro subproduto que vem anualmente aumentando no setor sucroalcooleiro é a palha de cana. Em 19 de setembro de 2002, o Estado de São Paulo criou a Lei nº 11.241, que dispõe a eliminação gradativa da queima da cana. Em 11 de março de 2003, ela foi regulamentada pelo decreto nº 47.700, que apresenta, em seu artigo 2º, a tabela de eliminação gradativa do atual processo de cultivo, o qual deverá ser totalmente substituído por colheita mecânica até 2031 **(ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011)**.

Essas leis foram criadas devido aos problemas gerados pela prática da queima da cana. Enquanto o uso de etanol tem levado a melhorias consideráveis da qualidade

² Gonçalves A. R. Mensagem recebida por adilson@debiq.eel.usp.br em 23 de maio de 2011.

de ar em centros urbanos, as queimadas de palha da cana no campo causam diversos problemas, entre eles a dispersão de particulados e riscos com a fumaça **(CORTEZ, 2010)**. Dados da CETESB de Araraquara comprovam que em 1998 a queima da palha da cana-de-açúcar produziu quatro vezes mais fuligem do que a emitida pelos veículos da Região Metropolitana de São Paulo **(ARBEX, 2001)**. Estima-se que no ano de 2004 foram jogadas na atmosfera cerca de 55 mil toneladas de material particulado, sendo que 94% correspondem às partículas finas e ultrafinas, capazes de provocar problemas pulmonares, como inflamações no sistema respiratório, crises de asma e enfisema pulmonar. A queima produz também SO_2 , responsável pela chuva ácida, e também ozônio que, em baixas altitudes, causa problemas respiratórios **(ADITAL, 2011)**.

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

Todavia, o aproveitamento do palhicho em larga escala é dificultado pelo alto custo de seu recolhimento, principalmente no que diz respeito ao recolhimento, adensamento e transporte. A literatura fornece estudos da avaliação técnica de algumas características envolvidas no recolhimento do palhicho, tais como massa específica final do palhicho e complexidade das máquinas envolvidas, juntamente com análises econômicas, por meio de modelos de cálculo de custo. De acordo com **Michelazzo (2005)** o sistema colheita integral apresenta o menor custo de recolhimento de palhicho, tanto para distâncias pequenas como para grandes distâncias. Em termos de custo, a colheita integral é seguida pelos sistemas: picado a granel, fardo cilíndrico, fardo algodoeiro, peletização e briquetagem (ver Figura 1).

Figura 1 - Estimativa do custo total do palhço recolhido nos vários sistemas, em três distâncias (15, 50 e 100 km) (**MICHELAZZO, 2005**).

Portanto, a disponibilidade de bagaço e de palha nas usinas de açúcar e álcool tem impulsionado vários grupos de pesquisa a desenvolver tecnologias que visem ao seu aproveitamento mais racional. Neste projeto, o objetivo é utilizar essas duas fontes de biomassa para a produção de etanol, visando aumentar a produtividade do setor em até 30%. Mas para um melhor entendimento dessa aplicação, é necessário um conhecimento mais detalhado sobre as características químicas desses materiais lignocelulósicos, as quais serão vistas a seguir.

2.3 Características Estruturais dos Materiais Lignocelulósicos

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira física ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e poucos reativos (recalcitrantes) (**AGBOR et al., 2011; FENGEL; WEGENER, 1989**).

Embora as espécies de plantas no mundo tenham morfologias diferentes, os materiais lignocelulósicos são principalmente constituídos de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina. A proporção de cada componente difere de planta para planta (Tabela 1). Outros compostos em menor quantidade correspondem aos extrativos, amido, proteínas, cinzas inorgânicas e ácidos graxos.

Tabela 1 - Composição de várias espécies de planta (em %).

	Celulose	Hemiceluloses				Lignina	Referência
		Manana	Xilana	Galactana	Arabinana		
Madeira dura							
Bétula ("Birchwood")	38,2	1,2	18,5	-	n.d.	22,8	[1]
Salgueiro	36,8	1,9	12,7	n.d.	1,2	20,7	[1]
Álamo ("Aspen")	43,2	0,2	15,1	-	-	16,7	[1]
Madeira Mole							
Pinheiro	37,7	7	4,6	-	-	27,5	[1]
Abeto ("Spruce")	41,9	14,3	6,1	-	1,2	27,1	[1]
Casca de Abeto	27,3	3,2	3,2	-	4,1	37,1	[1]
Gramínea							
Bagaço de cana	42,7	-	21	-	0,6	18,6	[1]
Palha de Trigo	36,5	0	18,4	-	2,2	17,6	[1]
Folhagem de Milho	36	-	19,8	1,3	2,8	17,8	[2]
[1] Hayn et al. (1993)				[2] Esteghlalian et al. (1997)			

2.3.1 Celulose

A celulose é um polímero linear de subunidades de glicose associadas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero (Figura 2). Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares (Figura 2). Essas estruturas são formadas devido à presença de ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de Van de Waals (**AGBOR et al., 2011; FENGEL; WEGENER, 1989**). As pontes de hidrogênio intramoleculares confere uma estrutura retilínea a cadeia de celulose enquanto, as pontes de hidrogênio intermoleculares, são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e amorfas (**AGBOR et al., 2011**).

Figura 2 - Arranjo tridimensional da estrutura de lignocelulósico. As células das plantas são formadas pelas fibrilas, as quais são constituídas pelas microfibrilas de celulose (adaptado de <http://genomics.energy.gov/gallery/gtl/detail.np/detail-36.html>).

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, diferem substancialmente da celulose por serem amorfas, com estrutura ramificada e composta pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxiexoses). Elas tem peso molecular menor comparado com a celulose e ramificações de cadeias laterais pequenas mais facilmente hidrolisáveis (**AGBOR et al., 2011**). As polioses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (**FENGEL; WEGENER, 1989**).

A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. As madeiras moles apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as madeiras duras e as gramíneas são mais ricas em xilanas. Xilanas podem ser extraídas facilmente em meios ácido ou básico enquanto a extração de glucomananas requer meios fortemente alcalinos (**AGBOR et al., 2011; FENGEL; WEGENER, 1989**).

A composição de xilana de gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles por **McDougall et al. (1993)**. Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (**McDOUGALL et al., 1993**).

Devido à combinação de diversos açúcares e por ser uma molécula amorfa, as hemiceluloses são mais solúveis em água e mais fáceis de ser degradada que a celulose e a lignina. Acreditam-se a hemicelulose dentro das paredes da célula vegetal funcione como um revestimento às fibrilas de celulose e tem sido proposto que pelo menos 50% da hemicelulose devem ser removidas para aumentar significativamente a digestibilidade da celulose (**AGBOR et al., 2011**).

2.3.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. A lignina confere rigidez, impermeabilidade, resistência aos ataques de microrganismos e à degradação oxidativa (**AGBOR et al., 2011**). A lignina é uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos alcoóis hidroxicinâmicos: p-cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III) (Figura 4). A lignina é constituída principalmente de unidades de fenilpropano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril (**FENGEL; WEGENER, 1989**).

Figura 4 - Unidades fenilpropano precursoras da lignina (**FENGEL; WEGENER, 1989**).

A lignina é geralmente aceita com uma cola que une os diferentes componentes lignocelulósicos, conferindo uma maior coesão entre eles e tornando o material lignocelulósico impermeável (**AGBOR et al., 2011; FENGEL; WEGENER, 1989**). Devido a essa proximidade da lignina com as microfibrilas de celulose, ela tem sido considerada a principal barreira física à hidrólise enzimática e/ou microbiana dos materiais lignocelulósicos. Apesar de a lignina ser considerada uma barreira física, ela também possui outros efeitos prejudiciais, entre eles: i) adsorção não-específica (irreversível) das enzimas hidrolíticas sobre as ligninas; ii) perturbação e adsorção não-produtiva das enzimas celulolíticas sobre os complexos lignina-carboidrato e iii) toxicidade dos derivados da lignina aos microrganismos (**AGBOR et al., 2011**).

2.3.4 Outros Compostos

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

2.3.5 Estrutura Morfológica

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

A celulose, polioses e lignina se organizam, na parede celular, formando diferentes camadas: parede primária (P), secundária (S) e terciária (T) (Figura 5). As

diferentes células encontram-se separadas pela lamela média (ML), que é uma camada fina que mantém as células coesas e é responsável pela integridade estrutural do tecido vegetal. A parede primária é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. Do lado de dentro da parede primária são formadas as paredes secundárias S_1 e S_2 . Nestas regiões as microfibrilas de celulose possuem distintas orientações em relação ao eixo longitudinal da célula. A parede mais espessa é a S_2 , na qual as microfibrilas de celulose estão orientadas de forma quase paralela ao eixo axial da célula. As fibrilas de celulose próximas ao lúmen da célula correspondem à camada terciária e estão orientadas quase perpendicularmente ao eixo da célula. A maior quantidade de lignina é encontrada na camada S_2 , porém na lamela média ela se encontra em maior concentração.

Figura 5 - Modelo da estrutura da parede celular de traqueídeos de madeira mole e de fibras libríformes de madeira dura. ML = lamela média, P = parede primária, S_1 = parede secundária 1, S_2 = parede secundária 2, T = parede terciária e W = camada de verrugas **(FENGEL; WEGENER, 1989)**.

2.4 Produção de Etanol a partir de Materiais Lignocelulósicos

O etanol pode ser produzido de diferentes matérias-primas, tais como os materiais ricos em açúcares (cana-de-açúcar ou beterraba), em amido (milho) e os lignocelulósicos (biomassa vegetal). Atualmente, grande parte da produção de etanol é proveniente da cana-de-açúcar (Brasil) e do milho (Estados Unidos), porém, em médio prazo será inviável atender a crescente demanda de etanol com as tecnologias correntes **(CHENG; TIMILSINA, 2011)**. Os materiais lignocelulósicos seriam a solução mais provável já que são abundantes em quase todo o planeta e podem ser usados como matéria-prima para produção de etanol. Mas, por outro lado, a obtenção de etanol a partir de material lignocelulósico não é tão simples como aquele gerado a partir de materiais ricos em açúcar ou amido. A conversão de material lignocelulósico envolve quatro etapas **(CHENG; TIMILSINA, 2011; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a)**:

1. Pré-tratamento
2. Hidrólise
3. Fermentação dos açúcares
4. Destilação

A etapa 1 ainda é considerada a crucial para desencadear a produção de etanol a partir de biomassa. Vários pesquisadores vêm estudando sobre esta etapa para diversos tipos de resíduos lignocelulósicos. Por exemplo, **Taniguchi et al. (2010) e Chen et al. (2011)** produziram etanol a partir de palha de arroz, **Han et al. (2010) e Ibrahim et al. (2011)** a partir de palha de trigo, **Diaz et al. (2011)** a partir de talos de girassol e, **Martín et al. (2002) e Silva et al. (2011)** a partir de bagaço de cana. Entretanto, o custo de alguns tipos de pré-tratamentos e a baixa densidade do material lignocelulósico ainda torna antieconômico a produção de etanol a partir da biomassa vegetal. Atualmente o custo de produção de etanol lignocelulósico ainda é muito maior que o da gasolina e, significativamente maior que o etanol de cana-de-açúcar ou de milho (**CHENG; TIMILSINA, 2011**).

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

1. Matérias-primas: os materiais lignocelulósicos podem ser geneticamente modificados para conterem um teor menor de lignina e maior de celulose. Menores conteúdos de lignina nos materiais lignocelulósicos podem reduzir substancialmente a severidade do pré-tratamento ou ainda até eliminar essa etapa.
2. Pré-tratamento: as tecnologias atuais de pré-tratamento empregam altas temperaturas e pressões, que resultam num elevado custo de processo (operação). Pré-tratamentos com baixa temperatura e custo estão sendo desenvolvidos como uma tecnologia mais promissora para produção de etanol de segunda geração.
3. Custo das enzimas: embora o custo das celulasas tem sido reduzido significativamente nas últimas décadas, ele ainda é considerado elevado em comparação com as amilases (enzimas utilizadas na produção de etanol a partir do milho). Microrganismos que tem elevada eficiência de geração de enzimas celulolíticas precisam ser mais explorados para viabilizar os processos de conversão enzimática de celulose.
4. Co-fermentação da glicose e xilose: a glicose é o principal produto da hidrólise enzimática da celulose, enquanto a xilose é o principal produto da hidrólise da hemicelulose. A fermentação de glicose a etanol é uma

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

2.5 Projeto Bioetanol FINEP (Convênio – Chamada Pública 4183/05)

Visando à produção de etanol da biomassa de cana-de-açúcar (bagaço e palha), o projeto estudou a tecnologia de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação dos hidrolisados contendo açúcares C_6 . Posteriormente, atendendo ao conceito de uso integral desta biomassa (conceito de Biorrefinaria), foram avaliadas condições de pré-tratamento que preservem os açúcares C_5 que têm uso potencial para a obtenção adicional de etanol e de outros produtos de interesse, como plásticos biodegradáveis. Também foi avaliada a hidrólise enzimática de biomassa, frente à hidrólise ácida, por ser mais eficiente e gerar um hidrolisado livre de inibidores do processo fermentativo (fenóis, furfural e hidroximetilfurfural), permitindo o uso das linhagens de levedura tradicionais da indústria do álcool. O custo das celulases e sua disponibilidade têm uma importância central neste processo. Como as celulases industriais são importadas e caras, este projeto proporcionou também, por razões de custo, o desenvolvimento de misturas celulolíticas desenhadas para a hidrólise da biomassa da cana e em consonância com o pré-tratamento a ser utilizado.

O desenvolvimento do projeto contou com uma rede nacional de 100 pesquisadores, incluindo 14 pesquisadores do CNPq, além de colaboradores estrangeiros. Os pesquisadores brasileiros estavam distribuídos entre 11 universidades, (UNICAMP – Campinas, USP – Lorena, USP – São Paulo, UFRJ – Rio de Janeiro, UENF – Campos, UEM – Maringá, UnB – Brasília, UCS – Caxias do Sul, FURB – Blumenau, UFPE – Recife e UFPB – João Pessoa), dois centros de pesquisa (IPT – São Paulo, INT – Rio de Janeiro), o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), que congrega cerca de cem usinas, o CENBIO – USP e a empresa TOYOBO do Brasil.

O projeto foi concluído em 2010, com relatórios finais em 2011. Contou-se com a coordenação do Prof. Rogério Cerqueira Leite e vice-coordenação da Prof^a Sílvia A. Nebra, ambos da UNICAMP. A coordenação científica, industrial e coordenações de área ficaram sob a responsabilidade da Prof^a Elba P. S. Bon (UFRJ), do Dr. Jaime

Finguerut (CTC), do Prof. Adilson R. Gonçalves (USP – Lorena) e da Profª Silvia A. Nebra (UNICAMP).

2.6 Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos sem nenhum pré-tratamento é extremamente lenta e resulta em rendimentos inferiores a 20% do valor teórico **(CARA et al., 2006; JIN E CHEN, 2006; LYND et al., 2002; MONIRUZZAMAN, 1996; SILVA et al., 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a)**. Os fatores que contribuem para a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos são **(AGBOR et al., 2011; MOSIER et al., 2005)**:

1. Cristalinidade e grau de polimerização da celulose;
2. Porosidade do material (área superficial acessível);
3. Proteção da celulose pela lignina;
4. Característica heterogênea das partículas de biomassa; e
5. Revestimento da celulose pelas hemiceluloses.

Essa variedade de fatores contribui para as diferentes digestibilidades/hidrólises de uma determinada biomassa lignocelulósica. A remoção de lignina aumenta a digestibilidade da biomassa até um ponto em que o efeito da presença de lignina não é mais suficiente para limitar a hidrólise enzimática do material **(AGBOR et al., 2011; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; DRAUDE; KURNIAWAN; DUFF, 2001; JEOH et al., 2007; SILVA et al., 2011)**. A celulose altamente cristalina é menos acessível ao ataque das celulasas do que a celulose amorfa e, que a sua acessibilidade pela celulase é um dos fatores mais importante na hidrólise enzimática quando o efeito da lignina é minimizado **(AGBOR et al., 2011; JEOH et al., 2007)**.

Em teoria, o processo de pré-tratamento ideal deverá proporcionar desagregação da estrutura do material lignocelulósico (Figura 6), fornecendo um substrato mais facilmente hidrolisável pelas enzimas celulolíticas, além de evitar a formação de produtos de degradação de açúcares e compostos inibidores aos microrganismos da fermentação, ter um custo operacional e de capital reduzido **(MOSIER et al., 2005; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a)**. Ele deverá ser efetivo para uma grande variedade de materiais lignocelulósicos e permitir obter frações dos componentes da biomassa que possam ser aproveitado, como, por exemplo, a geração de lignina de alto valor agregado, elevando a eficiência de utilização integral da biomassa. Além disso, o impacto do pré-tratamento no custo das etapas posteriores de recuperação de produto também deve levado em consideração **(AGBOR et al., 2011; MOSIER et al., 2005)**.

Figura 6 - Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos, destacando a desagregação que ocorre sobre a estrutura da biomassa (adaptado de **MOSIER et al., 2005**).

Muitos métodos de pré-tratamento têm sido estudados ou estão ainda em fase de desenvolvimento. É difícil avaliar e comparar as tecnologias de pré-tratamento devido aos diversos custos de pré- e pós-processamento, o capital de investimento, a recuperação dos reagentes químicos e os sistemas de tratamento dos resíduos (**JEON et al., 2007**). Entretanto, como parte integrante de um sistema industrial ou biorefinaria, uma análise de balanço de massa pode ser usada para validar a eficiência de um processo para uma dada matéria-prima (**AGBOR et al., 2011**).

Os tipos de pré-tratamento dependem do material utilizado e da finalidade proposta de utilização das frações lignocelulósicas, podendo ser físicos, físico-químicos, químicos e biológicos (Tabela 2). Dentre os pré-tratamentos físicos temos os baseados em moagem, irradiação, calor e vapor (**McMILLAN, 1994; WYMAN, 1996**). Pré-tratamentos como a explosão a vapor, explosão com amônia (AFEX), explosão com CO₂ ou SO₂ são exemplos de pré-tratamentos físico-químicos. Os pré-tratamentos químicos incluem a hidrólise com ácido diluído, por meio alcalino, a ozonólise, deslignificação oxidativa e os processos organosolv. O uso de fungos de podridão branca representa um tipo de pré-tratamento biológico. A maioria dos métodos de pré-tratamentos foi revisada por diversos autores, tais como **McMillan (1994), Wyman (1996), Sun e Cheng (2002), Mosier et al. (2005), Taherzadeh e Karimi (2007a); Balat (2008) e Sakar et al. (2012)**.

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

(TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). Dentre os tipos de pré-tratamento apresentados na Tabela 2, a explosão a vapor, água quente, ácido diluído e AFEX são os mais promissores para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (ALVIRA et al. 2010; MOSIER et al., 2005).

Tabela 2 - Diversos tipos de métodos de pré-tratamento para biomassa vegetal. Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2007a).

Método	Processo	Efeitos no lignocelulósico
Pré-tratamentos Físicos	<ul style="list-style-type: none"> - Moinho de bola - Moinho de martelo - Hidrotérmico (água quente) - Vapor a alta pressão - Extrusão - Pirólise - Irradiação de raios gama - Irradiação de microondas - Irradiação de ultrassom 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da área superficial acessível e do tamanho dos poros - Redução do grau de cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização - Hidrólise parcial da hemicelulose - Fragmentação parcial da lignina
Pré-tratamentos Físico-químicos e químicos	<p>BASEADOS EM EXPLOSÃO:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Explosão a vapor - AFEX (Ammonia Fiber Explosion) - Explosão com impregnação de SO₂ <p>BASEADOS EM ÁLCALIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hidróxido de Sódio - Amônia ou Sulfeto de Amônio <p>BASEADOS EM GÁS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dióxido de Cloro - Dióxido de Nitrogênio <p>BASEADOS EM ÁCIDOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ácido Sulfúrico - Ácido Clorídrico - Dióxido de enxofre <p>AGENTES OXIDANTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peróxido de hidrogênio - Ozônio <p>SOLVENTES DE CELULOSE:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cadoxen - CMCS* <p>ORGANOSOLV</p> <ul style="list-style-type: none"> - Extração etanol-água - Extração benzeno-água 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação - Redução do grau de cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização - Hidrólise parcial ou completa da hemicelulose
Pré-tratamentos Biológicos	<ul style="list-style-type: none"> - Uso de Actinomicetos - Uso de Fungos 	<ul style="list-style-type: none"> - Deslignificação - Redução do grau de polimerização da hemicelulose e celulose

* Mistura de Tartarato de Sódio, Cloreto Férrico, Hidróxido de Sódio e Sulfeto de Sódio.

2.7 Explosão a Vapor

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

Atualmente, o processo de explosão a vapor tem sido considerado um processo viável no pré-tratamento de biomassa para a produção de biocombustíveis (**AGBOR et al., 2011; ALVIRA et al., 2010; BALLESTEROS et al., 2006; MOSIER et al., 2005; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a**). A explosão a vapor permite a recuperação de grande parte dos componentes dos materiais lignocelulósicos, minimizando a sua degradação (**AVELLAR; GLASSER, 1998**). Além disso, a técnica provou ser efetiva para uma grande variedade de materiais lignocelulósicos, incluindo madeira dura, madeira mole e gramíneas.

Mason (1926) e **Babcock (1932)** demonstraram que o vapor penetra no material lignocelulósico e condensa, formando água dentro das fibras. Após a descompressão, esta água que está em equilíbrio com o vapor a alta pressão, é rapidamente resfriada a 100°C (pressão atmosférica), evaporando-se e gerando literalmente uma explosão no interior das fibras. Esta explosão, por sua vez, proporciona uma maciça desestruturação e desagregação das fibras e nas regiões de alta densidade de celulose amorfa ocorre a ruptura da fibra.

Além do efeito de desestruturação das fibras, a técnica de explosão a vapor também provoca a ruptura das ligações químicas dos componentes da biomassa. Isto ocorre devido à temperatura elevada do meio, superando a energia de ativação das reações. Dessa forma, as consequências do pré-tratamento são (**OVEREND; CHORNET, 1987**):

- A clivagem das ligações dos complexos lignina-carboidrato.
- A ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses. Os grupos acetil das hemiceluloses são convertidos em ácido acético, que atua como catalisador na degradação dos polissacarídeos (processo autocatalítico).
- O aumento da cristalinidade da celulose residual e a diminuição do seu grau de polimerização.
- O amolecimento e a clivagem extensiva das ligações C-O-C da lignina: as ligações α -O-4 e β -O-4 e os grupos metoxilas.

- A fragmentação da lignina em subunidades de baixa massa molecular.
- Formação de pseudo-lignina depositando-se sobre as fibras do material lignocelulósico (**SAAD, 2010**). Durante o pré-tratamento ocorre a condensação dos fragmentos solubilizados de lignina com eles mesmos e com compostos presentes no meio reacional (furfural e hidroximetilfurfural. Dessa forma, a concentração de lignina no material pré-tratado sofre um decréscimo nos primeiros instantes da reação, no entanto após passar por um valor mínimo a taxa de fragmentação da lignina sólida se torna menor do que a taxa de condensação fazendo com que a concentração de lignina aumente.

Assim, após o pré-tratamento por explosão a vapor, duas frações são formadas: uma fração sólida composta de celulose com uma lignina facilmente extraível e uma fração líquida rica em hemiceluloses e com uma pequena quantidade de lignina solubilizada.

Outro aspecto importante a ser avaliado na explosão a vapor são os parâmetros operacionais do pré-tratamento. Vários parâmetros influenciam na qualidade do material processado e na formação de subprodutos. Os mais importantes são: temperatura (T), tempo de residência (t) e acidez (pH). E outros fatores que provavelmente também influenciam são: tamanho das partículas de biomassa, volume do reator, pureza dos reagentes, umidade do material a ser processado e pressão do sistema (**ALVIRA et al., 2010; SENDELIUS, 2005**). Com o objetivo de facilitar a comparação de diferentes condições de pré-tratamento, **Overend e Chornet (1987)** combinaram os parâmetros T e t em um simples fator, o chamado fator de severidade (definido como R_o), considerando que a cinética da reação seja de primeira ordem (ver a equação seguinte). Desde então vários pesquisadores vem utilizando o fator de severidade como parâmetro de comparação entre os ensaios realizados de pré-tratamento por explosão a vapor (**FERNÁNDEZ-BOLAÑOS et al., 2001; GLASSER; WRIGHT, 1999; HEITZ et. al., 1989; HONGZHANG; LIYING, 2007; IBRAHIM et al., 2011; JEOH; AGBLEVOR, 2001; JIN; CHEN, 2006; KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998; MONTANE et al., 1998; NUNES; POURQUIE 1996; SHEN et al., 2011**).

$$R_o = \int_0^t e^{\left(\frac{T-T_{ref}}{14,75}\right)} \cdot dt \xrightarrow{\text{integrando}} \log(R_o) = \log \left[t \cdot e^{\left(\frac{T-T_{ref}}{14,75}\right)} \right] \quad (1)$$

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

2.8 Ultrassom

A sonoquímica é um campo da ciência que estuda a aplicação de ondas sônicas e ultrassônicas em processos químicos. Essas ondas provocam o aumento da velocidade das reações químicas e da transferência de massa, reduzindo, assim, a quantidade de reagentes e tornando as condições reacionais menos drásticas **(ADEWUYI, 2001)**. Um número razoável de estudos tem documentado o papel da sonoquímica em reações homogêneas e heterogêneas **(LUCHE, 1998)**. **Thompson e Doraiswamy (1999)** têm revisado os fundamentos e aspectos de engenharia do ultrassom em aplicações de síntese orgânica. Atualmente, o grande interesse dessa técnica está no uso em remediação e prevenção da poluição de compostos recalcitrantes **(ADEWUYI, 2001)**. No entanto, alguns autores, aproveitando o grande interesse mundial em buscar novas tecnologias de geração de biocombustíveis renováveis, têm avaliado o efeito da sonoquímica em etapas de pré-tratamento da biomassa **(HROMADKOVA; KOVACIKOVA; EBRINGEROVA, 1999; LIU; SUN; YE, 2006; MA et al., 2009; SANGAVE; PANDIT, 2004; SCHUCHARDT; GONÇALVES, 2002; SUN; TOMKINSON, 2002; RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008)** e também na etapa de hidrólise enzimática da celulose **(LI et al., 2004; LI et al., 2005; IMAI; IKARI; SUZUKI, 2004)**.

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

energia para serem formadas provocando assim condições severas de cavitação (**YOUNG, 1989**).

O tratamento ultrassônico de carboidratos foi inicialmente sugerido por **Flosdorf e Chambers (1933)**, após alguns anos do estudo dos efeitos químicos do ultrassom, realizado por **Richards e Loomis (1927)**. Nesse pequeno intervalo de tempo foi demonstrado o potencial desse método de ativação, especialmente para sistemas bifásicos (**KARDOS; LUCHE, 2001**). **Malhotra (1982)** estudou a degradação de derivados de celulose pela radiação ultrassônica em baixa frequência. O autor observou que a distribuição mássica dos produtos gerados pelo tratamento foi bem estreita, comprovando a não aleatoriedade das lises das macromoléculas. Além disso, essa reação foi influenciada pelo tipo de solvente, tamanho inicial da molécula (10^4 - 10^7 Da), tipo de catalisador, temperatura (30-70 °C), concentração do polissacarídeo (2-10%) e potência e frequência da radiação.

Wang et al. (2008) avaliaram a influência do pré-tratamento com ultrassom sobre celulose microcristalina. Os autores notaram que o pré-tratamento por ultrassom promove a destruição das pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose diminuindo o seu grau de cristalinidade e elevando a área superficial da mesma. Os autores ainda observaram que a energia cedida ao pré-tratamento ultrassônico tem um grande efeito sobre a área superficial da celulose. Até potências inferiores a 300 watts, esse efeito apresenta uma relação diretamente proporcional, enquanto, em níveis superiores, a área superficial da celulose permanece constante mostrando que a partir desse momento as bolhas geradas pela cavitação não possuem capacidade de reduzir ainda mais a área superficial da celulose microcristalina.

Apesar de alguns autores investigarem a influência do ultrassom em derivados de celulose ou até mesmo em celulose microcristalina, o efeito do pré-tratamento ultrassônico em materiais lignocelulósicos ainda é pouco avaliado. Existem somente alguns trabalhos de aplicação de ultrassom em biomassas vegetais. **Sun e Tomkinson (2002)** investigaram a aplicação do ultrassom no isolamento de hemiceluloses de palha de trigo. Com tempos de tratamentos superiores a 20 min, o rendimento de extração da hemicelulose foi elevado em 1,5%. Este ligeiro aumento foi explicado pelos autores como a ação mecânica do ultrassom nas paredes celulares resultando numa maior acessibilidade e extração das hemiceluloses. **Rodrigues e Pinto (2007)** avaliaram a extração de compostos fenólicos de cascas de coco moídas. Os autores notaram que o ultrassom favoreceu a remoção dos compostos fenólicos. Na melhor corrida do planejamento experimental empregado pelos autores, cerca de 400 mg/L de fenólicos foram detectados na fração líquida do pré-tratamento, mostrando que o ultrassom pode ser um fator importante num processo de extração de fenólicos em cascas de coco.

Por fim, **Sun et al. (2004)** irradiaram ondas ultrassônicas sobre bagaço de cana-de-açúcar visando o isolamento da sua celulose. Os autores conseguiram obter várias frações de celulose pura contendo no máximo 4% de hemicelulose e apenas 0,6% de lignina após realizar sucessivas etapas de extração alcalina com NaOH. **Velmurugan e Muthukumar (2011)** também estudaram a aplicação do ultrassom no pré-tratamento alcalino de bagaço de cana. Os autores concluíram que o pré-tratamento alcalino assistido por ultrassom é uma técnica promissora para deslignificação do material lignocelulósico. Mais de 70% da lignina foi removida empregando condições menos severas de pré-tratamento (NaOH 2% a 50°C por 20 min). Além disso, foi possível remover mais de 20% da hemicelulose sem provocar degradação da celulose (apenas 0,78%).

2.9 Hidrólise de Lignocelulósicos

A hidrólise de celulose pode ser realizada tanto por via química como enzimática. A Figura 7 mostra os dois principais caminhos para produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos, denotados "1" e "2". No primeiro caminho a hidrólise do material é feita por ácidos concentrados ou diluídos, ao passo que no segundo é realizado com o uso de enzimas. Existem várias vantagens e desvantagens entre a via química e enzimática e elas estão listadas na Tabela 3. A hidrólise enzimática é realizada sob condições brandas enquanto a hidrólise ácida requer alta temperatura e baixo pH, formando uma condição agressiva/corrosiva aos equipamentos utilizados. Com o uso de enzimas é possível obter rendimentos de hidrólise de celulose próximos de 100% enquanto para via ácida isso já não é possível. Além disso, vários compostos inibidores são formados durante a hidrólise ácida enquanto este problema não é encontrado na hidrólise enzimática (**TAHERZADEH; KARIMI, 2007a**).

Mas por outro lado, a hidrólise enzimática também tem as suas limitações comparada com a hidrólise com ácido diluído. O tempo de hidrólise enzimática é de alguns dias enquanto para a via ácida poucos minutos já são suficientes. O preço das enzimas ainda é muito alto em relação ao do ácido sulfúrico, embora alguns obstáculos já foram superados pela companhia Danish Novozyme na redução do preço das enzimas (**TAHERZADE; KARIMI, 2007**). Na hidrólise enzimática, o produto final da reação (glicose) provoca inibição das enzimas celulolíticas enquanto no processo químico, não sofre nenhum efeito. Com o intuito de superar a inibição das enzimas celulolíticas, o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) foi desenvolvido, na qual o açúcar liberado da hidrólise da celulose é diretamente consumido pelo microrganismo presente. Entretanto, as temperaturas ótimas para a etapa de fermentação e hidrólise são diferentes, gerando um novo desafio para obter

etanol bioquimicamente com eficiência. Em função disso, o processo com a etapa de hidrólise enzimática e de fermentação separados (SHF) ainda é o mais utilizado (**BALAT, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2007a**).

Figura 7 - Ilustração esquemática dos processos de produção de etanol a partir de biomassa vegetal. SHF (hidrólise e fermentação em etapas separadas), SSF (hidrólise e fermentação simultâneas). Adaptado de **SENDELIUS (2005)**.

Tabela 3 - Comparação entre as hidrólises com ácido diluído e enzimática. Adaptado de **Taherzadeh e Karimi (2007a)**.

Parâmetro	Hidrólise com ácido diluído	Hidrólise Enzimática
Condições da hidrólise	Severa	Branda
Rendimento da hidrólise	Baixo	Elevado
Inibição pelo produto durante a hidrólise	Não	Sim
Formação de compostos inibidores	Sim	Não
Custo do catalisador	Baixo	Alto
Tempo de hidrólise	Baixo	Elevado

2.9.1 Hidrólise Ácida

A via química é um procedimento bem conhecido e desenvolvido. Os processos mais famosos são o Bergius e o método Scholler (**KITANI; HALL, 1989**). O primeiro consiste na hidrólise com ácido clorídrico concentrado a baixa temperatura, enquanto o outro, com ácido sulfúrico diluído a alta temperatura. Os dois processos são eficientes na hidrólise do material lignocelulósico, porém apresentam baixos rendimentos devido à degradação dos açúcares monoméricos formados a furfural e hidroximetilfurfural (**DORAN; ALDRICH; INGRAN, 1994; KELLER, 1996**). Assim, os hidrolisados obtidos necessitam ser purificados para permitir a fermentação dos açúcares e várias metodologias podem ser utilizadas para esse fim.

O primeiro modelo cinético para descrever o processo de hidrólise da celulose com ácido diluído foi proposto por **Saeman (1945)**, sugerindo a seguinte sequência de reação: celulose gerando glicose, que por sua vez é degradada em hidroximetilfurfural. Esse modelo cinético foi baseado na formação de ácido conjugado, levando à clivagem das ligações glicosídicas, adição de moléculas de água e liberação de íons H^+ . Entretanto, **Bouchard et al. (1990)**, demonstrou que os produtos iniciais da hidrólise da celulose são primariamente oligômeros solúveis e glicose proveniente da quebra instantânea da porção amorfa da celulose (ver equação 3). Os autores demonstraram que a hidrólise de ambas as frações da celulose pode ser simulada por duas reações paralelas de pseudoprimeira ordem, sendo que alguma cristalização da parte amorfa pode ocorrer, embora em proporção insignificante, sob as condições usuais do processo.

A principal desvantagem da hidrólise ácida é a degradação dos açúcares durante a reação de hidrólise, formando subprodutos indesejáveis. Isso não só diminui o rendimento de açúcares como também vários subprodutos são altamente inibitórios à etapa de fermentação, tais como o furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico, ácido acético, ácido urônico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico, vanilina, fenol, formaldeído e outros (**LARSSON et al., 2000; TAHERZADEH; KARINI, 2007b**). Uma forma de evitar a degradação dos monossacarídeos é realizar a etapa de hidrólise com ácido em duas ou mais etapas (**TAHERZADEH; KARINI, 2007b**). Na primeira etapa, que pode ser realizada em condições brandas, a hemicelulose é convertida em monômeros. Na segunda etapa, o sólido residual é hidrolisado sob condições mais severas, permitindo a hidrólise da celulose.

2.9.2 Hidrólise Enzimática

A via enzimática utiliza enzimas específicas para a degradação da celulose, chamadas de enzimas celulolíticas ou de celulases. Para hidrólise total da celulose, são necessários três tipos de celulase: endocelulase, celobio-hidrolases e β -glicosidase (BALAT, 2011; MANDELS; ANDREOTT; ROCHE, 1976; TAHERZADEH; KARINI, 2007a; WYMAN, 1994). Cada uma tem um papel importante na degradação da celulose. A endocelulase cliva a cadeia de celulose nas regiões amorfas de forma aleatória, produzindo oligômeros curtos (mais extremidades acessíveis). A celobio-hidrolase se liga nas extremidades das cadeias e gera principalmente glicose e celobiose. Por fim, a β -glicosidase cliva a celobiose formando duas moléculas de glicose (Figura 8). Essa via tem a vantagem de ser altamente específica, atuando somente no material lignocelulósico e não gerando subprodutos que interferem na fermentação dos açúcares (TAHERZADEH; KARINI, 2007a). Entretanto, o custo da enzima ainda é elevado, necessitando de esforços no aperfeiçoamento da produção e no desempenho das enzimas.

Figura 8 - Celulases em um sistema enzimático cooperativo na degradação de celulose. Cada tipo de enzima catalisa uma reação específica (figura extraída de WYMAN (1994)).

O fungo *Trichoderma reesei* é o microrganismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulases. Ele tem a capacidade de produzir pelo menos dois tipos de celobio-hidrolases e cinco de endoglucanases. 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, ou seja, a eficiência de conversão da celulose em glicose é baixa. Dessa forma, para conseguir um sistema de enzimas mais eficiente é necessário um suplemento de β -glicosidase proveniente de outros microrganismos, como a de *Aspergillus sp* (**BALAT, 2011; SAKAR et al., 2012**).

Os fatores que influenciam a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos têm sido tradicionalmente divididos em dois grupos, o primeiro procedente das características estruturais da biomassa e o segundo relacionado com o mecanismo enzimático. É importante ressaltar que muitos dos fatores que integram estes dois grupos estão interligados durante a etapa da hidrólise e, como resultado, a influência de cada fator é difícil de ser quantificada isoladamente. Um exemplo disto é a digestibilidade do substrato pelo sistema enzimático, que é afetada pelo tipo da biomassa, tipo e condição de pré-tratamento e concentração de enzimas na hidrólise (**SAAD, 2010**).

Dentre os fatores relacionados com o mecanismo enzimático tem-se o sinergismo entre as enzimas, a adsorção das celulasas e a inibição pelos produtos da reação. Como mostrado na Figura 8, o mecanismo de reação das celulasas envolve vários tipos de enzimas atuando em conjunto. Sem esse efeito sinérgico entre as enzimas não seria possível a conversão completa da celulose. Outro fator que também influencia a hidrólise enzimática é a adsorção das celulasas no substrato. A formação de complexo enzima-substrato é considerada um passo crítico na hidrólise enzimática da celulose (**WALKER; WILSON, 1991**). **Zheng (2007)** classificou a adsorção em dois tipos: produtiva e não produtiva. O autor define a adsorção produtiva como a adsorção de enzimas que são usadas na hidrólise para a produção de açúcares. A adsorção não produtiva refere-se à adsorção das enzimas sobre a lignina de materiais lignocelulósicos. Estas enzimas não catalisam a hidrólise, o que diminui a eficácia da enzima e o rendimento de açúcares. Por fim, o outro fator é a inibição das enzimas pelos produtos da reação. A celobiose e a glicose são os dois produtos da reação que provoca inibição das enzimas celulolíticas. Estudos mostraram que a inibição por celobiose é maior que por glicose (**GHOSE; DAS, 1971**). **Kastel'yanos; Sinitsyn e Vlasenko (1995)** mostraram que a glicose inibi a β -glicosidase enquanto a celobiose inibi a endo-glucanase. As exo-glucanases sofreram inibição por estes compostos.

Dentre os fatores que interferem a hidrólise enzimática e estão relacionados com características da biomassa tem-se: a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, o tamanho e a distribuição dos poros e a área superficial total acessível (**BALAT, 2011; SUN; CHENG, 2002**). A lignina é o principal composto responsável pela inibição das enzimas celulolíticas na sacarificação de materiais lignocelulósicos. A maior parte dos resultados reportados na literatura tem mostrado que a

digestibilidade dos materiais lignocelulósicos aumenta com a remoção da lignina (**FUENTES et al., 2010; GARCÍA-CUBERO et al., 2009; HUBBELL; RAGAUSKAS, 2010; IBRAHIM et al., 2011; INGRAM et al., 2011; KOO et al., 2011; LEE et al., 2009; LI; KIM, 2011; ROMANÍ et al., 2011; YU et al., 2011**). O principal papel inibidor da lignina foi atribuído à adsorção inespecífica (não produtiva) da enzima na lignina (**SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997**) e à inacessibilidade à celulose, devido ao impedimento estérico (**MOONEY et al. 1999**). Além disso, outros fatores relacionados com a lignina têm sido sugeridos, tais como o conteúdo de lignina, os complexos lignina-carboidrato e interação hidrofóbica entre a lignina e as enzimas (**YU et al., 2011**). **Berlin et al. (2006)** observaram que uma lignina mais hidrofóbica tem uma capacidade maior de inibição das enzimas celulasas, indicando que as interações hidrofóbicas têm um papel importante na adsorção de celulasas aos materiais lignocelulósicos.

2.10 Remoção de lignina

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

Dessa forma, nos processos de conversão de biomassa vegetal a etanol, em que os materiais lignocelulósicos pré-tratados geralmente possuem a lignina mais exposta, a extração alcalina tem sido aplicada com grande eficiência na sua remoção (**ALVIRA et al., 2010; GLASSER; WRIGHT, 1998; PAN et al., 2005; RAMOS, 2003**). **Pan et al. (2005)** mostraram que a extração alcalina da lignina resulta num aumento significativo da hidrólise enzimática da celulose de coníferas (aproximadamente 30%). Os autores ainda observaram que o uso de álcali em condições brandas (NaOH 1%, 20°C por 72h) remove seletivamente uma fração da lignina que apresenta uma elevada afinidade por proteínas, as quais resultam em ligações não-produtivas com as enzimas celulolíticas.

Além da extração alcalina, outra técnica que vem ganhando atenção dos pesquisadores é a deslignificação organosolv, por ela ser considerada uma técnica

mais limpa, sem geração de poluentes líquidos, gasosos e sólidos **(ASADA; NAKAMURA; KOBAYASHI, 2005; RUIZ; VICENTE; TEIXEIRA, 2012)**. A deslignificação organosolv baseia-se no uso de solventes orgânicos ao invés dos reagentes químicos comumente empregados no licor de polpação **(AZIZ; SARKANEN, 1989)**. **Hongzhang e Liying (2007)** avaliaram o fracionamento limpo de palha de trigo explodida a vapor utilizando o etanol como solvente de extração. Os autores conseguiram recuperar 85% do etanol utilizado e a maioria dos produtos de degradação da lignina foram removidos do material explodido.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi investigar tecnologias de pré-tratamento dos subprodutos sucroalcooleiros (bagaço e palha de cana) com intuito de dar um destino mais adequado e elevar a produção de etanol sem necessidade de aumentar a área cultivável das Usinas de Açúcar e Álcool. Os materiais lignocelulósicos foram pré-tratados por explosão a vapor (bagaço), impregnação a vapor (palha) e por ultrassom (bagaço e palha), para que os seus principais constituintes (celulose, hemicelulose e lignina) sejam separados, facilitando a etapa de sacarificação necessária para converter a celulose em açúcares fermentáveis. Para reduzir ou eliminar o efeito de inibição que as enzimas celulolíticas sofrem pela lignina, uma etapa de deslignificação previamente à de hidrólise enzimática foi realizada. Todas as etapas de pré-tratamento e deslignificação foram monitoradas por análise de caracterização química do lignocelulósico e dos licores obtidos em cada etapa. Os rendimentos da etapa hidrolítica foram obtidos através da quantificação de açúcares redutores liberados após a sacarificação da celulose. Todos os resultados obtidos foram comparados para avaliar quais as vias de obtenção de etanol celulósico a partir de subprodutos sucroalcooleiros foram as mais promissoras.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Fluxograma do Projeto

No fluxograma abaixo estão representadas as vias a serem investigadas para a obtenção de etanol a partir de bagaço e palha de cana.

Figura 9 - Fluxograma de conversão de bagaço ou palha de cana em açúcares fermentáveis.

No presente trabalho foram estudados três tipos de pré-tratamentos (explosão a vapor, hidrotérmico e ultrassom) para o bagaço e palha de cana, visando reduzir a recalcitrância desses materiais lignocelulósicos às celulasas. Uma etapa de deslignificação também foi inserida a fim de diminuir o efeito de inibição da lignina sobre as enzimas utilizadas.

4.2 Materiais Lignocelulósicos

Tanto o bagaço como a palha de cana foram gentilmente doados pelas Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário, localizada em Morro Agudo - SP. O bagaço de cana foi colhido diretamente do galpão de armazenamento do mesmo. Após

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

A palha de cana foi colhida manualmente da lavoura de cana-de-açúcar, removendo-a diretamente dos colmos da cana e armazenando-a em sacos de plásticos de capacidade de 50L. As palhas foram secas ao ar livre até apresentarem umidades abaixo de 10%.

Para o pré-tratamento com explosão a vapor, o bagaço de cana utilizado era o que se encontrava no galpão de armazenamento das próprias Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário. O reator de explosão a vapor disponível da Usina era automaticamente alimentado por correias transportadoras. Para a palha de cana, o pré-tratamento hidrotérmico foi realizado no reator REG-MED AU/E-20 da Universidade Federal do Pernambuco. Para isso, a palha de cana foi cortada em tiras de aproximadamente 2 x 1 cm e adicionadas ao reator. Não foi realizada nenhuma etapa de moagem ao material lignocelulósico.

Nos ensaios de pré-tratamento por ultrassom, tanto o bagaço como a palha de cana foram previamente moídos a 20 mesh em moinho de facas da MR – Manesco & Ranieri Ltda modelo MR340, disponível na Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP.

4.3 Métodos de Pré-tratamento

4.3.1 Explosão a Vapor

O pré-tratamento por explosão de vapor foi realizado dentro das Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário, localizada em Morro Agudo - SP. Esta usina possui três reatores de explosão a vapor com uma capacidade de 5m³ cada (Figura 10). Esses reatores são utilizados para tratar o bagaço de cana-de-açúcar que será utilizado na formulação de ração animal. A condição de pré-tratamento utilizada pela Usina é a seguinte: 15 a 16 kgf/cm² (14,5-15,5 atm) de pressão (temperatura aproximada de 200°C) por 7 min. A mesma condição empregada pela Usina foi testada no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, já que devido ao dimensionamento da tubulação entre o reator e o ciclone, pressões menores ocasionariam entupimento da linha.

Após o término do pré-tratamento, o material explodido foi lavado continuamente com água para a remoção dos resíduos de açúcares, provavelmente vindos da hemicelulose, impregnados na superfície. O material úmido foi espalhado em lona e exposto ao sol para sua secagem. Após o material estar bem seco, ele foi armazenado em sacos de 60 litros e identificado para posterior utilização.

Figura 10 - Fotos dos reatores de explosão a vapor das Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário. À esquerda, foto da parte inferior do reator e, à direita, parte superior.

4.3.2 Hidrotérmico

Devido à indisponibilidade do reator de explosão a vapor das Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário, os testes de pré-tratamento da palha foram realizados no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mas vale ressaltar que o tipo de pré-tratamento empregado por esse grupo difere do pré-tratamento utilizado na Usina, já que o sistema de pré-tratamento do grupo não possui um ciclone acoplado, impedindo assim realizar testes de explosão a vapor e somente pré-tratamentos hidrotérmicos.

O reator utilizado foi o modelo REG MED AU/E-20 com sistema de mistura por rotação completa (360°), de 6 rpm, com capacidade de 20 L munido de aquecimento por resistência elétrica e controle de temperatura e pressão (Figura 11). As condições de pré-tratamento da palha foram: 180°C, 185°C, 190°C, 195°C por 10 min e 190°C por 15 min, sob relação sólido:líquido 1:10. Cerca de 1 kg de palha seca e moída a 1,5 mm em moinho tipo forrageira a martelo picador da marca BECKER, modelo CTM, juntamente com 10L de água destilada foram adicionados ao reator e fechado hermeticamente. A camisa de aquecimento do reator foi ligada e a temperatura e o tempo de reação foram monitorados. Após o tempo de reação o vapor gerado foi liberado gradualmente até atingir a pressão ambiente, com a finalidade de diminuir o tempo de resfriamento e consequentemente, a severidade do processo. Como o vapor

utilizado no pré-tratamento é gerado dentro do próprio reator, uma rampa de aquecimento até a temperatura desejada foi observada.

Figura 11 - Foto do reator rotatório modelo REGMED AU/E-20 do Departamento de Antibióticos da UFPE, em que foi realizado o pré-tratamento por impregnação a vapor da palha de cana-de-açúcar.

Após o pré-tratamento por vapor, a palha pré-tratada foi lavada 3 vezes com 20 L de água com aproximadamente 70°C cada uma, espremida e pesada. Uma amostra pequena do material foi removido para a determinação da umidade e com isso mensurar o seu rendimento mássico a partir da equação 4. Uma fração da palha pré-tratada foi reservada para análise de caracterização química e teste de conversão enzimática e outra parte da massa foi reservada para a etapa de deslignificação alcalina com NaOH.

O rendimento mássico da etapa foi calculado utilizando a equação a seguir:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4)$$

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

A perda ou solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, lignina e hemicelulose) foi calculada da seguinte forma:

$$P = 100 \times \left(\frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot R \cdot y_f}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left(1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (5)$$

Onde: P: perda ou solubilização do componente macromolecular (%);

M_i : Massa inicial de material lignocelulósico;

y_i : teor do componente no material lignocelulósico in natura;

y_f : teor do componente no material lignocelulósico pré-tratado;

R: rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

4.3.3 Ultrassom

O pré-tratamento por ultrassom foi realizado empregando as condições estudadas por **Sun et al. (2004)**. Cerca de 10 g de bagaço ou palha de cana-de-açúcar moídos a 20 mesh foram adicionados num béquer de 1 L com aproximadamente 200 mL de água destilada. Este frasco foi acomodado no interior de um banho de ultrassom Marca UNIQUE e modelo USC-2800 (40 kHz/120 W). As condições de pré-tratamento foram: (1) pré-tratamento com ultrassom a 55°C por 40 min sob radiação de 40 kHz/120W, (2) suspensão do ultrassom e início de agitação mecânica branda por 80 min a 55°C. Após essas duas etapas o material lignocelulósico foi filtrado e lavado com 300 mL de água destilada. Os filtrados foram reservados para posterior análise de lignina solúvel e monossacarídeos. Da fração sólida foi determinada a massa para cálculo do rendimento da etapa pela equação 4.

4.4 Deslignificação dos materiais lignocelulósicos

Para a etapa de deslignificação foram estudadas duas técnicas diferentes. A primeira empregando NaOH em meio aquoso (extração alcalina convencional) e a segunda utilizando NaOH e etanol como agentes deslignificantes (deslignificação alcoólica alcalina).

4.4.1 Extração alcalina convencional

Para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor a extração alcalina convencional foi realizada num reator fabricado sob encomenda pela CONFAB em aço inoxidável 304 com capacidade de 350 L, munido com camisa de aquecimento com

óleo térmico e agitação mecânica, localizado no Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP. A condição de reação foi a seguinte: NaOH 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v), agitação de 50 rpm, temperatura de reação 100°C por 1 h. É importante ressaltar que o reator apresenta uma longa rampa de aquecimento. Assim o material lignocelulósico só foi adicionado ao reator após prévio aquecimento da solução reacional (90°C - ver Figura 12). Após o tempo de reação, o bagaço deslignificado foi imediatamente descarregado do reator e o licor negro ainda quente foi separado da polpa através de centrifugação. A polpa foi lavada com água até atingir pH neutro.

Figura 12 - Rampa de aquecimento do ensaio de extração alcalina convencional do bagaço pré-tratado por explosão a vapor. As setas indicam o período em que a temperatura do reator permaneceu em 100°C e o momento em que o material foi adicionado no reator. Material adicionado ao reator em 120 min.

A deslignificação da palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15 min foi realizada no mesmo reator do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar (REG MED AU/E-20) por causa da quantidade obtida de palha pré-tratada ser insuficiente para ser deslignificada no reator do Departamento de Engenharia Química da EEL/USP (capacidade de 350 L). A condição de reação foi NaOH 1% (m/v) por 60 min a 100°C sob uma relação sólido-líquido 1:10 (m/v). Uma pequena rampa de aquecimento também foi observada (ver Figura 13). A massa de sólido obtida após a deslignificação foi medida para se determinar o rendimento da etapa e reservada para posterior análise de caracterização química e ensaio de conversão enzimática.

Figura 13 - Rampa de aquecimento do ensaio de extração alcalina convencional da palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15 min. As setas indicam o período em que a temperatura do reator permaneceu em 100°C.

Com o objetivo de diminuir o impacto da rampa de aquecimento sobre a degradação dos carboidratos presentes na palha de cana, os testes de deslignificação das palhas pré-tratadas com vapor nas condições 180°C, 185°C, 190°C e 195°C por 10 min foram realizados em ampolas de aço inoxidável de 200 mL. Essas ampolas têm um aquecimento rápido e um resfriamento quase instantâneo devido à facilidade de manipulação. O aquecimento é realizado em um banho de silicone com capacidade de até 4 ampolas de 200 mL. A condição de extração alcalina empregada foi a seguinte: relação sólido:líquido 1:10 (m/v), NaOH 1% (m/v) e temperatura de 100°C por 1h. Ao término da reação, as ampolas foram resfriadas em banho de gelo e a fração sólida contida na mesma foi filtrada sob vácuo e lavada com água destilada a 70°C para remoção de licor de extração alcalina residual. A fração sólida foi seca ao ar livre e pesada para determinação do rendimento da etapa pela equação 4. Uma parte foi reservada para análise de composição química e outra para teste de digestibilidade enzimática.

As mesmas condições e tipo de reator (ampolas) foram aplicadas na deslignificação do bagaço e da palha pré-tratados com ultrassom.

4.4.2 Deslignificação alcoólica alcalina

Como não existem estudos de deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor, uma matriz L_{18} de Taguchi foi empregada para avaliar os cinco fatores de interesse: relação sólido:líquido, temperatura, tempo e concentração de etanol e NaOH. A matriz L_{18} de Taguchi (Tabela 4) permite avaliar até oito fatores, sendo um com dois níveis de variação e os outros com três níveis de

variação. Esse tipo de matriz de Taguchi foi escolhido devido à possibilidade de avaliar os fatores em três níveis com um número reduzido de experimentos, ao contrário dos planejamentos fatoriais de 3^n .

Para o trabalho foram necessárias somente cinco colunas da matriz (colunas dos fatores 2, 3, 4, 5 e 6). As colunas correspondentes aos fatores 1, 7 e 8 foram utilizadas para o cálculo do erro padrão do planejamento, chamadas de colunas fantasmas (**NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001**). As condições de cada fator foram escolhidas baseadas no trabalho de **Hongzhang e Liying (2007)**, os quais aplicaram a deslignificação alcoólica alcalina em palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor. O rendimento da deslignificação, a porcentagem de álcool recuperado e a conversão enzimática da polpa obtida foram as variáveis de resposta avaliadas no planejamento.

Tabela 4 - Matriz L_{18} de Taguchi usada na deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6	Fator 7	Fator 8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

1. Somente as colunas correspondentes aos fatores 2 a 6 foram utilizadas para as variáveis de respostas.
2. Os números 1, 2 e 3 presentes nas colunas dos fatores correspondem aos níveis de variação.

Os ensaios foram realizados em ampolas de aço inoxidável com capacidade de 500 mL aquecidas por banho de silicone. Em todos os ensaios foi utilizada uma massa de 30 g de bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Após o tempo de reação, as ampolas foram subitamente resfriadas em banho de gelo e o licor negro foi separado da polpa através de filtração e reservado para posterior análise. A polpa foi lavada com 2 L de água destilada a 70°C para remoção de licor de extração alcalina residual.

A fração sólida foi seca ao ar livre e pesada para determinação do rendimento da etapa pela equação 4. Uma parte foi reservada para análise de composição química e outra para teste de digestibilidade enzimática.

O álcool presente no licor foi evaporado em rotaevaporador. Uma amostra de 5 ml do destilado obtido foi adicionada num frasco devidamente tarado, com auxílio de uma pipeta volumétrica, para determinar a massa do volume correspondente. Com isso, foi possível calcular a massa específica do destilado. A concentração de etanol no destilado foi obtida através da equação a seguir:

$$\%_{ETANOL_{DESTILADO}}(v/v) = 100 \cdot \frac{1 - d_{Destilado}}{1 - d_{EtOH}} \quad (6)$$

Onde: $d_{destilado}$: densidade do destilado (g/mL);

d_{EtOH} : densidade do etanol puro a 25°C (0,791 g/mL – valor obtido no rótulo do etanol utilizado).

4.5 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada empregando a celulase comercial Celluclast 1.5 L, suplementada pela β -glicosidase (Novozym 188), ambas doadas gentilmente pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) ao laboratório. O conteúdo de proteínas para ambas as enzimas são 43,5 mg/mL e 31,5 mg/mL, respectivamente (**INGRAM et al., 2011**). As condições de reação foram: tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8, relação sólido:líquido 1:10, agitação orbital a 100 rpm, 45°C por 72 h. As cargas enzimáticas foram de 15 FPU/g de material seco (Celluclast 1.5 L) e 10 UI/g de material seco (β -glicosidase), baseadas nos valores comumente encontrados na literatura (**BALLESTEROS et al., 2004; CARA et al., 2006; WYMAN, 1999**). Após o término, os hidrolisados foram fervidos por 5 min, filtrados em papel de filtro Whatmann n.º 1 e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito abaixo. Os resíduos da hidrólise foram separados para posterior quantificação de massa residual. A conversão enzimática de celulose foi calculada pela equação a seguir:

$$CC = \frac{m_{glicose} \times f_h}{m_{inicial} \times y_i} \times 100 \quad (7)$$

Onde: CC: conversão enzimática da celulose;

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

$m_{inicial}$: massa seca de material lignocelulósico (g);

y_i : teor de celulose no material lignocelulósico;

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

A atividade celulolítica total foi determinada utilizando-se a metodologia padrão de **Mandels et al. (1976)**. Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 e 50 mg de papel de filtro Whatmann número 1 como substrato. O meio foi incubado num banho-maria a 45°C durante 1 h. A glicose liberada foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por **Miller (1956)**. A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS, e o meio foi fervido por 5 min. Após o resfriamento, a absorbância em 540 nm foi lida em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25.

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando a metodologia descrita por **Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002)**. Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático e 0,4 mL de solução 0,1 % (m/v) de p-NPG (para-nitrofenol β -1 $\rightarrow$ 4 glucosídeo). O meio foi incubado em banho-maria a 45°C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10 % (m/v) de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). A quantidade de glicose liberada foi mensurada através da equivalência molar do p-NP (para-Nitrofenol) na clivagem do p-NPG (1 p-NPG $\rightarrow$ 1 glicose + 1 p-NP) e usando a absorvidade molar do p-NP ($\epsilon_{410\text{nm}} = 15.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

4.6 Determinação das condições ótimas da enzima Celluclast 1.5L

As condições ótimas de pH e temperatura da enzima Celluclast 1.5L foram determinadas através de um planejamento experimental baseado na matriz composta central rotacional (CCR) (Tabela 6) (**MONTGOMERY, 2001**). Essas informações foram utilizadas para ajustar as melhores condições da etapa de hidrólise enzimática. A faixa de pH avaliada foi de 2,6 a 7,0 e para a temperatura, de 10 a 100°C (Tabela 5).

Tabela 5 - Fatores codificados para a matriz CCR.

Nível	pH	T(°C)
-1,414	2,6	10
-1	3,2	23
0	4,8	55
1	6,4	87
1,414	7,0	100

Tabela 6 - Matriz de Planejamento CCR para dois fatores.

Ensaio	Fator A	Fator B
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Fator A corresponde ao pH.
Fator B representa a temperatura.

Todos os ensaios do planejamento experimental foram realizados seguindo a metodologia padrão de determinação de atividade enzimática de celulase (**MANDELS; ANDREOTT; ROCHE, 1976**) – item 4.5.

4.7 Análise de Composição Química do Material Lignocelulósico

4.7.1 Caracterização do material lignocelulósico

A caracterização química do bagaço e palha de cana-de-açúcar após as etapas de pré-tratamento e de extração de lignina foi realizada empregando-se a metodologia analítica desenvolvida por **Rocha et al. (1997)** e validada por **Gouveia et al. (2009)**.

Amostras de 2 g de material lignocelulósico (moído a 20 mesh), pesados com precisão de 0,1 mg, foram transferidas para um béquer de 100 mL e tratados com 10 mL de H₂SO₄ 72%, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45,0 ± 0,5°C por 7 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada e a amostra foi transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume de água a 300 mL. Para a completa hidrólise dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min a 1,05 bar. Após a descompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente. A mistura reacional foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido

no filtro. Este balão que contém o hidrolisado foi armazenado para análise posterior de carboidratos.

4.7.2 Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos por CLAE

Os hidrolisados da metodologia de caracterização do material lignocelulósico e os obtidos na hidrólise enzimática foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A.

Antes de injetar na coluna, os compostos fenólicos presentes nas amostras foram removidos através de cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters). O cromatograma da amostra foi comparado com o padrão dos açúcares e ácidos orgânicos a serem analisados. A quantificação foi feita através de curvas de calibração de cada composto.

4.7.3 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido (Lignina Klason)

O material insolúvel retido no papel de filtro obtido no item 4.7.1 foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada e seco em estufa a 110°C até massa constante. A percentagem de lignina Klason foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco.

4.7.4 Determinação do Teor de Cinzas (Lignina Klason)

O material resultante do item superior foi colocado em um cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Em seguida, esse material foi inicialmente calcinado a 400°C e depois por mais 2 h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A massa real de lignina Klason foi calculada pela diferença entre a massa obtida no item superior e a massa de cinza obtida.

4.7.5 Determinação da Lignina Solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Foram colocados 5 mL do hidrolisado, obtido no item 4.7.1, em um balão volumétrico de 100

mL, com 50 mL de água destilada e 40 gotas de NaOH 6,5 N. Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada pelo espectrofotômetro. A equação seguinte foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{280nm} - \varepsilon_{HMF} \cdot C_{HMF} - \varepsilon_{Furf} \cdot C_{Furf} - 0,045650)}{21,797339} \quad (8)$$

Onde: C_{Lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);

A_{280nm} : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;

ε_{HMF} : Absortividade do hidrometilfurfural (114,00 L.g⁻¹, **GOUVEIA et al., 2009**)

ε_{Furf} : Absortividade do furfural (146,85 L.g⁻¹, **GOUVEIA et al., 2009**)

C_{HMF} : Concentração de hidrometilfurfural no hidrolisado (g/L)

C_{Furf} : Concentração de furfural no hidrolisado (g/L)

4.7.6 Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por CLAE, em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹ a 25°C. O hidrolisado, obtido no item 4.7.1, foi previamente diluído com água na razão de 1:5, filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,45 μ m (Milipore), e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 μ L. Os compostos foram detectados a 276 nm, em um detector UV/Visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidrometilfurfural foram determinadas a partir de curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os materiais lignocelulósicos foram presos em um suporte com auxílio de fita de carbono e submetidos ao recobrimento metálico com ouro, espessura de 7 μ m com uma voltagem de 40 mA sob atmosfera de argônio. As amostras metalizadas foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura 1450 V (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP) operando a 20 kW e utilizando detector de elétrons secundários. As amostras foram dispostas de forma que seja possível observar as modificações superficiais das fibras do bagaço e da palha depois dos pré-tratamentos.

4.9 Grau de Cristalinidade por Difração de Raio-X

Após secagem, o material lignocelulósico foi preparado para análise de difração de raio-X utilizando um difratômetro de raios X de marca Shimadzu, modelo XRD – 6000, com um tubo de cobre gerador de raios X com filamento de tungstênio ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite no intervalo angular de 5° a 80° (ângulo de Bragg - 2θ), passo angular de $0,05^\circ$ e tempo de contagem de 1s (equipamento disponível no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP).

Os dados gerados pelo difratômetro apresentavam muito ruído. Portanto, um método de normalização foi empregado utilizando o Software OriginPro 8 SRO v. 8.07. A normalização "Adjacent-Averaging" (média adjacente) sob 10 pontos por vez foi a que apresentou o melhor resultado. Após isso, o grau de cristalinidade foi calculado através da equação 9 **(CAO; TAN, 2002)**.

$$I_c = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad (9)$$

Onde: I_c : grau de cristalinidade (%);

I_{002} : intensidade do pico do plano cristalino 002 ($2\theta = 22,6^\circ$);

I_{am} : intensidade do pico das fases amorfas ($2\theta = 19,0^\circ$).

5 RESULTADOS

Para facilitar a organização das informações contidas nessa tese, os resultados foram divididos em cinco partes:

1. Dados da determinação das condições ótimas da Celluclast 1.5 L;
2. Dados da via de produção de açúcares fermentescíveis empregando bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor;
3. Dados da via de produção de açúcares fermentescíveis empregando palha de cana pré-tratada hidrotêrmicamente;
4. Dados da via de produção de açúcares fermentescíveis empregando bagaço e palha de cana pré-tratados com ultrassom;
5. Comparação entre os diversos dados levantados.

5.1 Determinação das condições ótima para a enzima Celluclast 1.5L

A determinação de atividade enzimática é um parâmetro extremamente importante a ser avaliado em processos biotecnológicos, pois diferente dos reagentes químicos, os quais são fixados por base mássica, as enzimas são fixadas por base em sua velocidade de reação. Na Tabela 7, encontra-se a matriz de planejamento composto central rotacional (CCR) empregada no trabalho juntamente com os dados da variável resposta (**MONTGOMERY, 2001**).

Tabela 7 - Matriz de Planejamento CCR para os dois fatores (pH e temperatura) e variável resposta (atividade enzimática).

Exp.	pH	T(°C)	Ativ. Enz. (FPU/mL)
1	3,2	23	0,19
2	6,4	23	0,80
3	3,2	87	0,11
4	6,4	87	0,28
5	2,6	55	8,65
6	7,0	55	0,00
7	4,8	10	0,00
8	4,8	100	0,00
9	4,8	55	39,97
10	4,8	55	40,28
11	4,8	55	37,15
12	4,8	55	42,53

As maiores atividades enzimáticas (em torno de 40 FPU/mL) foram obtidas nos ensaios referentes aos pontos centrais (experimento 9-12), que indica que a condição ótima para a Celluclast 1.5L está próxima das condições desses pontos (pH ~ 4,8 e temperatura ~ 55 °C). O diagrama de Pareto (Figura 14) revela que tanto a temperatura como o pH tiveram forte influência na atividade enzimática, porém sob a forma quadrática (efeito BB e AA da figura 10). Os efeitos de interação (AB) e os principais (A e B) foram desprezíveis ao um nível de confiança de 95%.

Figura 14 - Diagrama de Pareto dos parâmetros avaliados no planejamento com 95% de confiança. A: pH; B: Temperatura.

Dessa forma, um modelo do tipo quadrático (equação 10), com fatores lineares, quadráticos e de interação, foi testado aos pontos experimentais. A análise de variância (Tabela 8) mostrou um bom ajuste dos dados obtidos no experimento ao modelo quadrático (coeficiente de correlação foi superior a 0,98). Além disso, também foi possível notar que os valores de F para T^2 e pH^2 foram bem superiores ao do F_{tabelado} (4,84), corroborando com o diagrama de Pareto (Figura 14), em que somente os fatores na forma quadrática tiveram efeito significativo sobre a atividade enzimática da Celluclast 1.5L. Os p-valores também confirmaram essa observação, T^2 e pH^2 foram os únicos que tiveram p-valor menor que 0,05 (Tabela 8).

$$A = -187,4538 + 70,5357 \cdot pH + 2,1952 \cdot T - 7,4281 \cdot pH^2 - 0,0021 \cdot pH \cdot T - 0,0199 \cdot T^2 \quad (10)$$

Sendo que: A: atividade enzimática (FPU/mL);
T: temperatura (°C).

Tabela 8 - Análise de Variância para a atividade total de Celluclast 1.5L.

Fonte de Variação	SQ	g.l.	MQ	F	p-valor
A	16,39	1	16,39	2,32	0,178622
B	0,05	1	0,05	0,01	0,939006
AA	2139,65	1	2139,65	303,05	0,000002
AB	0,05	1	0,05	0,01	0,936750
BB	2675,12	1	2675,12	378,89	0,000001
Erro	42,36	6	7,06		
Total	4077,38	11			

A: pH B: Temperatura $R^2 = 98,0952 \%$

SQ simboliza soma de quadrados, g.l. graus de liberdade e MQ média dos quadrados.

Para visualizar a região ótima dos parâmetros avaliados na atividade enzimática da Celluclast 1.5L um gráfico de superfície de resposta foi construído (Figura 15). Como observado na Tabela 7, as melhores condições de pH e temperatura estão em torno de 4,5 e 55°C, respectivamente. A projeção da superfície de resposta em um escala bidimensional (Figura 16) mostrou uma faixa ampla da condição ótima (pH entre 3,9 a 5,7 e temperatura entre 40 a 70 °C), ou seja, existe uma variação de pH ($\pm 0,7$) que pode ser admitida ao redor de 4,6 (valor ótimo) e de temperatura ($55 \pm 15^\circ\text{C}$) que mantém o processo na condição otimizada. Isso mostra que a enzima apresenta robustez em relação aos parâmetros pH e temperatura, já que variações de pH e temperatura não afetarão a eficiência da Celluclast 1.5L. A faixa obtida de condição ótima está corroborada com as condições experimentais sugeridas pela União Internacional de Química Pura e Analítica (UIPAC) nos procedimentos padrão para determinar atividades de celulases (**GHOSE, 1987**). Esse órgão sugere condição de pH 4,8 e de temperatura a 50 °C para o teste enzimático.

Para a enzima Novozym 188 (β -glicosidase) não foi realizado o estudo de investigação das condições ótimas de pH e temperatura, pois, durante a execução dessa investigação para a Celluclast 1.5, o Grupo do Laboratório de Bioquímica I do Departamento de Biotecnologia da Instituição recebeu um documento da empresa Novozymes S.A. fornecendo esses dados.

De acordo com documentos fornecidos pela Novozymes, a faixa de pH e temperatura ótima para a enzima Novozym 188 (β -glicosidase) é 2,5 a 6,5 e 45 a 70°C, respectivamente. Já para a enzima Celluclast 1.5 L, essa faixa é entre 4,5 a 6,5 para o pH e 45 a 70°C para a temperatura.

Figura 15 - Superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático da análise do planejamento experimental CCR da Celluclast 1.5L.

Figura 16 - Projeção da superfície de resposta gerada pelo modelo quadrático na análise do planejamento experimental CCR para a atividade enzimática da Celluclast 1.5L (FPU/mL).

5.2 Dados dos ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor

5.2.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

O bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado por explosão a vapor nas Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário. O material pré-tratado apresentou uma coloração amarronzada diferente do bagaço *in natura* que possui uma cor levemente amarelada (Figura 17). Essa mudança de cor provavelmente está associada com a quebra química da lignina e extrativos durante o pré-tratamento (**SUN et al., 2005b**). Além disso, essa coloração pode também ser relacionada com os produtos de degradação de açúcares que são gerados em temperaturas elevadas do pré-tratamento (caramelização dos açúcares).

Figura 17 - Foto do bagaço *in natura* (A) e do explodido a vapor (B).

Devido ao pré-tratamento do bagaço ser realizado em escala industrial, não foi possível obter o rendimento mássico da etapa. Entretanto, **Saad (2010)** desenvolveu um trabalho de modelagem da cinética do pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. Nesse trabalho há equações que descrevem a variação do rendimento em massa em função da temperatura e tempo do pré-tratamento. O rendimento estimado pelas equações de **Saad (2010)** para as condições de pré-tratamento empregado na Usina (200°C/7min) foi de 68%, valor considerado dentro da faixa encontrada por outros autores (**GLASSER; WRIGHT, 1998; KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998; SENDELIUS, 2005**). A análise de composição química do bagaço *in natura* e os pré-tratados por explosão a vapor (Tabela 9) revelou que grande parte da hemicelulose foi solubilizada. A concentração de poliose no bagaço reduziu para 8,9% após o pré-tratamento enquanto no bagaço *in natura* representava aproximadamente 26% da composição do material. Isso representa uma solubilização da hemicelulose em torno de 80% após o pré-tratamento (valores calculados

considerando o rendimento estimado do pré-tratamento em 68% - ver Tabela 10), ou seja, quase quatro vezes maior do que a perda de celulose (seletividade H/C de 3,88 - Tabela 10). Esses dados revelam que o pré-tratamento por explosão a vapor tem a característica de remover preferencialmente as hemiceluloses em relação à celulose. As duas principais causas para a remoção preferencial da hemicelulose no pré-tratamento por explosão a vapor são: o efeito de solubilização provocada pelos ácidos orgânicos liberados durante o pré-tratamento e a sua menor estabilidade térmica em relação à da celulose. Em temperatura elevadas, a cadeia principal da hemicelulose sofre quebra aleatória das suas ligações glicosídicas, facilitando a sua solubilização (quanto menor o grau de polimerização, maior a sua solubilidade) **(FENGEL; WEGENER, 1989)**.

Tabela 9 - Composição química (em porcentagem) do bagaço *in natura*, da pré-tratado por explosão a vapor e da polpa de bagaço pré-tratado.

Componente	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço pré-tratado ¹	Polpa bagaço pré-tratado ²
Rendimento		68,0% ³	59,1%
Celulose	44,0 ± 1	51,7 ± 0,6	90 ± 2
Hemicelulose	25,8 ± 0,8	8,9 ± 0,1	3,4 ± 0,3
Lignina	28,2 ± 0,8	34,3 ± 0,3	5,5 ± 0,2
Cinzas	1,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	1,4 ± 0,1
Total	99,2 ± 0,8	100,3 ± 0,4	99,9 ± 0,5

¹ Pré-tratamento por explosão a vapor realizado nas Usinas de Açúcar, Alcool e Biodiesel Vale do Rosário.

² Etapa de designificação realizado por extração alcalina convencional (NaOH 1% (m/v) em meio aquoso).

³ Rendimento estimado através da equação 5, considerando a solubilização de lignina nula (P=0).

Os ácidos orgânicos, liberados durante o pré-tratamento em função do vapor em alta temperatura, atacam as ligações glicosídicas dos carboidratos, reduzindo também o grau de polimerização da molécula **(OVEREND; CHORNET, 1987)**. Como a hemicelulose tem uma estrutura supramolecular amorfa e de maior acesso aos reagentes químicos do que a celulose **(FENGEL; WEGENER, 1989)**, a impregnação de vapor provoca hidrólise preferencialmente das hemiceluloses, removendo-a do material pré-tratado.

Apesar do teor de celulose elevar-se após o pré-tratamento (Tabela 9), considerando o rendimento da etapa, a perda do componente foi de 19,7% (Tabela 10), um valor bem menor comparado com o da hemicelulose, mas elevado para um processo de conversão de biomassa a etanol. Estudos mostram que a degradação da celulose inicia-se em temperaturas maiores que 170°C, sendo que quanto maior a temperatura do pré-tratamento, maior a velocidade de degradação **(GLASSER; WRIGHT, 1998; KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998; RAMOS, 2003;**

SENDELIUS, 2005; SILVA, 1995). No trabalho de **Silva (1995)**, a condição otimizada do pré-tratamento por explosão a vapor para o bagaço de cana foi 190°C por 15 min. Nessa condição, o autor obteve uma perda de celulose em torno de 14%. Infelizmente nas Usinas de Açúcar, Álcool e Biodiesel Vale do Rosário não foi possível reproduzir essa condição devido à distância da linha entre o reator e ciclone ser muito grande necessitando pressões maiores (temperatura maiores) para escoar o material lignocelulósico até o vaso separador (ciclone). O reator da Usina foi otimizado para se obter ração animal e não, obviamente, pré-tratar o bagaço para os fins deste trabalho. O pré-tratamento só poderia ser realizado nas condições de 200°C por 7 min. Entretanto, mesmo sob essas condições a perda de celulose na etapa de pré-tratamento ficou próxima da condição otimizada por **Silva (1995)**, 19,7% contra 14,0%.

Tabela 10 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e da polpa obtidas após extração alcalina.

Componente	Bagaço pré-tratado ¹	Polpa bagaço pré-tratada
Celulose	19,7%	- 2,4% (18%) ³
Hemicelulose	76,5%	77,7% (95%) ³
Lignina	-5,5%	90,6% (90%) ³
Seletividade H/C ²	3,88	-

¹ Perda/Solubilização calculada a partir do valor do rendimento estimado através das equações de **Saad (2010)**.

² Razão entre a solubilização de hemicelulose (H) e a perda de celulose (C).

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

Na Figura 18 encontram-se as micrografias eletrônicas de varredura (MEV) para o bagaço *in natura* e o explodido a vapor. A comparação entre os MEV desses materiais mostra que o pré-tratamento provoca uma grande desagregação da estrutura morfológica do bagaço *in natura*. Este último apresentou fibras de celulose altamente organizadas e alguns flocos de célula vegetal que corresponde às células de parênquima (células de forma achatada localizadas ao lado das fibras). Após o pré-tratamento, as fibras de celulose se desorganizaram e grande parte das células de parênquima desapareceu, mas algumas fibras ainda permaneceram intactas, da mesma forma que a do bagaço *in natura*. Assim, como já observados por outros autores (**GLASSER; WRIGHT, 1998; KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998; RAMOS, 2003; SENDELIUS, 2005**), o pré-tratamento por explosão a vapor mostra-se uma técnica bem adequada para a desagregação da estrutura morfológica do

bagaço de cana-de-açúcar, devendo somente avaliar quais as condições ótimas para reduzir a perda de celulose gerada no processo.

5.2.2 Deslignificação por extração alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas

O bagaço pré-tratado por explosão foi testado por duas vias diferentes de deslignificação, uma por extração alcalina convencional (NaOH 1% m/v em meio aquoso) e outra por deslignificação organosolv alcalina (etanol, NaOH e água). A primeira via tem a vantagem de ser energeticamente mais eficiente em relação ao processo organosolv, porém permite obter somente a fração rica em celulose, uma vez que a fração contendo lignina e hemicelulose são utilizados como combustíveis nos fornos de geração de energia do processo. Já o processo organosolv permite um uso integral do material lignocelulósico (separação das três frações: celulose, hemicelulose e lignina), viabilizando a produção de subprodutos de alto valor agregado, além da recuperação do solvente (**GARCÍA et al., 2011**).

O efeito dos dois tipos de deslignificação sobre as enzimas celulolíticas foi avaliado através da hidrólise enzimática das polpas obtidas. Em paralelo, o bagaço *in natura* e o pré-tratado também foram submetidos à hidrólise enzimática a fim de verificar o efeito de cada etapa sobre a conversão da celulose. Para esse tópico, serão apresentados os resultados da deslignificação por extração alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

A microscopia eletrônica de varredura da polpa de bagaço pré-tratado mostrou que a extração alcalina convencional provocou uma maciça desagregação das fibras de celulose (ver Figura 18). Essas fibras se encontram bem desorganizadas com alto grau de acessibilidade por enzimas ou reagentes químicos, diferenciando da estrutura morfológica verificada para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor que ainda apresentava algumas porções de fibras ordenadas paralelamente umas as outras.

O rendimento da extração alcalina convencional para o bagaço pré-tratado foi de 59,1%, proporcionando um decréscimo de 90,6% da lignina presente no bagaço explodido (Tabela 10). A polpa obtida apresentou um conteúdo de apenas 5,5% de lignina (ver Tabela 9). Além da lignina, a hemicelulose também foi solubilizada durante a deslignificação, cerca de 80% (Tabela 10), constituindo apenas 3,4% da polpa (Tabela 9). A celulose, por sua vez, não sofreu degradação, a perda calculada desse componente foi de - 2,4% (valor considerado não significativo devido aos erros pertinentes à técnica de determinação da composição química do material lignocelulósico). Esse valor de perda de celulose mostra que a condição empregada na extração alcalina é bem adequada ao bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (NaOH 1% (m/v), relação sólido-líquido 1:10 (m/v), agitação de 50 rpm,

temperatura de reação 100°C por 1 h), já que o componente principal do processo de conversão de biomassa em etanol, a celulose, não sofreu degradação.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 vezes, para o bagaço *in natura* (imagem superior), do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (imagem central) e da polpa de bagaço pré-tratado e deslignificado por extração alcalina convencional (imagem inferior).

Após a extração alcalina, a polpa obtida apresentou uma conversão enzimática de celulose de 76%, com testes realizados em baixo teor de sólidos (2% (m/v) - ver Tabela 11). Este valor é considerado bem maior do que o obtido para o bagaço pré-tratado (51,1%), revelando que a remoção de lignina favoreceu a digestibilidade de celulose para esse material lignocelulósico. Vários autores têm mostrado que a redução do conteúdo de lignina diminui o efeito de inibição das celulasas pela lignina (**GHARPURAY; LEE; FAN, 1983; GREGG; SADDLER, 1996; SINITSYN; GUSAKOV; VLASENKO, 1991**). Para que essas enzimas atuem sobre a celulose, elas precisam ser adsorvidas ao material lignocelulósico, e se elas forem adsorvidas sobre a lignina, elas são inativadas devido à ligação irreversível que ocorre entre os dois. Portanto, a etapa de remoção de lignina é de grande importância para se elevar a digestibilidade enzimática da celulose de bagaço de cana nos processos de conversão a etanol.

Outro fator que também deve ser avaliado em um processo de conversão de celulose, além do rendimento, é a concentração de açúcares no hidrolisado. O ideal seria obter rendimentos elevados e hidrolisados com alto teor de açúcares. A concentração de glicose nos hidrolisados obtidos (Tabela 11) não passou de 20 g/L para os testes em baixo teor de sólidos (2%). A maior concentração foi para o hidrolisado da polpa de bagaço pré-tratado (cerca de 15 g/L), um valor considerado baixo, já que este hidrolisado necessitaria de uma etapa de concentração para ser enviado à unidade de fermentação, elevando-se assim o custo do processo.

Tabela 11 - Dados do teste de conversão enzimática do bagaço *in natura*, pré-tratado por explosão a vapor e da polpa de bagaço pré-tratado após a extração alcalina convencional.

Material	Teor de Sólidos (% m/v)	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão celulose (%)
B. <i>in natura</i>	2	1,5 ± 0,1	15,0 ± 0,3
B. Explodido	2	5,9 ± 0,3	52 ± 2
Polpa bagaço pré-tratado	2	15,1 ± 0,1	76,0 ± 0,7
B. Explodido	10	26 ± 3	43,3 ± 0,4
Polpa bagaço pré-tratado	10	68 ± 1	66,6 ± 0,3

A condição empregada na hidrólise enzimática foi: 100 rpm de agitação orbital, temperatura de 45°C, carga de enzima de 15 FPU de Celluclast 1.5L e 10 UI de Novozym 188 por grama de material seco.

Então, com o objetivo de aumentar o conteúdo de glicose no hidrolisado, testes de conversão enzimática da celulose em alto teor de sólidos foram realizados, exceto

para o bagaço *in natura*, que possui baixo grau de empacotamento necessitando assim de relações sólido:líquido elevadas para que o meio líquido encubra o material. A concentração de glicose para o hidrolisado de bagaço pré-tratado e de polpa de bagaço pré-tratado passou de 5,9 e 15,1 para 26 e 68 g/L, respectivamente, alterando-se o teor de sólidos de 2 para 10% (Tabela 11). Isso mostra que a sacarificação com teores maiores de sólidos produzem concentrações mais elevadas de glicose, facilitando a etapa posterior de fermentação. Em contrapartida, ao se elevar o teor de sólidos na sacarificação enzimática, os rendimentos de conversão de celulose reduziram, 15,3% para o bagaço pré-tratado e 12,3% para a polpa de bagaço pré-tratado (ver Tabela 11). Essa queda de eficiência é provocada pelo acúmulo de açúcares liberados durante a hidrólise enzimática que inibem a ação das enzimas. Vários autores têm mostrado que as endo-glucanases e celobioidrolases são inibidas pelo aumento de concentração de celobiose e as β -glicosidases são mais sensíveis ao acúmulo de glicose (**CARA et al., 2006; GREGG; SADDLER, 1996; HOLTZAPPLE et al., 1990**). As formas de superar essa inibição das enzimas vão desde eliminar os açúcares do hidrolisado por ultrafiltração a realizar o teste de conversão enzimática no modo SSF ("*Simultaneous saccharification and fermentation*" – sacarificação e fermentação simultâneas) ou desenvolver enzimas mais tolerantes aos açúcares liberados durante a hidrólise enzimática. Nenhuma dessas formas foi avaliada no projeto.

5.2.3 Deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado por explosão a vapor e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas

O bagaço pré-tratado por explosão a vapor também foi deslignificado empregando etanol no licor de polpação, seguindo a metodologia descrita por **Hongzhang e Liying (2007)**. Como não existem trabalhos aplicando essa metodologia ao bagaço pré-tratado por explosão a vapor, as variáveis de processo como temperatura, tempo, relação sólido:líquido, concentração de NaOH e etanol, tiveram que ser investigadas através de um planejamento experimental baseado numa matriz de Taguchi L_{18} para verificar a influência de cada parâmetro sobre as etapas de deslignificação e conversão de celulose. Esse tipo de matriz de Taguchi foi escolhido devido à possibilidade de avaliar os fatores em três níveis com um número reduzido de experimentos, ao contrário dos planejamentos fatoriais de 3^n . Os fatores avaliados bem como as variáveis de resposta do planejamento se encontram na Tabela 12.

Tabela 12 - Matriz de Taguchi L₁₈ usada no planejamento experimental da deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Concentração de etanol e NaOH, temperatura, tempo e relação sólido:líquido são os fatores avaliados. A porcentagem de deslignificação e a conversão enzimática de celulose são as variáveis de resposta.

Ensaio	Etanol % (v/v)	T °C	Tempo min	NaOH % (m/v)	Relação S:L (m:v)	% deslig.	Conv. enz. celulose (%)	% etanol recuperado
1	40	100	30	0,1	1:10	46,4	45,9 ± 0,9	28,2
2	40	130	60	0,55	1:7,5	73,3	62 ± 1	27,5
3	40	160	90	1,0	1:5	71,8	67,1 ± 0,1	31,2
4	60	100	30	0,55	1:7,5	66,9	62,9 ± 0,7	55,3
5	60	130	60	1,0	1:5	68,3	57 ± 2	21,7
6	60	160	90	0,1	1:10	52,7	42 ± 2	63,7
7	80	100	60	0,1	1:5	40,9	38 ± 3	21,7
8	80	130	90	0,55	1:10	58,2	55 ± 1	66,8
9	80	160	30	1,0	1:7,5	68,0	57,6 ± 0,3	59,2
10	40	100	90	1,0	1:7,5	82,0	69,9 ± 0,4	60,3
11	40	130	30	0,1	1:5	41,2	44,8 ± 0,7	24,9
12	40	160	60	0,55	1:10	62,2	54 ± 1	42,9
13	60	100	60	1,0	1:10	74,7	63,8 ± 0,8	63,4
14	60	130	90	0,1	1:7,5	52,7	50 ± 1	38,0
15	60	160	30	0,55	1:5	72,4	70 ± 1	35,7
16	80	100	90	0,55	1:5	44,3	44 ± 2	25,2
17	80	130	30	1,0	1:10	75,0	68 ± 2	69,4
18	80	160	60	0,1	1:7,5	50,8	33,9 ± 0,9	49,8

De forma geral, a faixa escolhida para os fatores na deslignificação alcoólica alcalina foi bem adequada, já que houve uma grande variação da porcentagem de deslignificação (de 40 a 82%). Dentre os ensaios testados, o número 10 foi o que gerou o melhor resultado (ver Tabela 12). A condição de reação para esse ensaio foi: etanol 40% (v/v), NaOH 1% (m/v), relação sólido:líquido 1:7,5 (m/v), 100°C por 90 min. Entretanto, pela análise de efeito principal dos fatores sobre a porcentagem de deslignificação, a condição ótima para a faixa estudada é diferente (ver Figura 19). A concentração de etanol e a relação sólido:líquido seriam mais adequadas na condição do nível 2 (60% (v/v) e 1:7,5 (m/v), respectivamente), enquanto para a concentração de NaOH e a temperatura de reação seriam o nível 3 (1% (m/v) e 160°C, respectivamente). Já para o tempo de reação tanto o nível 1 como o 2 seriam apropriados, pois ambos tiveram o mesmo patamar de influência e, dessa forma, o tempo menor foi o escolhido (30 min). Nessa condição otimizada, sugerida pela análise de efeito principal dos fatores da Matriz de Taguchi, não foi possível obter a porcentagem de remoção de lignina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, já que nenhum dos 18 pontos da Matriz de Taguchi continha os fatores sob essas condições.

Figura 19 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A porcentagem de deslignificação foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

Na Figura 19 ainda é possível observar que o fator que teve a maior influência sobre a deslignificação foi a concentração de NaOH. Este fator apresentou a maior variação da porcentagem de deslignificação entre o primeiro e terceiro nível. Já os outros fatores tiveram uma variação menor do que a faixa de variação padrão (linhas vermelhas tracejadas na Figura 19) e semelhante aos fatores fantasmas (fator 1, 7 e 8), revelando realmente que não possuem influência sobre a variável de resposta. Os resultados da análise de variância (ANOVA) confirmam essa observação (Tabela 13). Para que um efeito seja significativo ao processo estudado, ele deve apresentar um p-valor menor que 0,05 ou um valor de F maior do que o F tabelado (**RODRIGUES; IEMMA, 2005**). Para essas condições somente o NaOH teve um p-valor menor do que 0,05 e F maior do que o F tabelado ($F_{\text{tab}}=4,74$, com 95% de grau de confiança). **Sarkanen (1990)**, em seu artigo clássico de polpação organosolv, comenta que o solvente não altera significativamente a reatividade da lignina comparado ao NaOH. O benefício do solvente está no aumento de solubilidade da lignina e na tendência de reduzir as reações de condensação dessa lignina. Dessa forma, a análise do planejamento experimental da deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado corrobora com as observações de **Sarkanen (1990)**, já que a soda cáustica foi o único fator que teve influência significativa à remoção de lignina.

El-Sakhawy et al. (1996) também observaram em seu estudo da polpação organosolv para palha de trigo que a concentração de álcali foi o parâmetro mais significativo sobre a deslignificação do material lignocelulósico. Os autores

compararam a polpação etanol-água com a etanol-NaOH-Antraquinona para a palha de trigo e observaram que a adição de NaOH provocou uma redução quatro vezes maior de lignina da palha de trigo.

Os outros fatores da deslignificação (Etanol, Temperatura, Tempo e Relação Sólido:Líquido) apresentaram valores da soma dos quadrados (SQ) próximos ou até inferiores aos dos fatores fantasmas (Tabela 13). Isso indica que os fatores Etanol, Temperatura, Tempo e Relação Sólido:Líquido não possuem influência sobre a variável de resposta do planejamento, já que provocam a mesma variância sobre a variável de resposta em relação ao erro do próprio planejamento (fatores fantasmas).

Tabela 13 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A porcentagem de deslignificação foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

Efeito	SQ ²	g.l. ²	MQ ²	F	p-valor
Fator1 ¹	[3,47]	[1]	-	-	-
Etanol	244,97	2	122,48	2,50	0,151
Temperatura	47,11	2	23,55	0,48	0,637
Tempo	9,55	2	4,77	0,10	0,908
NaOH	2026,15	2	1013,08	20,69	0,001
Relação S:L	261,99	2	130,99	2,68	0,137
Fator 7 ¹	[258,75]	[2]	-	-	-
Fator 8 ¹	[53,32]	[2]	-	-	-
Erro ³	342,67	7	48,95	-	-
Total ⁴	2932,54	18	-	-	-

¹ Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Os valores entre colchetes correspondem aos valores dos fatores fantasmas, indicados na tabela somente para efeito de comparação entre os fatores reais.

² SQ simboliza soma de quadrados, g.l. graus de liberdade e MQ média dos quadrados.

³ Erro calculado considerando os fatores fantasmas (fatores 1, 7 e 8).

⁴ Total calculado considerando os fatores reais mais o erro.

Uma das grandes vantagens da polpação organosolv é a possibilidade de recuperar o solvente utilizado no processo, além dos subprodutos de alto valor agregado que são gerados (**AZIZ; SARKANEN, 1989; HONGZHANG; LIYING, 2007; SARKANEN, 1990; STROCKBURGER, 1993**). A recuperação de etanol nos ensaios de deslignificação do bagaço pré-tratado ficou entre 22 a 70%. As análises de variância (ANOVA) e dos efeitos principais apontaram somente a relação sólido:líquido como um fator significativo para a recuperação de etanol. Somente esse fator teve o p-valor menor que 0,05 e o valor de F maior que o F_{tabelado} (4,74), em um nível de confiança de 95% (Tabela 14). Os outros fatores do planejamento apresentaram

valores de soma de quadrados (SQ) próximos ou inferiores aos dos fatores fantasmas (Tabela 14), comprovando que os fatores do planejamento, exceto a relação sólido:líquido, não possuem influência sobre a variável de resposta recuperação de etanol. Esses fatores provocam a mesma variância sobre a variável de resposta em comparação com os fatores fantasmas.

Figura 20 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da designificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A recuperação de etanol foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

A relação sólido:líquido 1:10 foi a que obteve a maior média de recuperação do solvente, em torno de 56% (nível 1 na Figura 20). Portanto, de acordo com essas informações obtidas, para se elevar a recuperação de solvente numa etapa de designificação organosolv de bagaço de cana é necessário utilizar relações sólido:líquido mais elevadas. E isso fica claro nos trabalhos de **Hongzhang e Liying (2007)**, os quais avaliaram o fracionamento limpo de palha de trigo explodida a vapor através da designificação etanol-água. Os autores conseguiram recuperar cerca de 85% do etanol utilizado no processo empregando uma relação sólido:líquido de 1:50 (m/v). Relações sólido:líquido elevadas tendem a diminuir a perda de etanol por causa do grande volume de licor utilizado na polpação. Entretanto, considerando a recuperação média de solvente de 56% para a relação sólido:líquida 1:10 e a concentração de etanol média do planejamento de 60%, a perda de solvente foi de 2,6 L para cada quilograma de lignocelulósico a ser designificado, enquanto que nos trabalhos de **Hongzhang e Liying (2007)**, que utilizaram uma relação sólido:líquido de 1:50 e concentração de etanol de 40%, a recuperação de solvente foi de 85%

correspondendo a uma perda de solvente de 3,0 L para cada quilograma de lignocelulósico a ser deslignificado. Isso mostra que em termos de perda absoluta, o nosso trabalho teve uma perda de solvente 15% menor em relação aos dos autores supracitados, embora a nossa porcentagem de recuperação de solvente ser baixa.

Tabela 14 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A recuperação de etanol foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

Efeito	SQ ²	g.l. ²	MQ ²	F	p-valor
Fator1 ¹	[65,59]	[1]	-	-	-
Etanol	561,89	2	280,94	2,33	0,167
Temperatura	112,25	2	56,12	0,47	0,646
Tempo	313,56	2	156,78	1,30	0,331
NaOH	537,62	2	268,81	2,23	0,180
Relação S:L	2723,06	2	1361,53	11,30	0,006
Fator 7 ¹	[554,26]	[2]	-	-	-
Fator 8 ¹	[2,64]	[2]	-	-	-
Erro ³	843,26	7	120,47		
Total ⁴	5091,64	18	-	-	-

¹ Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Os valores entre colchetes correspondem aos valores dos fatores fantasmas, indicados na tabela somente para efeito de comparação entre os fatores reais.

² SQ simboliza soma de quadrados, g.l. graus de liberdade e MQ média dos quadrados.

³ Erro calculado considerando os fatores fantasmas (fatores 1, 7 e 8).

⁴ Total calculado considerando os fatores reais mais o erro.

Após a deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado, as polpas obtidas foram testadas quanto à conversão enzimática da celulose em alta concentração de sólidos [relação sólido:líquido 1:10 (m/v)]. Os rendimentos de conversão para as polpas do planejamento ficaram entre 34 a 70% (ver Tabela 12), sendo que os melhores resultados foram para as polpas que sofreram maior remoção de lignina (ensaios 3, 10, 15 e 17). Um gráfico foi gerado entre o teor de lignina das polpas versus as suas respectivas conversões enzimáticas de celulose (Figura 21). Nele pôde-se observar que há uma correspondência linear entre esses parâmetros, confirmando o efeito negativo que a lignina causa sobre a digestibilidade enzimática de celulose (BERLIN et al., 2006; GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006, ÖHGREN et al., 2007).

Figura 21 - Gráfico da porcentagem de conversão de celulose em função do teor de lignina da polpa obtida após a deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão.

A análise de efeito principal dos fatores da deslignificação organosolv sobre a conversão enzimática da celulose (Figura 22) revelou que para alguns fatores do planejamento as condições mais adequadas foram diferentes das observadas na análise de efeito principal sobre a porcentagem de deslignificação (Figura 19). As condições mais apropriadas seriam concentração de etanol no nível 2 (60%), temperatura no nível 2 (130°C), tempo no primeiro nível (30 min), concentração de NaOH no nível 3 (1%) e relação sólido:líquido no nível 2 [1:7,5 (m/v)]. Essa combinação de condições das variáveis também não foi verificada em nenhum dos 18 pontos da Matriz de Taguchi.

O parâmetro que teve maior efeito sobre a conversão de celulose foi a concentração de NaOH. A digestibilidade da celulose da polpa variou entre 42% a 64% com o aumento do teor da soda cáustica (de 0,1%, nível 1, para 1%, nível 3 - Figura 22). A análise de variância (ANOVA) também refletiu esses resultados. Somente a concentração de NaOH apresentou p-valor abaixo de 0,05. O valor de F para esse fator foi três vezes maior do que o F_{tabelado} (4,74), em um nível de confiança de 95% (ver Tabela 15). Os outros fatores do planejamento, exceto a concentração de etanol, apresentaram valores de soma de quadrados (SQ) próximos ou inferiores aos dos fatores fantasmas (Tabela 15), comprovando assim que os fatores temperatura, tempo e relação sólido:líquido não possuem influência sobre a variável de resposta conversão de celulose. Esses fatores provocam a mesma variância sobre a variável de resposta em comparação com os fatores fantasmas.

Figura 22 - Análise do efeito principal dos fatores do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A conversão enzimática da celulose foi a variável de resposta dessa análise. Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

O fator concentração de etanol apresentou um valor de soma de quadrado (SQ) superior aos dos fatores fantasmas, mostrando aparentemente que esse fator possui influência sobre a variável de resposta. Entretanto, a variância provocada pelo fator não foi suficiente para ser considerado significativo através do teste F da tabela ANOVA (Tabela 15). O seu valor de F (3,33) foi menor que o F_{tabelado} (4,74), em um nível de confiança de 95%.

O efeito da concentração de álcali sobre a conversão de celulose é reflexo da remoção da lignina. Como pôde ser visto na Figura 19, quanto maior a concentração de NaOH maior foi a deslignificação do material lignocelulósico e, conseqüentemente, menor será o efeito de inibição das enzimas celulolíticas pela lignina (**BERLIN et al., 2006; GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006, ÖHGREN et al., 2007**). Na Figura 21 ficou bem evidente o efeito negativo da lignina. As maiores conversões de celulose foram obtidas para as polpas com menor conteúdo de lignina. Portanto, como a conversão de celulose depende fortemente da deslignificação do lignocelulósico, os efeitos dos fatores do planejamento experimental foram similares para as duas variáveis de respostas.

Dentro do propósito do planejamento de experimentos, que era avaliar a influência de cinco parâmetros sobre a deslignificação organosolv do bagaço de cana e a sua conversão de celulose, verificou-se que a concentração de NaOH foi o único fator relevante. Os outros parâmetros como temperatura, tempo, relação sólido:líquido e

concentração de etanol não tiveram, dentro da faixa estudada no planejamento, influência significativa na remoção da lignina. A relação sólido:líquido somente apresentou influência na recuperação de etanol. Na conversão de celulose, a deslignificação do material lignocelulósico foi fundamental para se obter teores elevados de açúcares fermentáveis.

Tabela 15 - Análise de variância do planejamento experimental da deslignificação alcoólica alcalina para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor. A conversão enzimática da celulose foi a variável de resposta dessa análise. Tipo de análise: maximizar razão S/N média.

Efeito	SQ ²	g.l. ²	MQ ²	F	p-valor
Fator1 ¹	[4,98]	[1]	-	-	-
Etanol	259,13	2	129,57	3,33	0,231
Temperatura	13,66	2	6,83	0,18	0,851
Tempo	139,73	2	69,86	1,79	0,358
NaOH	1470,97	2	735,49	18,88	0,050
Relação S:L	20,01	2	10,01	0,26	0,796
Fator 7 ¹	[142,34]	[2]	-	-	-
Fator 8 ¹	[47,93]	[2]	-	-	-
Erro ³	273,13	7	39,02		
Total ⁴	2176,44	18	-	-	-

¹ Fatores 1, 7 e 8 representam os fatores fantasmas. Os valores entre colchetes correspondem aos valores dos fatores fantasmas, indicados na tabela somente para efeito de comparação entre os fatores reais.

² SQ simboliza soma de quadrados, g.l. graus de liberdade e MQ média dos quadrados.

³ Erro calculado considerando os fatores fantasmas (fatores 1, 7 e 8).

⁴ Total calculado considerando os fatores reais mais o erro.

O planejamento empregado nesse trabalho tinha o objetivo de verificar a influência de cinco parâmetros de processo sobre a etapa de deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor, já que não há muitos trabalhos desenvolvidos nessa área. Entretanto, o uso da metodologia de Taguchi para planejamento de experimentos, além de possibilitar essa verificação, ela indica também, dentro da faixa estudada no planejamento, as condições mais adequadas dos fatores para conseguir maximizar ou minimizar as variáveis de resposta (**ROSS, 1991**). Essas informações são úteis para o analista de experimento se orientar nas condições de novos experimentos, mas vale ressaltar que para encontrar a região da condição ótima do processo é necessário um estudo mais aprofundado aplicando-se outras técnicas de planejamento de experimentos.

Após a análise dos dados de um planejamento de experimentos, testes de confirmação devem ser realizados para validar as conclusões do experimento. Para a

variável de resposta, conversão de celulose, os resultados da Matriz de Taguchi indicaram a seguinte condição: etanol 60% (v/v), temperatura 130°C, tempo de 30 min, NaOH 1% (m/v) e relação sólido:líquido 1:7,5 (m:v). Nenhum dos 18 pontos avaliados na matriz conteve essa combinação entre os níveis dos fatores. Portanto, um ensaio de deslignificação sob essas condições foi realizado para verificar se realmente é a condição mais adequada para maximizar a conversão de celulose sugerida pela análise de dados do planejamento. Os resultados desse ensaio se encontram na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados das variáveis de respostas do ensaio de deslignificação organosolv na condição mais adequada sugerida pela análise dos dados do planejamento [etanol 60% (v/v), temperatura 130°C, tempo de 30 min, NaOH 1% (m/v) e relação sólido:líquido 1:7,5 (m:v)].

Variável de Resposta	Valor
% deslignificação	74,1%
Conversão de celulose	62 ± 1 %
% etanol recuperado	45,0 %

Nessa condição, os valores obtidos para as três variáveis de resposta do planejamento foram inferiores a alguns pontos da Matriz de Planejamento de Taguchi. A deslignificação do bagaço pré-tratado por explosão a vapor nas condições do ponto 10 foi de 82,2% (Tabela 12) enquanto que na condição do ponto otimizado, apenas 74,1% (Tabela 16). A conversão de celulose foi de 62% para esta condição enquanto para os pontos 10 e 15 a conversão passou de 70%. A recuperação de etanol foi de apenas 45% enquanto alguns pontos chegaram a quase 70% (ponto 17 – ver Tabela 12). Isso mostra que a condição mais adequada sugerida após a análise dos dados do planejamento não correspondeu em melhores resultados para as variáveis de respostas, indicando que modelo aplicado não foi adequado. Isso pode ser reflexo da falta de análise de influência de interações entre os fatores. A Matriz L_{18} de Taguchi não permite avaliar fatores de interações (**ROSS, 1991**), o que pode ter introduzido erros ao modelo utilizado para análise dos resultados do planejamento. Dessa forma, seria necessário então realizar outro ciclo de experimentos com tipos de arranjos de experimentos diferentes para verificar se há ou não efeito de interações entre os fatores, além de buscar a região da condição ótima da deslignificação.

Em vista dos resultados acima, nota-se que a adição do etanol ao meio reacional da deslignificação organosolv do bagaço pré-tratado por explosão a vapor não proporcionou melhorias significativas à remoção da lignina e, em consequência, à digestibilidade da celulose. Os dados das análises do planejamento indicam que somente é necessário o NaOH como agente deslignificante, ou seja, uma simples

extração alcalina. Além disso, comparando os dados de conversão enzimática da celulose das polpas obtidas tanto por extração alcalina convencional como por organosolv, verifica-se que as digestibilidades da celulose, em ambos os processos, foram semelhantes (em torno de 65%, compare Tabela 11 e Tabela 12). Portanto, para todos os testes seguintes de hidrólise enzimática da celulose, o material pré-tratado foi deslignificado somente através de extração alcalina convencional, não se optou mais pela deslignificação organosolv.

5.3 Dados dos experimentos realizados com palha de cana pré-tratada hidrotermicamente

5.3.1 Pré-tratamento Hidrotérmico

O primeiro teste de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana foi realizado sob a condição de 190°C por 15 min, corresponde à condição otimizada por **Silva (1995)** para pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar. Essa condição foi escolhida como ponto de partida na investigação do efeito do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana.

Os dados de composição química da palha *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente se encontram na Tabela 17. De forma geral, o pré-tratamento hidrotérmico da palha provocou uma grande solubilização das hemiceluloses (92,4% - Tabela 18). **Overend e Chornet (1987)** explicam que a temperatura elevada (gerado pelo vapor) é responsável pela ruptura das ligações químicas dos componentes da biomassa, enquanto a mudança morfológica do material é ocasionada pela forças mecânicas geradas na explosão do material. Como a palha foi pré-tratada somente através da impregnação do vapor (alta temperatura), espera-se que as maiores modificações ocorreram na composição química da palha.

Tabela 17 - Composição química (em porcentagem) da palha *in natura*, da pré-tratada hidrotermicamente a 190°C/15 min e da polpa de palha pré-tratada.

Componente	Palha <i>in natura</i> ¹	Palha pré-tratada	Polpa palha pré-tratada
Rendimento	-	47,1%	50,0%
Celulose	40,5 ± 0,2	61,4 ± 0,4	79,0 ± 0,1
Hemicelulose	31,0 ± 0,3	5,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Lignina	25,7 ± 0,2	32,4 ± 0,2	15,5 ± 0,1
Cinzas	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Total	99,7 ± 0,3	100,7 ± 0,7	100,1 ± 0,3

¹ Composição da palha *in natura* isenta de extrativos.

Tabela 18 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotêrmicamente a 190°C/15 min e das polpas obtidas após extração alcalina.

Componente	Palha pré-tratada	Polpa palha pré-tratada
Celulose	28,6%	35,7% (54%) ¹
Hemicelulose	92,4%	65,6% (97%) ¹
Lignina	40,6%	76,1% (86%) ¹

¹ Valores em parênteses representam as perdas/solubilizações totais associadas ao pré-tratamento com vapor e à etapa de deslignificação.

A análise das micrografias eletrônicas de varredura entre a palha *in natura* e a pré-tratada hidrotêrmicamente (Figura 24) revelou que este tipo de pré-tratamento provocou mudanças morfológicas na palha, porém as fibras de celulose ainda permaneceram bem agrupadas. A palha *in natura* apresentou uma estrutura morfológica muito compacta, fechada e organizada, do tipo "wafer" (várias camadas planas de fibras de celulose sobrepostas umas as outras), além da presença de estômatos, poros distribuídos ao longo da palha *in natura*. Já a palha pré-tratada mostrou uma estrutura mais fragmentada, sem estômatos e com aglomerações de várias fibras de celulose bem ordenadas, divergindo da afirmação de **Overend e Chornet (1987)** que são as forças mecânicas geradas pela explosão do material lignocelulósico as responsáveis pela desorganização das fibras de celulose em pré-tratamentos por explosão a vapor. Os autores explicam que quando o material lignocelulósico é pré-tratado somente por vapor, a maioria das modificações no material ocorre na sua estrutura química provocada pela ação dos ácidos orgânicos liberados em altas temperaturas. No entanto, a micrografia da palha pré-tratada com vapor mostrou claramente que a o pré-tratamento hidrotérmico também provoca alterações na estrutura morfológica do lignocelulósico.

Considerando o rendimento do pré-tratamento (47,1%) notou-se que a celulose teve uma degradação de 28,6% enquanto a lignina teve uma solubilização de 40,6% (Tabela 18). Esses valores provavelmente foram provocados ou pelo longo tempo da rampa de aquecimento do reator (55 min) ou pela condição do pré-tratamento (190°C por 15 min), ou ainda por ambos os fatores.

Figura 23 - Rampa de aquecimento do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana. Condições: 190°C/15 min.

Analisando o perfil da rampa de aquecimento do pré-tratamento hidrotérmico (Figura 23), notou-se que o tempo de permanência na temperatura de reação foi de mais de 20 min. A celulose em temperatura elevada (acima de 170°C) sofre reações de ruptura na sua cadeia polimérica, diminuindo o seu grau de polimerização, além de sofrer também reações de degradação (desidratação dos açúcares levando a hidroximetilfurfural) (**FENGEL; WEGENER, 1989**). Estas reações são indesejáveis aos processos de conversão de biomassa a etanol, já que diminuem o rendimento global do processo. Com isso, para reduzir a perda de celulose é necessário testar outras condições de reação, bem como tentar diminuir o tempo da rampa de aquecimento, como, por exemplo, injeção direta de vapor superaquecido no interior do reator, aquecendo o material lignocelulósico instantaneamente.

Em função da elevada perda de celulose (28,6%) que o pré-tratamento hidrotérmico sob a condição 190°C/15 min provocou na palha, outras condições foram investigadas com o intuito de minimizar essa perda de celulose. As outras quatro condições avaliadas foram: 180°C, 185°C, 190°C e 195°C por 10 min. Os dados de caracterização química das palhas pré-tratadas nessas condições se encontram na Tabela 19.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 e 300 vezes, para a palha *in natura* (imagem superior), da palha pré-tratada hidrotérmicamente (imagem central) e da polpa de palha pré-tratada e designificada por extração alcalina convencional (imagem inferior).

Tabela 19 - Composição química (em porcentagem) da palha *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente em diversas condições de pré-tratamento.

Componente	Palha <i>in natura</i> ¹	Condição do Pré-tratamento				
		180°C 10 min	185°C 10 min	190°C 10 min	195°C 10 min	190°C 15 min ²
Rendimento	-	55,0%	52,1%	48,5%	47,7%	47,1%
Celulose	40,5 ± 0,2	55,7 ± 0,1	59,1 ± 0,2	61,7 ± 0,1	62,2 ± 0,2	61,4 ± 0,4
Hemicelulose	31,0 ± 0,3	13,9 ± 0,3	9,6 ± 0,2	4,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	5,0 ± 0,1
Lignina	25,7 ± 0,2	27,9 ± 0,1	28,7 ± 0,3	30,7 ± 0,2	32,3 ± 0,1	32,4 ± 0,2
Cinzas	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Total	99,7 ± 0,3	100,0 ± 0,3	99,9 ± 0,2	99,8 ± 0,2	100,5 ± 0,5	100,7 ± 0,1

¹ Composição da palha *in natura* isenta de extrativos.

² Dados do pré-tratamento hidrotérmico na condição de 190°C/15 min da Tabela 17 a fim de facilitar a comparação com os resultados das outras condições avaliadas.

Na Tabela 19 pode-se notar também que quanto maior a temperatura do pré-tratamento menor foi o rendimento da etapa. Nas quatro novas condições de pré-tratamento com vapor avaliadas (180°C, 185°C, 190°C e 195°C por 10 min) cerca de 50% da massa inicial de palha foi solubilizada, sendo que a grande maioria corresponde à solubilização da hemicelulose, quase três vezes maior do que a perda de celulose (vejam os valores de seletividade H/C da Tabela 20). Em termos de porcentagem, a solubilização de hemicelulose para a condição mais amena do projeto (180°C/10 min) foi de 75%, enquanto em condições mais severas, esse valor passou de 90% chegando ao máximo de 94,6% na condição de pré-tratamento de 195°C/10min (Tabela 20). Esse efeito de solubilização da hemicelulose pela ação do vapor ocorre devido à ruptura dos grupos acetil presentes nas hemiceluloses desencadeando a autohidrólise das ligações glicosídicas dos carboidratos e pelo próprio efeito da temperatura sobre as cadeias de hemicelulose. **Maloney et al. (1985)** demonstraram em seus estudos de cinética de hidrólise de hemicelulose de "paper birch" (*Betula papyrifera*) que a remoção dos grupos acetilas ocorre preferencialmente a baixas temperaturas entre 100°C a 130°C, enquanto a taxa de remoção de xilana se faz a temperaturas entre 150°C a 170°C. Já para a palha de cana observou-se que, de acordo com os resultados da Tabela 20, a remoção de xilana ocorre preferencialmente a partir de 180°C, chegando a um valor máximo em 195°C. Essa remoção de hemicelulose pode facilitar a ação das enzimas celulolíticas na etapa posterior de sacarificação, já que essa estrutura forma uma barreira física ao redor da celulose impedindo o acesso das enzimas às fibras de celulose (**ÖHGREN et al., 2007**). Com isso, espera-se que as palhas pré-tratadas que tiveram os menores teores de hemicelulose terão as maiores conversões de celulose a açúcares fermentáveis, ou seja, as palhas pré-tratadas em temperatura superiores a 190°C.

Tabela 20 - Perda/Solubilização dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotermicamente considerando somente o rendimento mássico da etapa.

Componente	Condição do Pré-tratamento				
	180°C 10 min	185°C 10 min	190°C 10 min	195°C 10 min	190°C 15 min ¹
Celulose	24,3%	23,9%	26,1%	26,8%	28,6%
Hemicelulose	75,4%	83,8%	92,3%	94,6%	92,4%
Lignina	40,3%	41,9%	42,1%	40,1%	40,6%
Seletividade H/C ²	3,10	3,50	3,54	3,53	3,23
Seletividade L/H ³	0,53	0,50	0,46	0,42	0,42

¹ Dados do pré-tratamento hidrotérmico na condição de 190°C/15 min da Tabela 18 adicionados na tabela acima a fim de facilitar a comparação entre os resultados das outras condições avaliadas.

² Razão entre a solubilização de hemicelulose (H) e da perda de celulose (C).

³ Razão entre as solubilizações de lignina (L) e de hemicelulose (H).

Para as condições de pré-tratamento hidrotérmico de palha avaliadas nesse trabalho foi observada que a temperatura não possui um efeito significativo na degradação da celulose e lignina (Tabela 20). Ambos os componentes apresentaram uma variação muito estreita nos seus valores de degradação. A solubilização de lignina foi de $(41 \pm 1)\%$ enquanto a perda de celulose $(26 \pm 2)\%$. Isso mostra que ambos os componentes macromoleculares apresentam um limite para remoção/degradação.

Para a celulose, isso ocorre devido esse componente possuir duas regiões estruturais com reatividades diferentes: cristalina e amorfa. A região de celulose cristalina, em que as microfibrilas estão altamente organizadas, possui uma elevada resistência à hidrólise química e/ou enzimática, enquanto, a região de celulose amorfa, em que as microfibrilas estão desordenadas, as taxas de hidrólise são bem maiores (**FENGEL; WEGENER, 1989**). Portanto, a perda de celulose de 26% provocada pelo pré-tratamento hidrotérmico deve corresponder à degradação da região de celulose amorfa. A análise de raio-X da palha *in natura* revelou que apenas 43% da celulose estão na forma cristalina, mostrando que a maior parte da celulose de palha de cana é do tipo amorfa, mais suscetível a reações de degradação.

A seletividade hemicelulose/lignina (H/L) das palhas pré-tratadas reduziu com o aumento da temperatura (severidade) do pré-tratamento (Tabela 20). Como as solubilizações de lignina dessas palhas ficaram próximas (em torno de 41%), a diminuição observada para a seletividade H/L refletiu o aumento de solubilização da hemicelulose (note que a solubilização de hemicelulose se elevou com o aumento da temperatura do pré-tratamento – Tabela 20). Para explicar a solubilização semelhante de lignina entres as palhas pré-tratadas hidrotermicamente, foram levantadas duas hipóteses:

- Os ácidos liberados durante o pré-tratamento hidrotérmico conseguiram clivar somente ligações do tipo α -O-4 e β -O-4 da estrutura macromolecular da lignina

(**OVEREND; CHORNET 1987; RAMOS, 2003**), permanecendo os fragmentos de lignina unidos por ligação do tipo C-C, mais resistentes à temperatura do pré-tratamento (**FENGEL; WEGENER, 1989**). Portanto, mesmo elevando a temperatura do pré-tratamento, a energia não é suficiente para clivar os fragmentos de lignina unidos por ligação C-C, atingindo assim o limite de solubilização da lignina que correspondeu a 41% (Tabela 20).

- Apesar da temperatura dos pré-tratamentos serem diferentes, a longa rampa resfriamento permitiu a continuação das reações de condensação dos fragmentos de lignina solúvel ou de grupos fenólicos provenientes dos extrativos, depositando-se sobre as fibras do lignocelulósico e elevando o teor de lignina residual no mesmo (**SAAD, 2010**). Como o tempo da rampa de resfriamento foi longo e semelhante para todas as condições do pré-tratamento (Figura 25), esse tempo pode ter sido o suficiente para que a deposição de pseudo-lignina seja a máxima em cada condição avaliada do pré-tratamento, ou seja, que a concentração de lignina residual estabilize num patamar para todas as polpas. Na Figura 26 pode ser verificado o efeito da temperatura e tempo sobre a degradação da lignina no pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. Para tempos de reações elevados (>15 min), a concentração de lignina residual tende a um valor limite (patamar). Usando a mesma base de cálculo de **Saad (2010)**, em que corrige o conteúdo de lignina em função do rendimento do pré-tratamento, o teor de lignina residual das palhas pré-tratadas foi de 15,3, 14,9, 14,9, 15,4 e 15,3 % para as palhas pré-tratadas na condições de 180°C/10min, 185°C/10min, 190°C/10min, 195°C/10min e 190°C/15min, respectivamente. Isso mostra que todas as palhas pré-tratadas atingiram o limite de concentração de lignina residual.

Figura 25 - Rampa de aquecimento e resfriamento para os pré-tratamentos hidrotérmicos da palha de cana-de-açúcar.

Figura 26 - Simulação do modelo de degradação da lignina (mecanismo F) devido ao pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor (SAAD, 2010).

Para o pré-tratamento hidrotérmico da palha na condição de 190°C/15 min foi discutido que a alta perda de celulose na palha pré-tratada poderia ser provocada ou pela longa rampa de aquecimento do reator utilizado (REG-MED AU/E-20) ou pela severa condição do pré-tratamento avaliado (190°C/10 min). Com os resultados obtidos de perda de celulose para as novas condições de pré-tratamento hidrotérmico, verificou-se que a hipótese da condição severa do pré-tratamento deve ser descartada, pois mesmo empregando a condição mais amena do projeto (180°C/10

min), a degradação de celulose ainda foi elevada (24,3% - Tabela 20). Portanto, a perda de celulose observada no pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana deve estar associado à primeira hipótese levantada, ou seja, a longa rampa de aquecimento do reator. Para avaliar somente essa influência, novos ensaios foram projetados, utilizando o mesmo reator, mas de uma forma em que o tempo de permanência na temperatura desejada fosse próximo de zero, isto é, elevou-se a temperatura do reator até o valor esperado e desligou-se imediatamente o aquecimento. As análises de composição química das palhas pré-tratadas e suas respectivas perdas/solubilizações de componentes macromoleculares se encontram na Tabela 21 e Tabela 22.

Tabela 21 - Composição química (em porcentagem) da palha *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente em diversas condições de pré-tratamento.

Componente	Palha <i>in natura</i> ¹	Condição do Pré-tratamento			
		180°C 0 min	185°C 0 min	190°C 0 min	195°C 0 min
Rendimento	-	70,3%	66,4%	60,6%	44,6%
Celulose	40,5 ± 0,2	42,9 ± 0,1	45,3 ± 0,3	47,6 ± 0,4	60,7 ± 0,2
Hemicelulose	31,0 ± 0,3	26,9 ± 0,2	24,4 ± 0,1	21,8 ± 0,2	10,8 ± 0,1
Lignina	25,7 ± 0,2	27,7 ± 0,2	26,9 ± 0,1	27,3 ± 0,1	26,5 ± 0,1
Cinzas	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	3,4 ± 0,6	3,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Total	99,7 ± 0,3	100,0 ± 0,2	100,0 ± 0,4	100,1 ± 0,3	100,0 ± 0,1

¹ Composição da palha *in natura* isenta de extrativos.

Analisando os rendimentos mássicos do pré-tratamento hidrotérmico com $t = 0$ min, notou-se que a perda total de material da palha, para as temperaturas de 180, 185 e 190°C, foi bem menor quando comparado com os rendimentos do pré-tratamento com $t = 10$ min (comparar Tabela 19 e Tabela 21). Enquanto os rendimentos do pré-tratamento com $t = 10$ min ficaram abaixo de 55%, para os pré-tratamentos somente com a rampa de aquecimento, os rendimentos passaram de 60% chegando até 70,3% para a condição de 180°C. Isso mostra que o tempo de reação na temperatura desejada do pré-tratamento influencia fortemente a solubilização dos componentes macromoleculares da palha de cana. Quanto maior for esse tempo de reação, menor será o rendimento da etapa (**LASER et al., 2002; MONIRUZZAMAN, 1996; SASAKI; ADSHIRI; ARAI, 2003; SUN et al., 2005a e b).**

Para a temperatura de 195°C o rendimento mássico do pré-tratamento com $t = 0$ min foi menor que o do pré-tratamento com 10 min, o que não era esperado, já que o tempo de exposição da palha na temperatura do primeiro pré-tratamento foi menor.

Provavelmente falhas na determinação do rendimento mássico dessa etapa devem ter sido ocorridas, diminuindo o seu valor.

Tabela 22 - Perda/Solubilização (em porcentagem) dos componentes macromoleculares das palhas pré-tratadas hidrotermicamente ($t = 0$ min) considerando somente o rendimento mássico da etapa.

Componente	Condição do Pré-tratamento			
	180°C 0 min	185°C 0 min	190°C 0 min	195°C 0 min
Celulose	25,7%	25,9%	28,8%	33,2%
Hemicelulose	39,0%	47,4%	57,5%	84,6%
Lignina	24,1%	30,4%	35,6%	54,1%

Avaliando as solubilizações de hemicelulose entre os pré-tratamentos hidrotérmicos com $t = 0$ min e $t = 10$ min, verificou-se que a remoção da hemicelulose da palha de cana é fortemente influenciada pelo efeito combinado da temperatura e do tempo do pré-tratamento com vapor (compare Tabela 20 e Tabela 22). Em ambas as tabelas se notam que as solubilizações de hemicelulose aumentaram com a elevação da temperatura e do tempo do pré-tratamento.

Já para a lignina, observou-se que após um determinado tempo de pré-tratamento, a remoção de lignina atinge um patamar, não passando desse valor mesmo elevando-se a temperatura do pré-tratamento. Para os ensaios somente com a rampa de aquecimento ($t = 0$ min), a temperatura do pré-tratamento influenciou diretamente a remoção de lignina, quanto maior a temperatura, maior foi a deslignificação da palha de cana (ver Tabela 22). Já para os ensaios com $t = 10$ min, a temperatura não provocou alteração na porcentagem de extração de lignina, em todos os ensaios, a porcentagem de deslignificação não passou de 43% (ver Tabela 22). Como explicado anteriormente, as condições do pré-tratamento não são suficientes para clivar os fragmentos de lignina unidos por ligações do tipo carbono-carbono, somente os fragmentos unidos por ligações do tipo β -O-4 e α -O-4. Portanto, a solubilização da lignina sempre atingirá um valor limite, mesmo elevando a temperatura ou tempo do pré-tratamento com vapor.

As perdas de celulose para as palhas pré-tratadas hidrotermicamente somente com a rampa de aquecimento ficaram próximas das observadas para o pré-tratamento com $t = 10$ min (compare Tabela 20 e Tabela 22). Isto comprova a hipótese levantada de que a elevada perda de celulose da palha de cana no pré-tratamento com vapor seria provocada pela longa rampa de aquecimento do reator utilizado. Somente o aquecimento da rampa já proporciona uma perda em torno de 28% na celulose, próximo do valor obtido com o pré-tratamento com $t = 10$ min, 26%.

5.3.2 Deslignificação por extração alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente e sua digestibilidade às enzimas celulolíticas

A palha pré-tratada hidrotermicamente na condição 190°C/15 min foi deslignificada no mesmo reator do pré-tratamento (REG MED AU/E-20). O rendimento dessa etapa de deslignificação foi de 50,0%, proporcionando um decréscimo de 76% da lignina presente na palha pré-tratada (ver Tabela 23 e Tabela 24). Além da lignina, os polissacarídeos também sofreram degradação durante a deslignificação. Aproximadamente 66% da hemicelulose foram removidas, restando apenas 3,4% na polpa. A celulose apresentou um conteúdo de 79% na polpa, porém 36% da celulose foram degradadas nessa etapa, prejudicando significativamente o rendimento global de conversão de palha de cana-de-açúcar a etanol.

Tabela 23 - Composição química (em porcentagem) das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas hidrotermicamente em diversas condições. Deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h.

Componente	Condição do Pré-tratamento				
	180°C 10 min	185°C 10 min	190°C 10 min	195°C 10 min	190°C 15 min*
Rendimento	72,0%	73,6%	72,7%	78,9%	50,0%
Celulose	72,7 ± 0,3	72,1 ± 0,2	76,2 ± 0,4	73,9 ± 0,3	79,0 ± 0,1
Hemicelulose	9,2 ± 0,1	7,4 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Lignina	14,5 ± 0,4	16,4 ± 0,7	14,8 ± 0,1	16,6 ± 0,7	15,5 ± 0,1
Cinzas	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Total	96,9 ± 0,7	96,5 ± 0,5	96 ± 1	94,8 ± 0,5	100,1 ± 0,3

* Dados da polpa de palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15 min da Tabela 17, adicionados na tabela acima a fim de facilitar a comparação entre os resultados das outras condições avaliadas.

A microscopia eletrônica de varredura da polpa de palha pré-tratada na condição 190°C/15min (Figura 24) mostrou que ocorreram mudanças morfológicas nas fibras de celulose presentes na palha pré-tratada. A polpa de palha pré-tratada apresentou fibras de celulose mais desorganizadas comparadas com as fibras da palha pré-tratada, tornando aparentemente o material lignocelulósico mais acessível às enzimas celulolíticas (**BALAT, 2011; SUN; CHENG, 2002**). A alta perda de celulose observada na deslignificação da palha pré-tratada pode estar associada ao fato desse material ter um tipo de estrutura morfológica diferente das madeiras folhosas e coníferas. Em outra micrografia da palha pré-tratada foi possível observar um tipo de célula vegetal presente ao redor da superfície das fibras de celulose (ver Figura 27). Essas células foram identificadas como células de parênquima, que também possui celulose na sua composição química, porém mais suscetível aos agentes químicos e/ou enzimáticos do que a celulose presente numa fibra. Dessa forma, dependendo das

condições da deslignificação, parte das células de parênquima pode ter sido removida (degradada) elevando a perda de celulose. No nosso grupo de pesquisa também foram observadas grandes perdas de celulose na polpação soda de palha *in natura*. O rendimento para a essa polpação não passou de 30% (dados ainda não publicados). Com essas evidências, outras condições de reação devem ser investigadas para se evitar a perda de celulose.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura de uma fibra de celulose da palha pré-tratada hidrotêrmicamente na condição de 190°C/15min. Resolução de 300 vezes.

Em função da grande perda de celulose observada na etapa de deslignificação com o uso do reator REG MED AU/E-20, as palhas pré-tratadas com vapor nas condições 180, 185, 190 e 195 °C por 10 min foram deslignificadas utilizando ampolas de aço inoxidável com capacidade de 200 mL. Dessa forma, espera-se que as rampas de aquecimento e resfriamento sejam drasticamente reduzidas.

Analisando os dados obtidos para a etapa de extração alcalina das palhas pré-tratadas hidrotêrmicamente nas condições 180, 185, 190 e 195 °C por 10 min (ampolas) verificaram-se que os rendimentos foram maiores que 70% (Tabela 23). Para o experimento na condição de 190°C por 15 min com reator REG-MED AU/E-20, o rendimento foi de apenas 50%. Isso mostra que o uso do reator tipo ampola reduziu o efeito de degradação dos componentes macromoleculares da palha de cana. Estendendo essa análise para a celulose, a diferença de degradação entre os tipos de reatores ficou ainda mais evidente. As perdas de celulose para os experimentos com ampola não passaram de 11% enquanto a perda de celulose para o reator REG-MED AU/E-20 foi de 36% (Tabela 23).

Tabela 24 - Perdas/Solubilizações dos componentes macromoleculares das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas hidrotermicamente em diversas condições, considerando somente o rendimento da etapa de deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h. Valores em parênteses representam as perdas/Solubilizações totais associadas ao pré-tratamento hidrotérmico e à etapa de deslignificação.

Componente	Condição do Pré-tratamento				
	180°C 10 min	185°C 10 min	190°C 10 min	195°C 10 min	190°C 15 min*
Celulose	6,0% (29%)	10,2% (32%)	10,2% (34%)	6,2% (31%)	35,7% (54%)
Hemicelulose	52,5% (88%)	43,8% (91%)	35,1% (95%)	18,4% (96%)	65,6% (97%)
Lignina	62,5% (78%)	57,9% (76%)	64,9% (80%)	59,4% (76%)	76,1% (86%)

* Dados da polpa de palha pré-tratada hidrotermicamente na condição de 190°C/15 min da Tabela 18, adicionados na tabela acima a fim de facilitar a comparação entre os resultados das outras condições avaliadas.

Analizando as composições químicas das polpas de palha pré-tratada hidrotermicamente, notou-se que todas elas apresentaram um conteúdo de lignina residual de aproximadamente 16% ($15,6 \pm 0,9$ - Tabela 23). Isto sugere que o agente de deslignificação (NaOH) atingiu o seu limite de solubilização de fragmentos de lignina susceptíveis aos álcalis, evento comum em etapas de branqueamento de polpas celulósicas, as quais os agentes de deslignificação são alternados para conseguir reduzir cada vez mais o conteúdo de lignina residual na polpa a ser branqueada (**FENGEL; WEGENER, 1989**). A avaliação das solubilizações totais de lignina (soma da solubilização associada à etapa de pré-tratamento com a da extração alcalina) também revela esse efeito, pois todas as polpas de palha pré-tratada com vapor apresentaram solubilizações totais de lignina em torno de 78% (ver valores em parêntese da Tabela 24), exceto para a condição 190°C/15 min. Portanto, considerando que a inibição das celulasas seja provocada apenas pela adsorção irreversível à lignina e, associada ao fato de que os teores de lignina residual das polpas pré-tratadas hidrotermicamente estão próximos, é de se esperar que todas essas polpas apresentem as mesmas conversões enzimáticas de celulose.

Além do teor de lignina, outro fator que também influencia negativamente a ação das celulasas é a presença de hemicelulose. Esse componente forma uma barreira física sobre a celulose impedindo o acesso direto das enzimas celulolíticas. O teor de hemicelulose nas palhas após a deslignificação decresceu significativamente com o aumento da temperatura do pré-tratamento. As polpas apresentaram apenas 3,7% de hemicelulose para a condição de 195°C/10 min (ampola) e 3,4% para a condição de 190°C/15 min (REG-MED) (Tabela 23). Comparando a solubilização total, todas as condições avaliadas tiveram porcentagens de remoção de hemicelulose superiores a 90%, exceto para a condição de 180°C/10 min, que teve uma remoção total de 88% (ver Tabela 24). Portanto, espera-se que o efeito da hemicelulose sobre as celulasas seja insignificante, já que grande parte das polioses foi extraída.

5.3.3 Digestibilidade Enzimática das palhas pré-tratadas hidrotêrmicamente

As condições do pré-tratamento hidrotérmico podem tanto influenciar a etapa de deslignificação como também a etapa de sacarificação enzimática da celulose. Mas, para isso, a etapa de deslignificação deve ser realizada na mesma condição para normalizar o efeito da extração de lignina sobre a hidrólise enzimática da celulose e possibilitar a investigação de qual a melhor condição de pré-tratamento para se obter elevados rendimentos de hidrólise enzimática. Os dados da conversão enzimática de celulose das palhas pré-tratadas hidrotêrmicamente e das polpas obtidas após a extração alcalina se encontram na Tabela 25.

O efeito da temperatura do pré-tratamento sobre a conversão de celulose das palhas pré-tratadas foi do tipo parabólico, saindo de um valor de 50% para a condição de pré-tratamento menos severa (180°C/10 min), elevando até um valor máximo (68% - condição correspondente a 195°C/10 min) e depois decrescendo para 49% na condição mais drástica (190°C/15 min). Mas, por outro lado, ao se linearizar o efeito combinado da temperatura e tempo através do cálculo da severidade (eq. 1), não se observa mais, para o intervalo de severidade avaliado (Log Ro de 3,3 a 3,8), esse efeito parabólico e sim um efeito linear, desde que desconsidere o último ponto (o de maior severidade) – Figura 28. Esse ponto (Log Ro = 3,83) corresponde à condição 190°C/15 min, em que teve uma conversão baixa de celulose (Tabela 25). Acredita-se que erros experimentais tenham ocorridos para esse ensaio, divergindo da tendência gerada pelos os outros pontos, em que maiores severidades proporcionam maiores conversões de celulose.

Figura 28 - Efeito da severidade (Log Ro) do pré-tratamento hidrotérmico na conversão enzimática da celulose de palha de cana.

Excluindo-se o ponto correspondente ao ensaio a 190°C/15 min, todos os outros foram realizados com o mesmo tempo de pré-tratamento (10 min), ou seja, não é esperado efeito desse parâmetro sobre a conversão enzimática. Somente a elevação da temperatura pode ter influenciado a conversão da celulose. O aumento da temperatura do pré-tratamento pode proporcionar cada vez mais alterações da estrutura supramolecular dos lignocelulósicos (**CUNHA, 1999; OLIVEIRA, 2010; SENDELIUS, 2005; SILVA, 2009**). Na condição mais branda avaliada, a temperatura do pré-tratamento hidrotérmico pode ter sido baixa para provocar alterações na estrutura supramolecular do lignocelulósico que facilitam o acesso das enzimas celulolíticas. Enquanto nas condições mais severas, a remoção de parte da hemicelulose e lignina tornou o material mais acessível às enzimas celulolíticas, facilitando a conversão da celulose.

Na Tabela 25 encontram-se também os dados da conversão enzimática de celulose das polpas de palhas pré-tratadas hidrotérmicamente. Pelos desvios padrões obtidos, todas as polpas tiveram as mesmas conversões de celulose (67 ± 3 % - média dos cinco experimentos). Esse resultado em que as conversões de celulose ficaram próximas uma das outras, reflete o efeito da extração alcalina das palhas pré-tratadas. Como a remoção de lignina atingiu o limite para o agente de deslignificação utilizado (NaOH), todas as polpas obtidas apresentaram teores de lignina semelhantes (ao redor de 16% - Tabela 23) e, como o teor de lignina influencia (inibe) a ação das celulasas (**GREGG; SADDLER, 1996**), acredita-se que as polpas sofreram as mesmas taxas de digestibilidade de celulose, gerando valores semelhantes de conversão enzimática de celulose (Tabela 25). Um dado interessante foi obtido após a comparação dos valores de conversão de celulose da palha somente pré-tratada com os da polpa de palha pré-tratada, para as condições de pré-tratamento de 185, 190 e 195 °C por 10 min. Nessas condições, a extração de lignina não provocou aumento significativo de conversão de celulose. Tanto a palha pré-tratada hidrotérmicamente como as suas respectivas polpas tiveram valores muito próximos (62, 65 e 68 % contra 66, 65 e 65 %, respectivamente). Entretanto, para a condição de pré-tratamento hidrotérmico 180°C/10 min a remoção de lignina favoreceu consideravelmente a conversão de celulose. Antes da extração alcalina, a palha pré-tratada teve uma conversão de celulose de 50 %, enquanto após a deslignificação, a polpa apresentou 70% de conversão de celulose (ver Tabela 25). O que pode ter ocorrido é que a extração alcalina pode ter elevado a acessibilidade das enzimas celulolíticas pelo aumento da desestruturação do material lignocelulósico na condição mais amena (180°C/10 min). Esse efeito de desestruturação não deve ter ocorrido com eficiência na etapa de pré-tratamento, reduzindo assim a ação das celulasas. Esse comportamento da conversão da palha de cana deslignificada também foi

observado no trabalho de **Oliveira (2010)**. Para os pré-tratamentos em condições mais severas, a deslignificação piorou a conversão enzimática. A remoção da lignina só favoreceu a conversão de celulose em condições mais brandas de pré-tratamento.

Tabela 25 - Sacarificação enzimática da celulose das palhas pré-tratadas hidrotermicamente e das respectivas polpas obtidas.

Material	Condição do Pré-tratamento	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%) ¹
Palha <i>in natura</i> ²	-	1,8 ± 0,4	8,2 ± 0,5
Palha pré-tratada	180°C/10min	25 ± 3	50 ± 2
	185°C/10min	41,2 ± 0,8	62 ± 3
	190°C/10min	43,6 ± 0,2	65 ± 4
	195°C/10min	44,7 ± 0,9	68,1 ± 0,4
	190°C/15min	22 ± 2	49 ± 4
Polpa de palha pré-tratada	180°C/10min	55,9 ± 0,1	70 ± 2
	185°C/10min	49,0 ± 0,3	66 ± 2
	190°C/10min	51,1 ± 0,5	65 ± 2
	195°C/10min	53,9 ± 0,9	64 ± 1
	190°C/15min	38,8 ± 0,7	70 ± 1

¹ Condição de sacarificação enzimática: teor de sólidos 10% (m/v), carga de enzima de 15 FPU/g de material lignocelulósico (Celluclast 1.5L) e 10 UI/g de material lignocelulósico (Novozym 188), pH 4,8 a 45°C por 72h.

² O teor de sólidos utilizado foi de 5% (m/v).

Para a condição de 190°C/15 min, o valor de conversão enzimática de 70% para a polpa de palha é ligeiramente superior aos valores encontrados para as polpas dos ensaios de pré-tratamento com severidade menor, seguindo, portanto, a tendência dos outros experimentos. Esse comportamento mostra que a conversão de celulose de apenas 49% encontrada para a palha pré-tratada à 190°C/15 min não é o valor realmente correto. Esperava-se que para essa condição de pré-tratamento, a conversão de celulose da palha pré-tratada seguiria o comportamento das outras palhas pré-tratadas, devendo ser então superior a 65% (Figura 28).

Figura 29 - Gráfico da porcentagem de conversão de celulose em função do teor de lignina presente nas palhas pré-tratadas hidrotérmicamente e das suas respectivas polpas obtida após a deslignificação.

Portanto, conclui-se que para a condição de pré-tratamento hidrotérmico acima de 180°C/10 min não é necessária a etapa de deslignificação, já que tanto da palha pré-tratada como para as polpas obtidas após a extração alcalina, as conversões enzimáticas da celulose foram praticamente as mesmas (Tabela 25). E isso fica mais evidente quando se compara as conversões de celulose em relação aos teores de lignina entre as palhas pré-tratadas e as suas respectivas polpas. Notou-se que mesmo removendo uma parte da lignina presente na palha de cana pré-tratada, as conversões de celulose das polpas ficaram semelhantes em relação às da palha pré-tratada, em torno de 65% (Figura 29). Um resultado totalmente inesperado para ensaios de conversão enzimática da celulose, já que a lignina é considerada um dos inibidores das enzimas celulolíticas (**CUNHA, 1999; SENDELIUS, 2005**). Esse comportamento anômalo pode ser devido à lignina da palha ser diferenciada em relação à do bagaço. Ela é ainda objeto de muita especulação na comunidade científica. A análise dos licores de pré-tratamentos ou de deslignificação da palha de cana poderia dar mais informações sobre o efeito dessa lignina em relação às celulasas. Entretanto, não foi o objetivo desse trabalho.

5.4 Dados dos experimentos realizados com bagaço e palha de cana pré-tratados com ultrassom

5.4.1 Pré-tratamento com Ultrassom

Os ensaios de pré-tratamento ultrassônico foram efetuados seguindo a metodologia de **Sun et al. (2004)**. Esses autores estudaram o efeito do pré-tratamento por ultrassom sobre bagaço de cana visando o isolamento da celulose.

Figura 30 - Fotos do bagaço *in natura* moído 20 mesh (A), bagaço pré-tratado por ultra-som (B), palha *in natura* moída 20 mesh (C) e palha pré-tratada por ultra-som (D).

De acordo com a Figura 30 nota-se que o pré-tratamento por ultrassom não provocou alterações macroscópicas significativas no bagaço e palha de cana, pois tanto o material pré-tratado como o *in natura* apresentaram o mesmo aspecto visual. **Zhang et al. (2008)** também notaram que a irradiação de ondas ultrassônicas não provocou mudanças morfológicas no material lignocelulósico (no caso, *corn stover*). Os autores explicaram que a energia da vibração ultrassônica é muito baixa para gerar mudanças na estrutura do material lignocelulósico. Em função disso, acredita-se que os efeitos do pré-tratamento por ultrassom ocorreram em escala microscópica,

como, por exemplo, erosão da superfície das fibras de celulose (AIMIN et al., 2005) ou clivagem das ligações da lignina e hemicelulose (KADIMALIEV et al., 2003; YU et al., 2009).

As análises do rendimento da etapa de pré-tratamento corroboraram com o efeito do ultrassom sobre a morfologia do material lignocelulósico. Somente uma pequena fração do material *in natura* foi solubilizada, 5% para o bagaço e 7% para a palha (ver Tabela 26). Esses valores, em comparação com os outros tipos de pré-tratamentos, são considerados baixos. A solubilização dos componentes macromoleculares em outros tipos de pré-tratamento atinge valores superiores a 30% (WYMAN et al., 2005).

Tabela 26 - Composição química (em porcentagem) da palha e bagaço pré-tratados por ultrassom. As duas últimas colunas da direita correspondem às perdas/solubilizações de cada componente macromolecular para a etapa de pré-tratamento por ultrassom.

Componente	Bagaço <i>in natura</i>	Palha <i>in natura</i> ¹	Bagaço PTUS ²	Palha PTUS ²	Perda/ Solubil. Bagaço PTUS	Perda/ Solubil. Palha PTUS
Rendimento	-	-	95,2%	92,5%	-	-
Celulose	44 ± 1	40,5 ± 0,2	44,3 ±	36,3 ± 0,3	4,1%	17,1%
Hemicelulose	25,8 ± 0,8	31,0 ± 0,3	26,0 ±	28 ± 3	4,1%	16,5%
Lignina Solúvel	6,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1	5,7 ± 0,3	4,2 ± 0,1	15,2%	51,4%
Lignina Insolúvel	21,8 ± 0,7	17,7 ± 0,1	21,8 ±	16,6 ± 0,6	4,8%	13,2%
Lignina	28,2 ± 0,8	25,7 ± 0,2	27,5 ±	20,8 ± 0,1	7,2%	25,1%
Cinzas	1,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	-	-
Total	99,2 ± 0,8	99,7 ± 0,3	98,7 ±	87 ± 4	-	-
Seletividade H/C ³	-	-	-	-	1,00	0,96
Seletividade L/H ⁴	-	-	-	-	1,76	1,52

¹ Composição da palha *in natura* isenta de extrativos.

² PTUS significa pré-tratamento por ultrassom.

³ Razão entre a solubilização de hemicelulose (H) e a perda de celulose (C).

⁴ Razão entre as solubilizações de lignina (L) e de hemicelulose (H).

A análise de composição química do bagaço de cana revelou que o pré-tratamento por ultrassom remove preferencialmente a lignina (7,2%) enquanto a hemicelulose (4,1%) e a celulose (4,1%) são menos degradadas (Tabela 26). A seletividade L/H também mostra esse efeito. Para o bagaço de cana quase o dobro de lignina é degradada em relação à hemicelulose; e para a palha de cana, aproximadamente 50% a mais. Mas vale lembrar que em termos de porcentagem, a solubilização de lignina é bem maior para a palha em comparação com o bagaço, indicando aparentemente que este possui uma lignina mais susceptível ao ultrassom.

Observando somente os valores de solubilização de lignina solúvel e insolúvel da Tabela 26, verifica-se que esse tipo de pré-tratamento ataca preferencialmente os compostos fenólicos solúveis em ácido, que podem ser provenientes tanto da própria

lignina como também dos extrativos. Isso fica mais evidente para a palha de cana, em que mais de 50% dos compostos fenólicos foram extraídos após o pré-tratamento com ultrassom. **Rodrigues et al. (2008)** em seu estudo de extração de compostos fenólicos de casca de coco através de tratamento por ultrassom conseguiram remover cerca de 5% da lignina da casca de coco (desde que seja considerado que esse material lignocelulósico contém 40% de lignina (**PASSOS, 2005**), já que Rodrigues e colaboradores não exibiram nenhuma composição química da casca de coco utilizada). No trabalho de **Yu et al. (2009)** nenhuma modificação da composição química dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) da casca de arroz pré-tratada por ultrassom foram evidenciadas, nem redução do tamanho das partículas. O único efeito observado pelos autores foi o aumento de acessibilidade das enzimas celulolíticas sobre a biomassa pré-tratada.

Dessa forma, o valor de solubilização de lignina (ou compostos fenólicos dos extrativos) obtido para o bagaço de cana pré-tratado por ultrassom está próximo dos valores encontrados na literatura (**RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008; YU et al., 2009**). Entretanto, para a palha de cana, o valor obtido é 3,5 vezes maior que o do bagaço, diferindo dos dados comumente encontrados na literatura (**RODRIGUES; PINTO; FERNANDES, 2008; YU et al., 2009**). Isso pode ter ocorrido em função da caracterização química da palha pré-tratada por ultrassom estar imprecisa. O balanço de massa da análise foi inferior a 90%, revelando que uma grande parte de material não foi quantificada, que pode ser tanto de celulose, lignina ou hemicelulose. Portanto, qualquer comparação entre os dados do bagaço com a palha de cana será apenas especulativa.

Os valores de seletividade H/C, para ambos os lignocelulósicos, mostram que a perda de celulose ficou próxima da solubilização de hemicelulose (Tabela 26). Essa evidência sugere que esses dois componentes sofreram a mesma taxa de degradação, ou seja, o pré-tratamento com ultrassom não teve um efeito seletivo entre os carboidratos dos materiais lignocelulósicos estudados.

Como foi seguida a metodologia de pré-tratamento por ultrassom de **Sun et al. (2004)**, era de se esperar uma comparação dos dados desse trabalho com os dos autores. Entretanto, não foi possível efetuar essa comparação, pois os autores testaram o pré-tratamento por ultrassom em conjunto com diversas etapas sucessivas de tratamento com NaOH e, os dados mostrados pelo mesmos, não são das etapas isoladas e somente da etapa global.

Como a análise de composição química da palha pré-tratada por ultrassom está imprecisa, outra forma de avaliar o efeito do pré-tratamento é através da análise dos açúcares e das frações de lignina solubilizados no licor de pré-tratamento. Os açúcares foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (seção 4.6.2),

enquanto a lignina solúvel (ou compostos fenólicos solúveis) foi mensurada através de espectrofotometria na região do ultravioleta (seção 4.6.5).

Figura 31 - Cromatogramas dos licores de pré-tratamento por ultrassom do bagaço de cana (à esquerda) e da palha de cana (à direita).

Pelos cromatogramas obtidos (Figura 31) nota-se que o ultrassom provocou um efeito distinto em relação ao tipo de material lignocelulósico. Para o bagaço de cana, a hemicelulose foi o componente que mais sofreu degradação (pico da xilose maior do que o da glicose), enquanto para a palha de cana, a celulose foi a mais afetada. Isso, em números (Tabela 27), representa 1,1% de degradação da hemicelulose e 0,6% de celulose para o bagaço de cana e, 0,5% de hemicelulose e 0,9% de celulose para a palha de cana. Esses resultados diferentes também foram evidenciados na análise de composição química dos materiais lignocelulósicos pré-tratados, entretanto, devido à análise para a palha estar com os dados imprecisos, não se pôde afirmar com clareza sobre esse efeito diferenciado que o ultrassom provocou sobre o bagaço e a palha de cana.

Tabela 27 - Perda/Solubilização de componente na etapa de pré-tratamento por ultrassom para o bagaço e palha de cana.

Componente	Bagaço ¹	Palha ¹
Celulose	0,6%	0,9%
Hemicelulose	1,1%	0,5%
Lignina	2,8%	12,2%

¹ Valores calculados através da quantidade de açúcares liberados aos licores de cada ensaio.

De acordo com a literatura espera-se que a hemicelulose seja mais influenciada pelo ultrassom do que a celulose (**HROMADKOVA; KOVACIKOVA; EBRINGEROVA, 1999; EBRINGEROVA; HROMADKOVA, 2002; SUN; TOMKINSON 2002**), já que a

estrutura morfológica desta é mais compacta, cristalina e resistente em relação à hemicelulose. Porém, o componente macromolecular da palha que mais sofreu degradação pelo ultrassom foi a celulose, contrariando as evidências encontradas na literatura. O baixo valor encontrado para a solubilização de hemicelulose deve estar associado ao fato em que a maior parte da fração solubilizada da hemicelulose deve estar na forma de oligômeros, que não foi detectado pela análise de cromatografia usada. Para confirmar isso, é preciso efetuar uma etapa de pós-hidrólise com ácido ao licor de pré-tratamento por vapor obtido para a palha de cana (análise não realizada no projeto).

De acordo com os dados da Tabela 26 e Tabela 27, notou-se que, para a etapa de pré-tratamento por ultrassom, os compostos fenólicos presentes na palha de cana sofreu uma maior degradação do que a do bagaço de cana. Os valores para a palha foram até quatro vezes maiores do que o observado para o bagaço de cana (Tabela 27), indicando que a palha deve conter uma lignina ou extrativo mais susceptível ao ultrassom do que a do bagaço de cana. **Buranov e Mazza (2008)** mostraram que as ligninas de palha de herbáceas têm estruturas diferentes das encontradas para as de madeira mole ou dura. Elas são mais susceptíveis a álcalis do que as ligninas presentes em materiais lenhosos. No entanto, não existe nenhuma referência quanto a possíveis diferenças entre a lignina de bagaço e palha de cana.

5.4.2 Deslignificação por Extração alcalina do Bagaço e Palha Pré-tratados por Ultrassom

Após o pré-tratamento por ultrassom, o bagaço e a palha de cana foram submetidos a uma etapa de extração alcalina nas mesmas condições da deslignificação da palha pré-tratada por impregnação a vapor (NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1h – ampolas de aço inoxidável). Para comparar os efeitos do ultrassom sobre a etapa de deslignificação, ensaios brancos foram realizados utilizando bagaço e palha de cana sem pré-tratar por ultrassom (material lignocelulósico *in natura*). Os dados de caracterização química das polpas obtidas a partir dos materiais pré-tratados por ultrassom e dos ensaios brancos se encontram na Tabela 28.

Os rendimentos da etapa de extração alcalina para as duas biomassas pré-tratadas por ultrassom foram superiores aos valores obtidos para os seus respectivos ensaios branco (Tabela 28). Para o bagaço de cana pré-tratado por ultrassom, o rendimento da etapa foi de 68%, enquanto para o ensaio branco 57%. Já para a palha de cana pré-tratada por ultrassom, o rendimento foi de 57%, ao passo que para o ensaio branco 44%. Esses dados mostram claramente que os materiais pré-tratados por ultrassom sofreram uma menor degradação em relação aos seus componentes

macromoleculares. Os rendimentos mássicos de ambos os materiais foram superiores aos seus respectivos ensaios branco.

Tabela 28 - Composição química (em porcentagem) das polpas de palha e bagaço pré-tratados por ultrassom. Também estão expostas as composições química das polpas de bagaço e palha *in natura* (ensaio branco).

Componente	Polpa Bagaço PTUS	Polpa Bagaço <i>in natura</i>	Polpa Palha PTUS	Polpa Palha <i>in</i> <i>natura</i>
Rendimento	68,0%	57,2%	57,6%	43,6%
Celulose	61,1 ± 0,5	60,2 ± 0,5	60 ± 2	64,8 ± 0,6
Hemicelulose	25,2 ± 0,1	25,5 ± 0,5	20,5 ± 0,6	15,1 ± 0,2
Lignina Solúvel	5,2 ± 0,1	5,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Lignina Insolúvel	8,5 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,1	8,9 ± 0,3
Lignina Total	13,7 ± 0,2	13,6 ± 0,3	9,3 ± 0,1	9,9 ± 0,5
Cinzas	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Total	100,6 ± 0,3	100,0 ± 0,4	91 ± 2	90,9 ± 0,3

PTUS significa pré-tratamento por ultrassom.

Na análise de solubilização de lignina verificou-se que, nos ensaios branco, a extração de lignina foi ligeiramente maior em comparação aos valores obtidos para materiais pré-tratados por ultrassom (ver Tabela 29). O bagaço *in natura* teve uma remoção de lignina de aproximadamente 74%, enquanto o bagaço pré-tratado por ultrassom apresentou uma solubilização de 66,9%. A palha *in natura* também apresentou uma extração superior de lignina em relação à palha pré-tratada por ultrassom, sendo 83,1% e 74,1%, respectivamente. Considerando a solubilização total de lignina (soma da solubilização de lignina da etapa de pré-tratamento com a da extração alcalina), as polpas dos materiais pré-tratados por ultrassom ainda tiveram uma extração menor de lignina do que para os ensaios branco (ver Tabela 29). Essas evidências sugerem que a radiação ultrassônica sobre o bagaço e palha de cana dificultou, de alguma forma, a degradação da lignina pela soda cáustica. No entanto, trabalhos na literatura mostram claramente o contrário, como o trabalho de **Kadimaliev et al. (2003)**, os quais observaram que a radiação ultrassônica em serragem de pinheiro e de bétula favoreceu o consumo de lignina pelo fungo *Panus (Lentinus) tigrinus*, e de **Rodrigues e Pinto (2007)** que avaliaram a extração de compostos fenólicos de cascas de coco moídas e notaram que o ultrassom também melhorou a remoção de compostos fenólicos. Mas, por outro lado, **Li et al. (2005)** verificaram que altas intensidades de radiação ultrassônica (acima de 60 W por 48h), em papéis com impurezas de lignina, provocam o amolecimento dessa estrutura permitindo difundir-se extensivamente sobre as microfibrilas de celulose, formando redes de fibra de celulose rígidas e fechadas, muito mais recalcitrantes aos agentes químicos e enzimas celulolíticas. Analisando as condições do pré-tratamento com

ultrassom (seção 4.3.3), nota-se que intensidade da radiação empregada no pré-tratamento foi de 120 W (padrão do equipamento – não era possível modificar), valor superior ao especificado por **Li et al. (2005)**, entretanto por um tempo menor, apenas 40 min. Comparando as condições empregadas no projeto (120 W/40 min) com a dos autores (60 W/48 h), há uma grande diferença da quantidade de energia ultrassônica fornecida nos experimentos. Entretanto, o efeito de amolecimento da lignina notado pelos autores pode ter ocorrido num determinado momento ao atingir um valor limite de energia fornecida, e após isso, mantém a sua estrutura mesmo com adição de energia ao experimento. Os autores realizaram os seus experimentos sob o mesmo intervalo de tempo (48 h) e, então, não foi possível avaliar essa hipótese nos dados apresentados. Nos nossos dados de remoção de lignina para os materiais pré-tratados por ultrassom observaram-se que de alguma forma a irradiação de ondas ultrassônicas dificultou a solubilização da lignina pela soda cáustica. Apesar do tempo reduzido do pré-tratamento, o mesmo pode ter sido suficiente para provocar o amolecimento da lignina e permeação sobre as microfibrilas de celulose, uma vez que o pré-tratamento ultrassônico foi realizado sob uma intensidade duas vezes maior ao valor em que os autores notaram o efeito de amolecimento da lignina.

Tabela 29- Perdas/Solubilização dos componentes macromoleculares das polpas obtidas após extração alcalina das palhas pré-tratadas por ultrassom, considerando somente o rendimento da etapa de deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1 h.

Componente	Polpa Bagaço PTUS ¹	Polpa Bagaço <i>in natura</i>	Polpa Palha PTUS ¹	Polpa Palha <i>in natura</i>
Celulose	5,2% (9,7%)	16,2%	5,1% (21,2%)	30,2%
Hemicelulose	33,5% (36,7%)	60,5%	57,4% (64,8%)	78,8%
Lignina	66,9% (68,5%)	73,8%	74,1% (80,6%)	83,1%

¹ PTUS significa pré-tratamento com ultrassom.

Valores em parênteses representam as perdas/Solubilizações totais associadas ao pré-tratamento com ultrassom e à etapa de deslignificação.

Comparando a razão entre o teor de lignina insolúvel por lignina solúvel ($\text{teor}_{\text{lignina insolúvel}}/\text{teor}_{\text{lignina solúvel}}$) para o bagaço e a palha pré-tratados com ultrassom em relação aos materiais lignocelulósicos *in natura* (Tabela 28), observou-se que a razão é maior para os materiais pré-tratados (3,82 e 3,95 para o bagaço e a palha pré-tratados enquanto 3,47 e 2,21 para o bagaço e a palha *in natura*, respectivamente). Isso mostra que a proporção de lignina solúvel nos materiais pré-tratados diminui, ou seja, um indício que parte da lignina presente no material *in natura* pode ter sofrido reticulação, em função da severidade do pré-tratamento com ultrassom (elevada intensidade da radiação – 120W), tornando-se lignina insolúvel. Mas vale ressaltar que no método de determinação do teor de lignina solúvel são quantificados também os compostos fenólicos presentes nos extrativos do

lignocelulósico. Portanto, a diminuição da proporção de lignina solúvel pode ser devido à solubilização desses compostos fenólicos.

Pela análise das perdas/solubilizações de carboidratos, o efeito do ultrassom sugerido por **Li et al. (2005)** ficou ainda mais evidente. A perda de celulose e a solubilização de hemicelulose nos materiais pré-tratados foram bem menores do que os observados para polpa de material *in natura* (Tabela 29). A perda total de celulose para o bagaço pré-tratado por ultrassom foi 40% menor que a perda verificada para o seu ensaio branco, enquanto para a palha pré-tratada por ultrassom, a perda foi 30% menor do que a observada para seu ensaio branco. Em relação à degradação de hemicelulose, o bagaço *in natura* teve uma solubilização de 60,5%, enquanto o bagaço pré-tratado por ultrassom apenas 33,5%. Já a hemicelulose da palha *in natura* sofreu uma degradação de 78,8% contra 57,4% da palha pré-tratada por ultrassom. Esses resultados mostram aparentemente que houve o efeito de amolecimento e difusão da lignina sobre as fibras de celulose, evitando a degradação dos carboidratos pela soda cáustica da etapa de extração alcalina. Em função disso, a deslignificação dos materiais pré-tratados por ultrassom ocorreu de forma mais seletiva, elevando os rendimentos mássicos da etapa, enquanto, para os materiais *in natura*, a degradação dos carboidratos foi maior, elevando a perda de celulose e solubilização de hemicelulose na etapa de extração alcalina.

5.4.3 Digestibilidade de Bagaço e Palha Pré-tratados por Ultrassom

O pré-tratamento por ultrassom também foi avaliado quanto a sua influência à digestibilidade enzimática da celulose. Para isso, um conjunto de experimentos foi montado testando tanto o material lignocelulósico pré-tratado por ultrassom como também os materiais *in natura* e os deslignificados (polpas). Os dados da conversão enzimática da celulose e as quantidades de açúcares liberados ao meio se encontram na Tabela 30.

O bagaço pré-tratado por ultrassom apresentou uma digestibilidade de celulose 23% maior em relação ao do bagaço *in natura*. Entretanto, considerando desvio padrão para as duas amostras, as suas conversões enzimáticas de celulose foram estatisticamente iguais. Já para palha pré-tratada por ultrassom, a conversão de celulose foi menor em relação à palha *in natura*, cerca de 70%. Efeito também observado entre a digestibilidade das polpas dos materiais pré-tratados (processo PTUS + EA) e das polpas dos ensaios branco (processo EA). As reduções foram da ordem de 8% para a polpa de bagaço pré-tratado e de 15% para a polpa de palha pré-tratada. Essas evidências refletem os mesmos efeitos observados na extração alcalina dos materiais pré-tratados por ultrassom, ou seja, o aumento da recalcitrância

do material devido ao amolecimento e difusão da lignina sobre as microfibrilas de celulose, tornando-as muito mais recalcitrantes às enzimas celulolíticas e aos reagentes químicos (LI et al., 2005). Na etapa anterior de deslignificação alcalina, os polissacarídeos tanto do bagaço como da palha pré-tratados por ultrassom apresentaram uma maior resistência à degradação pelo álcali (ver Tabela 29).

Tabela 30 - Sacarificação enzimática da celulose do bagaço e palha pré-tratados por ultrassom e das respectivas polpas obtidas.

Material	Processo	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)
Bagaço	Material <i>in natura</i>	2,5 ± 0,4	9 ± 3
	PTUS	2,4 ± 0,3	11,1 ± 0,8
	PTUS + EA	45,1 ± 0,6	60,9 ± 0,1
	EA	51 ± 6	66 ± 3
Palha	Material <i>in natura</i>	4,9 ± 0,7	16 ± 2
	PTUS	1,3 ± 0,4	5 ± 1
	PTUS + EA	52 ± 3	60 ± 3
	EA	51 ± 2	70 ± 4

Condição de sacarificação enzimática: relação sólido:líquido 1:10, carga de enzima de 15 FPU/g de material lignocelulósico (Celluclast 1.5L) e 10 UI/g de material lignocelulósico (Novozym 188), pH 4,8 a 45°C por 72h.
PTUS: material pré-tratado por ultrassom; EA: extração alcalina de lignina.

5.5 Eficiência da conversão de celulose a glicose entre os materiais lignocelulósicos

A escolha do melhor processo para a conversão de biomassa não se deve focar somente em resultados de uma única etapa e sim pela análise do efeito combinado de todas as etapas envolvidas nesse processo (SASSNER; GALBE; ZACCHI, 2007). Para isso, é necessário calcular o rendimento global do processo, o que facilita a escolha da melhor configuração de etapas de pré-tratamento, extração alcalina e hidrólise enzimática para o processo de conversão de celulose a açúcares fermentáveis. A conversão total de celulose foi calculada utilizando as equações A4, A5 e A6 do apêndice A. Na Tabela 31 encontram-se as conversões globais de celulose a glicose para todos os processos avaliados nesse trabalho.

Para o bagaço *in natura*, somente 15,0% da celulose inicial pode ser convertida em glicose. Já com a adição de uma etapa de pré-tratamento por explosão a vapor, esse lignocelulósico teve um aproveitamento da celulose de 41%. Após mais uma etapa de deslignificação por extração alcalina, esse valor se elevou para 62,4%, isso com os testes de hidrólise enzimática em baixo teor de sólidos (2%). Entretanto,

quando esses testes foram efetuados em alto teor de sólidos (10%), um pequeno decréscimo da conversão global de celulose foi observado (15% para o bagaço pré-tratado e 12% para o deslignificado), o que pode prejudicar inicialmente a viabilidade econômica do processo. Porém, por outro lado, em alto teor de sólidos, os hidrolisados apresentaram elevadas concentrações de glicose, que reduz os gastos gerados por etapas posteriores de concentração de hidrolisado necessário para a fermentação a etanol.

A deslignificação alcoólica alcalina do bagaço pré-tratado por explosão a vapor proporcionou aproveitamento entre 25 a 55% da celulose inicial. Os melhores resultados foram para os ensaios 10 e 15 (54,9 e 53,9%, respectivamente). Esse valor é praticamente o mesmo que o da polpa de bagaço pré-tratado e deslignificado por extração alcalina, revelando novamente que o uso de etanol à polpação não propiciou melhoria no rendimento global de conversão de celulose comparado com a extração alcalina convencional. Além disso, o último possui um custo menor dentro de um processo de conversão de biomassa a etanol por utilizar somente a soda cáustica como agente deslignificante.

As conversões globais de celulose para as palhas pré-tratadas hidrotermicamente variaram entre 35 a 50% (Tabela 31). Os menores valores (34,8% e 37,9%) foram obtidos para as condições de pré-tratamento de 190°C/15 min e 180°C/10 min, respectivamente. A maior conversão global de celulose foi para a palha pré-tratada na condição de 195°C/10 min, cerca de 50%. Em condições mais amenas, os valores obtidos foram ligeiramente menores, 48,3% para a condição 190°C/10 min e 47,3% para a de 185°C/10 min. Isso mostra que o aumento de severidade do pré-tratamento, no caso a temperatura, proporciona melhores condições para a ação das enzimas celulolíticas. Ressaltando que após uma determinada severidade, esse efeito de melhoria se inverte, prejudicando a digestibilidade da celulose (como ocorreu para a condição de 190°C /15 min – ver Tabela 31).

Para as polpas de palha pré-tratada hidrotermicamente, todas as conversões totais de celulose foram menores do que a conversão direta da celulose da palha pré-tratada, exceto para a condição de pré-tratamento 180°C/10 min (ver Tabela 31). Esses resultados não eram esperados já que as polpas de palha pré-tratada continham, em comparação com o lignocelulósico somente pré-tratado, menores teores de lignina (responsável pela inativação das celulasas) e maiores teores de celulose (maior concentração de substrato para as enzimas), compare Tabela 21 com Tabela 23. Entretanto, como as digestibilidades das polpas de palha pré-tratada foram próximas das de palha somente pré-tratada (ver Tabela 25), ao adicionar a perda de celulose durante a etapa de deslignificação, o rendimento global de conversão de celulose reduziu-se.

Do ponto de vista econômico, caso a etapa de deslignificação não provoque aumento significativo na obtenção de açúcares fermentáveis a partir da celulose, a inserção dessa etapa gerará um custo adicional ao processo, elevando ainda mais o custo de produção de etanol celulósico. Portanto, de acordo as observações acima, somente a etapa de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana já é suficiente para conseguir rendimentos moderados de conversão enzimática da celulose (~50%). A etapa de deslignificação, para as condições empregadas (NaOH 1%, 100°C por 1h), não proporcionou um aumento considerável da conversão total de celulose, inferindo assim que não é necessária essa etapa. Para o bagaço pré-tratado por explosão a vapor, a etapa de deslignificação foi essencial, já que provocou um acréscimo de 57% na conversão total de celulose após a remoção da lignina residual do material pré-tratado (Tabela 31 – dados com teor de sólidos de 10%).

Para o pré-tratamento por ultrassom, as conversões globais de celulose não apresentaram o mesmo comportamento das conversões de celulose somente da etapa de sacarificação enzimática. Considerando somente a etapa de hidrólise enzimática, as conversões das polpas dos ensaios branco foram 8,4% (bagaço) e 17% (palha) maior em relação às polpas dos seus respectivos materiais pré-tratados, porém ao adicionar as perdas de celulose de todas as etapas, as conversões de celulose das polpas dos ensaios brancos praticamente se igualaram com as das polpas dos seus respectivos materiais pré-tratados (compare Tabela 30 e Tabela 31). Como as perdas de celulose das polpas dos ensaios branco foram maiores do que as das polpas dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por ultrassom, ao somar a perda da etapa de deslignificação, acabou influenciando negativamente no valor da conversão global de celulose. Mas, por outro lado, levando em consideração que o objetivo do pré-tratamento é preparar o material lignocelulósico para auxiliar as etapas posteriores de deslignificação e sacarificação, notou-se que mesmo o pré-tratamento com ultrassom proporcionando menores perdas/solubilizações de carboidratos na etapa de deslignificação, a conversão global de celulose ainda não foi superior em relação ao material somente deslignificado. Isso mostra que ou as condições aplicadas para o ultrassom não foram adequadas ou que esse tipo de pré-tratamento não é indicado para o processo de conversão de biomassa em etanol. Como já observado anteriormente, as modificações sofridas na estrutura supramolecular dos lignocelulósicos pré-tratados [impregnação de lignina nas microfibrilas (**LI et al., 2005**)] prejudicaram a ação das enzimas celulolíticas, reduzindo assim a acessibilidade das mesmas e, em consequência, diminuindo a conversão total de celulose.

Tabela 31 - Conversão total de celulose para os diversos processos avaliados nesse relatório. Condição de sacarificação enzimática: relação sólido:líquido 1:10, carga de enzima de 15 FPU/g de material lignocelulósico (Celluclast 1.5L) e 10 UI/g de material lignocelulósico (Novozym 188), pH 4,8 a 45°C por 72h.

PT	MT	Cond. PT	Processo		CC	
Explosão a vapor	Bagaço	-	Hidrólise enzimática do material <i>in natura</i>		15,0%	
		~200°C/7 min	Pré-tratamento + Hidrólise Enzimática (2% sólidos)		41,0%	
			Pré-tratamento + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		34,7%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (2% sólidos)		62,4%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		54,7%	
			Pré-tratamento + Deslignificação Organosolv + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		Ensaio 01	36,8%
					Ensaio 02	43,9%
					Ensaio 03	47,7%
					Ensaio 04	48,5%
					Ensaio 05	45,3%
					Ensaio 06	34,0%
					Ensaio 07	28,7%
					Ensaio 08	42,2%
					Ensaio 09	38,7%
					Ensaio 10	54,9%
					Ensaio 11	38,1%
					Ensaio 12	40,2%
					Ensaio 13	47,2%
					Ensaio 14	37,9%
		Ensaio 15			53,9%	
Ensaio 16	35,9%					
Ensaio 17	48,6%					
Ensaio 18	25,1%					
Otimizado	41,9%					
Vapor	Palha	-	Hidrólise enzimática do material <i>in natura</i>		8,2%	
		180°C/10 min	Pré-tratamento com vapor + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		37,9%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		49,4%	
		185°C/10 min	Pré-tratamento com vapor + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		47,3%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		44,7%	
		190°C/10 min	Pré-tratamento com vapor + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		48,3%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		42,9%	
		195°C/10 min	Pré-tratamento com vapor + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		49,9%	
Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)			44,2%			
Ultrassom	Palha	190°C/15 min	Pré-tratamento com vapor + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		34,8%	
			Pré-tratamento + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		32,0%	
		-	Hidrólise enzimática do material <i>in natura</i> moído 20 mesh		8,7%	
		55°C/40 min 40 KHz/120W	Moagem a 20 mesh + Pré-tratamento com Ultrassom + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		10,7%	
			Moagem a 20 mesh + Pré-tratamento com Ultrassom + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		54,9%	
		Ensaio Branco	Moagem a 20 mesh + Extração alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		55,4%	
		-	Hidrólise enzimática do material <i>in natura</i> moído 20 mesh		19,7%	
		55°C/40 min 40 KHz/120W	Moagem a 20 mesh + Pré-tratamento com Ultrassom + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		4,4%	
Moagem a 20 mesh + Pré-tratamento com Ultrassom + Extração Alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)			47,4%			
Ensaio Branco	Moagem a 20 mesh + Extração alcalina + Hidrólise Enzimática (10% sólidos)		48,8%			

6 CONCLUSÕES

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

Das três técnicas de pré-tratamento avaliadas (explosão a vapor, impregnação a vapor e ultrassom), somente os métodos baseados em vapor foram eficientes na desagregação dos constituintes dos subprodutos sucroalcooleiros. Esses métodos foram capazes de remover grande parte da hemicelulose e uma parte da lignina, elevando a digestibilidade da celulose pelas enzimas celulolíticas. O método de pré-tratamento com ultrassom provocou o aumento da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos tanto para o agente deslignificante (soda cáustica) como para as celulases, sendo, portanto, um método não indicado, dentro da faixa das condições avaliadas, para um processo de conversão dos subprodutos sucroalcooleiros em açúcares fermentáveis.

A etapa de deslignificação com soda cáustica é essencial para elevar a digestibilidade do bagaço pré-tratado por explosão a vapor. Para os materiais lignocelulósicos pré-tratados com ultrassom, essa etapa também foi fundamental para aumentar a conversão de celulose. Entretanto, para a palha pré-tratada hidrotermicamente, a etapa de extração alcalina não teve um efeito positivo sobre a conversão enzimática da celulose.

De forma geral, observou-se que o bagaço de cana apresenta um potencial ligeiramente maior para conversão em açúcares fermentáveis em comparação com a palha de cana. Este possui menor resistência à perda de celulose durante os processos de conversão em bioetanol.

REFERÊNCIAS

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

ADITAL - Adital notícias da América Latina e Caribe. **A queimada da cana e seu impacto socioambiental**. Disponível em: <<http://www.adital.com.br/site/noticia2.asp?lang=PT&cod=26600>>. Acesso em: 05 abr. 2011.

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

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

AGRAWAL, R.; SINGH, N.R. Solar energy to biofuels. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p. 343-364, 2010.

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

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ARBEX, M. A. **Avaliação dos efeitos do material particulado proveniente da queima da plantação de cana-de-açúcar sobre a morbidade respiratória na população de Araraquara – SP**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ASADA, C.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F. Waste reduction system for production of useful materials from un-utilized bamboo using explosion followed by various conversion methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 2, p. 131-137, 2005.

ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Lei nº 11.241, de 19 set. 2002**. Disponível em: <<http://www.al.sp.gov.br/legislacao/norma.do?id=217>>. Acesso em 05 abr. 2011.

AVELLAR, B.K.; GLASSER, W.G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 205-218, 1998.

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

AZIZ, S.; SARKANEN, K. Organosolv pulping – A review. **Tappi Journal**, v. 72, n. 3, p. 169-175, 1989.

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

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.

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

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.

BOUCHARD, J.; ABATZOGLOU, N.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. Characterization of depolymerized cellulosic residues. **Wood Science Technology**, v. 24, n. 2, p. 159-169, 1990.

BRASKEM **O plástico em harmonia com a natureza**. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/plasticoverde/principal.html>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

BURANOV, A.U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops And Product**, v. 28, n. 3, p. 237–259, 2008.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 14, p. 1291–1296, 2002.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; CASTRO, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 423-429, 2006.

CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, H.; QIU, W. Key technologies for bioethanol production from lignocelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 28, n.5, p.556–562, 2010.

CHENG, J.J.; TIMILSINA, G.R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.

CHEN, W.-H.; PEN, B.-L.; YU, C.-T.; HWANG, W.-S. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n.3, p. 2916–2924, 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 06 set. 2011.

CORTEZ, L.A.B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010.

CUNHA, H.C.M. **Caracterização do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor: Identificação de inibidores potenciais de processos fermentativos e enzimáticos**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1999.

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

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

DRAUDE, K.M.; KURNIAWAN, C.B.; DUFF, S.J.B. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 2, p. 113-120, 2001.

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z. Effect of ultrasound on the extractibility of corn bran hemicelluloses. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, n. 4, p. 225-229, 2002.

EL-SAKHAWY, M.; LÖNNBERG, B.; FAHMY, Y.; IBRAHIM, A.A. Organosolv pulping. 3. Ethanol pulping of wheat straw. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 30, p. 161-174, 1996.

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

FAIRBANKS, M. Tecnologia amplia oferta e reduz custo do álcool. **Revista Química e Derivados**, n. 417, Jul. 2003. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd417/alcool1.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

FAO GBEP, **A review of the current state of bioenergy development in G8+5 countries**. FAO/GBEP, 2007. Disponível em: <http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/BIOENERGY_INFO/0805_GBEP_Report.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2011.

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

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; FELIZÓN, B.; HEREDIA, A.; RODRÍGUEZ, R.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ, A. Steam-explosion of olive Stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 1, p. 53-61, 2001.

FLOSDORF, E.W.; CHAMBERS, L.A. Chemical action of audible sound. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 55, p. 3051-3052, 1933.

FUENTES, L.L.G.; RABELO, S.C.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 5, p. 612-625, 2010.

FURTADO, A.T.; SCANDIFFIO, M.I.G.; CORTEZ, L.A.B. The Brazilian sugarcane innovation system. **Energy Policy**, v. 39, n.1, p. 156-166, 2010.

GARCÍA, A.; ALRIOLS, M.G.; LLANO-PONTE, R.; LABIDI, J. Energy and economic assessment of soda and organosolv biorefinery processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 516-525, 2011.

GARCÍA-CUBERO, M.T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1608-1613, 2009.

GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.-H.; FAN, L.T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 157-172, 1983.

GHATAK, H.R. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4042-4052, 2011.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Appl. Chem.**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GHOSE, T.K.; DAS, K. A simplified kinetic approach to cellulose-cellulase system. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 1, 55-76, 1971.

GLASSER, W.G.; WRIGHT, R.S. Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 219-235, 1998.

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

GRAY, K.A.; ZHAO, L; EMPTAGE, M Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GREGG D.J., SADDLER J.N. Factors Affecting Cellulose Hydrolysis and the Potential of Enzyme Recycle to Enhance the Efficiency of an Integrated Wood to Ethanol Process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 4, p. 375-383, 1996.

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

HAYN, M.; STEINER, W.; KLINGER, R.; STEINMÜLLER, H.; SINNER, M.; ESTERBAUER, H. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosic. In: SADDLER, J.N. (Ed.) **Bioconversion of forest and agricultural plant residues**. 1st ed. Wallingford: CABI, 1993, p. 33-72.

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

HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 1990.

HONGZHANG, C.; LIYING, L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 666-676, 2007.

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

HUBBELL, C.A.; RAGAUSKAS, A.J. Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7410-7415, 2010.

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

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

INGRAM, T.; WÖRMEYER, K.; LIMA, J.C.I.; BOCKEMÜHL, V.; ANTRANIKIAN, G.; BRUNNER, G.; SMIRNOVA, I. Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part I: Conversion of rye straw to valuable products. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5221-5228, 2011.

JEON, T.; AGBLEVOR, F.A. Characterization and fermentation of steam exploded cotton gin waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 21, n. 2, p. 109-120, 2001.

JEON, T.; ISHIZAWA, C.I.; DAVIS, M.F.; HIMMEL, M.E.; ADNEY, W.S.; JOHNSON, D.K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 1, p. 112-122, 2007.

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

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam Explosion of Sugarcane Bagasse as a Pretreatment for Conversion to Ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 277-287, 1998.

KADIMALIEV, D.A.; REVIN, V.V.; ATYKYAN, N.A.; SAMUILOV, V.D. Effect of Wood Modification on Lignin Consumption and Synthesis of Lignolytic Enzymes by the Fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 488-492, 2003.

KASTEL'YANOS, O.; SINITSYN, A.P.; VLASENKO, E.Y. Effects of various factors on the kinetics of cellulose hydrolysis by an enzyme preparation from *Penicillium verruculosum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 31, p. 425-430, 1995.

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

KELLER, F.A. Integrated bioprocess development. In: WYMAN, C.E. (Ed.) **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. 1st ed. Washington: Taylor & Francis, 1996, cap. 17, p. 381-394.

KITANI, O.; HALL, C.W. **Biomass Handbook**, 1st ed. Routledge Publisher, 1989.

KOO B.W., TREASURE T.H., JAMEEL H., PHILLIPS R.B., CHANG H.-m., PARK S. Reduction of enzyme dosage by oxygen delignification and mechanical refining for enzymatic hydrolysis of green liquor-pretreated hardwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 832-844, 2011.

LABAT, G.A.A.; GONÇALVES, A.R. Oxidation in Acidic Medium of Lignins from Agricultural Residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 151-161, 2008.

LASER M., SCHULMAN D., ALLEN S.G., LICHWA J., ANTAL JR.M.J., LYND L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LARSSON, S.; QUINTANA-SAINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by Saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 617-632, 2000.

LEE, S.H.; DOHERTY, T.V.; LINHARDT, R.J.; DORDICK, J.S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1368-1376, 2009.

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

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

LI, X.; KIM, T.H. Low-liquid pretreatment of corn stover with aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4779-4786, 2011.

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

LUCHE, J.-L. **Synthetic Organic Sonochemistry**. New York: Plenum Press, 1998.

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

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

MALHOTRA, S.L. Ultrasonic degradation of hydroxypropyl cellulose solutions in water, ethanol, and tetrahydrofuran. **Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry**, v. 17, n. 4, 601-636, 1982.

MALONEY, M.T.; CHAPMANN, T.W.; BAKER, A.J. Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetics studies of xylan and acetyl group hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 355-361, 1985.

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

MARQUARDT, W.; HARWARDT, A.; HECHINGER, M.; KRAEMER, K.; VIELL, J.; VOLL, A. The biorenewables opportunity – toward next generation process and product systems. **Current**, v. 56, n. 9, p. 2228–2235, 2010.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose utilizing Saccharomyces cerevisiae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 274-282, 2002.

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

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 Food and Science Agriculture**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society Publisher, 1994, p. 292-324.

MICHELAZZO, M.B. **Análise de sensibilidade de seis sistemas de recolhimento do palhço da cana-de-açúcar (Saccharum spp.)**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

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

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of Lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium. **Biodegradation**, v. 50, p. 101-105, 2002.

MONIRUZZAMAN, M. Saccharification and Alcohol Fermentation of Steam-Exploded Rice Straw. **Bioresource Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 111-117, 1996.

MONTANE, D.; FARRIOL, X.; SALVADÓ, J.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 261-276, 1998.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 5ª ed. New York: Willey, 2001.

MOONEY, C.A.; MANSFIELD, S.D.; BEATSON, R.P.; SADDLER, J.N. Effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 8-9, p. 644-650, 1999.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ERLAND, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MUAÉS, J.A. Maximização da geração elétrica a partir do bagaço e palha em usina de açúcar e álcool. **Revista Engenharia**, n. 483, p. 88-95, 2007. Disponível em <http://www.brasilengenharia.com.br/ed/583/Artigo_etanol_583.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2011.

MURPHY R., WOODS J., BLACK M., McMANUS MARCELLE M. Global developments in the competition for land from biofuels. **Food Policy**, v. 36, s. 1, p. S52-S61, 2011. Supplement.

NASHAWI, I.S., MALALLAH, A., AL-BISHARAH, M. Forecasting World Crude Oil Production Using Multicyclic Hubbert Model. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 1788-1800, 2010.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

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

NUNES, A.P.; POURQUIE, J. Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus Wood. **Bioresource Biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 107-110, 1996.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, 2007.

OLIVEIRA; F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, n. 1561, p.523-536, 1987.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1-3, p. 1069-1079, 2005.

PANDEY, A. et al. (Ed). **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. 1st ed. San Diego: Academic Press Publisher, 2011.

PASSOS, P.R.A. **Destinação sustentável de cascas de coco (Cocos nucifera) verde: obtenção de telhas e chapas de partículas**. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

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

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

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

ROCHA, G.J.M.; SILVA, F.T.; ARAÚJO, G.T.; CURVELO, A.A.S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1., 1997, Curitiba. **Anais...Curitiba: UFPR**. p. 3-8.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

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

RODRIGUES, S.; PINTO, G.A.S.; FERNANDES, F.A.N. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 1, p. 95–100, 2008.

ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; LÓPEZ, F.; PARAJO, J.C. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5896–5904, 2011.

ROSS, P.J. **Aplicações das Técnicas Taguchi na Engenharia da Qualidade**. 1ª ed. São Paulo: Editora McGraw-Hill, 1991.

RUIZ, H.A.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A. Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 100–107, 2012.

SAAD, M.B.W. **Avaliação Técnica e Econômica Preliminar da Produção de Etanol via Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

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

SAEMAN, J.F. kinetics of wood saccharification: Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperatures. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 43–52, 1945.

SAIDUR, R.; ABDELAZIZ, E.A.; DEMIRBAS, A.; HOSSAIN, M.S.; MEKHILEF, S. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 5, p. 2262–2289, 2011.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n.1, p. 19–27, 2012.

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

SARKANEN, K.V. Chemistry of solvent pulping. **Tappi Journal**, v. 73, n. 1., p. 215–219, 1990.

SASAKI, M.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 3, p. 301–304, 2003.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 5, p. 422–430, 2008.

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

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**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de Lund, Suécia, 2005. 58 p.

SEWALT, V.; GLASSER, W.; BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1823-1828, 1997.

SHEN, F.; SADDLER, J.N.; LIU, R.; LIN, L.; DENG, S.; ZHANG, Y.; YANG, G.; XIAO, H.; LI, Y. Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse for enzymatic hydrolysis and bioethanol production. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1542-1548, 2011.

SILVA, F.T. **Obtenção de Insumos Químicos a partir do Aproveitamento Integral do Bagaço de Cana**. 1995. 106 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 1995.

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

SINGH, A.; SMYTH, B.M.; MURPHY, J.D. A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 277-288, 2010.

SINITSYN, A.P.; GUSAKOV, A.V.; VLASENKO, E.Y. Effect of structural and physicochemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-59, 1991.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BOM, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

STROCKBURGER, P. An overview of near-commercial and commercial solvent-based pulping process. **Tappi Journal**, v. 76, n. 6, p. 71-74, 1993.

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

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

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUN, X.F.; XU, F.; SUN, R.C.; FOWLER, P.; BAIRD, M.S. Characteristics of degraded cellulosic polymers obtained from steam-exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 1, p. 97-106, 2005a.

SUN, X.F.; XU, F.; SUN, R.C.; GENG, Z.C.; FOWLER, P.; BAIRD, M.S. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 15-26, 2005b.

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

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007b.

TABKA, M.G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 897-902, 2006.

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

THOMPSON, H.; DORAISWAMY, L.K. Sonochemistry: Science and Engineering. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 4, p. 1215-1249, 1999.

U.S. Energy Information Administration - EIA. **International Energy Outlook 2009**. Disponível em: <<http://www.eia.gov/forecasts/ieo/index.cfm>> Acesso em: 23 ago. 2010.

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

WALKER, L.P.; WILSON, D.B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 3-14, 1991.

WANG, X.; FANG, G.; HU, C.; DU, T. Application of Ultrasonic Waves in Activation of Microcrystalline Cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, n. 5, p. 2762-2767, 2008.

WYMAN, C.E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, n. 1, p. 189-226, 1999.

WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 3-16, 1994.

WYMAN, C.E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. In: _____. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. 1st ed. Washington: Taylor & Francis, 1996, p. 1-18.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 2026-2032, 2005.

YOUNG, F.R. **Cavitation**. 1st ed. New York: McGraw-Hill, 1989. 434 p.

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

YU, Z.; JAMEEL, H.; CHANG, H.-m.; PARK, S. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9083–9089, 2011.

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

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

APÊNDICE A

Dedução da equação de conversão total de celulose

A equação de conversão total de celulose é definida como a massa de celulose convertida pela etapa de sacarificação enzimática dividida pela massa inicial de celulose do material lignocelulósico *in natura*. Portanto, a sua dedução é feita a partir de balanço de massa de todas as etapas envolvidas no processo em questão. Veja o esquema a seguir:

Sendo:

- M_0 : massa inicial de lignocelulósico;
- M_1 : massa de lignocelulósico pré-tratado;
- M_2 : massa de polpa do lignocelulósico pré-tratado;
- M_3 : massa residual de celulose não convertida;
- R_1 : rendimento mássico da etapa de pré-tratamento;
- R_2 : rendimento mássico da etapa de deslignificação
- CC: conversão de celulose da etapa de sacarificação.

Pela definição de conversão total de celulose (CCT):

$$CCT = \frac{\text{massa convertida de celulose}}{\text{massa inicial celulose}} \times 100 \quad \text{eq. A1}$$

Sendo que: Massa convertida de celulose = $M_2 \times y_2 \times CC$
 Massa inicial de celulose = $M_0 \times y_0$

$$CCT = \frac{M_2 \cdot y_2 \cdot CC}{M_0 \cdot y_0} \times 100 \quad \text{eq. A2}$$

Massa de polpa do lignocelulósico pré-tratado (M_2) = $M_1 \times R_2$

Massa de lignocelulósico pré-tratado (M_1) = $M_0 \times R_1$

Portanto:

$$M_2 = M_0 \times R_1 \times R_2 \quad \text{eq. A3}$$

Substituindo a eq. A3 em A2, tem-se:

$$CCT = \frac{M_0 \cdot R_1 \cdot R_2 \cdot y_2 \cdot CC}{M_0 \cdot y_0} \times 100$$

Cortando-se os M_0 tem-se a equação de conversão total de celulose:

$$CCT = \frac{R_1 \cdot R_2 \cdot y_2 \cdot CC}{y_0} \times 100 \quad \text{eq. A4}$$

Sendo que: y_0 : teor de celulose do material *in natura*;
 y_2 : teor de celulose da polpa de lignocelulósico pré-tratado.

De forma similar, para calcular a conversão total de celulose considerando uma etapa de pré-tratamento e uma de sacarificação, basta remover o R_2 da equação A4 e substituir y_2 por y_1 , ficando da seguinte forma:

$$CCT = \frac{R_1 \cdot y_1 \cdot CC}{y_0} \times 100 \quad \text{eq. A5}$$

Para o caso do ensaio em que somente há uma etapa de deslignificação e uma de sacarificação, tem-se:

$$CCT = \frac{R_2 \cdot y_2 \cdot CC}{y_0} \times 100 \quad \text{eq. A6}$$