UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PAULA JULIÃO ESTEVES

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído em reator piloto aquecido por vapor direto

Lorena
2011

PAULA JULIÃO ESTEVES

Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído em reator piloto aquecido por vapor direto

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Lorena

2011

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.

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Esteves, Paula Julião
Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído em reator piloto aquecido por vapor direto / Paula Julião Esteves ; orientador Walter de Carvalho. – 2011.

93p. : il.

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

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Ácido sulfúrico 3. Hemicelulose 4. Xilose 5. Celulose 6. Hidrólise enzimática. I. Título

664.113 - CDU

Aos meus amados pais, Renato e Cecília pelo o incentivo, apoio e conforto nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Walter de Carvalho, pela orientação, oportunidade, dedicação, ensinamentos e paciência durante todo o período de trabalho.

Ao professor João Batista pela infraestrutura gentilmente concedida para a secagem do bagaço de cana-de-açúcar e para a realização dos experimentos de pré-tratamento no reator piloto.

Ao Birão (*in memoriam*) pela ajuda nos experimentos conduzidos no reator.

Aos amigos de laboratório, Victor, Ceceu, Germano, Renato, Fernanda, Jose, Débora, Michel, Sérgio, Robson, Dani Gurpi, Dani Cortês, Djalma e professora Adriane Milagres por estarem sempre dispostos a ajudar e pelos bons momentos de convivência.

Aos demais amigos de departamento pelos momentos descontração e cumplicidade.

À minha irmã, Mari, pelo o otimismo e incentivo.

Às queridas amigas santistas que, mesmo de longe, me animaram e confortaram durante o período do trabalho.

Ao Leo, que por muitas vezes compreendeu minha ausência, pela paciência, amor e carinho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

ESTEVES, P.J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2011.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar como algumas condições de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído influenciam a distribuição granulométrica do bagaço de cana, a composição química dos sólidos pré-tratados e hidrolisados hemicelulósicos, além da digestibilidade enzimática dos sólidos pré-tratados. Para isso, previamente, uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi caracterizada quanto suas composições percentuais; a distribuição granulométrica de suas fibras também foi avaliada antes e após o pré-tratamento. O pré-tratamento do bagaço com H_2SO_4 diluído foi realizado em reator piloto, aquecido por vapor direto, com capacidade de 100 L, onde o teor inicial de sólidos foi fixado em 15% (p/p). A temperatura (131,91–168,09 °C), tempo de residência (11,90–48,09 min) e concentração ácida (0,19 – 3,81 p/p) variaram de acordo com um planejamento fatorial 2^3. Após o pré-tratamento, os bagaços pré-tratados e hidrolisados hemicelulósicos foram caracterizados quanto suas composições químicas. A composição química dos bagaços *in natura* e pré-tratados, assim como a composição química dos hidrolisados, foi determinada por gravimetria, espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com a condição de pré-tratamento, os teores de celulose, hemicelulose e lignina nos bagaços pré-tratados diferiram substancialmente sendo que a maior variação foi observada para hemicelulose (0,14–17,62 %). Os três fatores avaliados no pré-tratamento influenciaram a composição química do bagaço pré-tratado, sendo que a variável com maior poder de influência no teor de celulose, hemicelulose e lignina dos sólidos foi a concentração ácida, seguida da temperatura e tempo de reação. Xilose foi o açúcar predominante nos hidrolisados hemicelulósicos variando de 1,43 a 21,05 g/L, de acordo com o planejamento. A concentração de furfural variou entre 0,08 e 4,68 g/L. Condições severas de pré-tratamento acarretaram na maior remoção de hemicelulose dos bagaços pré-tratados, porém nestas mesmas condições foram encontradas baixas concentrações de xilose e altas concentrações de furfural nos hidrolisados. A concentração de xilose no hidrolisado se mostrou dependente da temperatura e da concentração ácida. A variável com maior influência na formação de furfural foi a temperatura, seguida pela concentração ácida e tempo. A digestibilidade enzimática dos bagaços obtidos de acordo com planejamento experimental em 24 h variou de 25,35 a 63,76%, conforme a composição química dos sólidos. A temperatura de pré-tratamento foi o fator que exerceu maior influência na conversão da celulose dos sólidos. Com o intuito de avaliar o efeito da lavagem dos sólidos na digestibilidade enzimática da celulose, bagaços pré-tratados obtidos nas condições mais branda e severa de pré-tratamento, lavados e não-lavados, foram submetidos à sacarificação enzimática. A sacarificação de bagaços não-lavados foi prejudicada pela presença de inibidores nos hidrolisados hemicelulósicos, variando entre 0- 23,9%, em 72h. As condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar que maximizam a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado são diferentes. O pré-tratamento com H_2SO_4 diluído acarretou na diminuição do tamanho das partículas do bagaço de cana.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Ácido sulfúrico. Hemicelulose. Xilose, Celulose, Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

ESTEVES, P.J. **Pre-treatment of sugarcane bagasse with dilute H_2SO_4 in pilot reactor heated by direct steam.** 2011. 93p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2011.

This study aimed to evaluate how certain pretreatment conditions of sugarcane bagasse with dilute H_2SO_4 influence the size distribution of sugarcane bagasse, the chemical composition of solids pretreated and hemicellulosic hydrolysate, as well the enzymatic digestibility of pretreated solids. For that, previously, a sample of *in natura* sugarcane bagasse was characterized in terms of chemical composition; the size distribution of fibers was also evaluated before and after the pretreatment. The experiments of pretreatment of bagasse with dilute H_2SO_4 were conducted in a pilot reactor, heated by direct steam, with a capacity of 100 L, where the initial solids content was fixed at 15% (w / w). The temperature (131.91 to 168.09 ° C), residence time (11.90 to 48.09 min) and acid concentration (0.19 to 3.81 w / w) varied according to a factorial design 2^3 . After pretreatment, the pretreated bagasse and hemicellulosic hydrolysates were characterized in terms of their chemical compositions. The chemical composition of *in natura* and pretreated bagasse , as well the chemical composition of the hydrolysates, was determined by gravimetry, spectrophotometry and high-efficiency liquid chromatography. According to the condition of pretreatment, cellulose, hemicellulose and lignin content in pretreated bagasse differed substantially, and the major variation was observed for hemicellulose content (0.14 to 17.62%).The three factors evaluated in the pretreatment influenced the chemical composition of pretreated bagasse, and the variable with greatest influence on the content of cellulose, hemicellulose and lignin concentration of solids was acid concentration, followed by temperature and reaction time.. Xylose was the predominant sugar in hemicellulose hydrolysates ranging from 1.43 to 21.05 g / L, according to the experimental design. Furfural concentration varied between 0.08 and 4.68 g / L. Severe conditions of pretreatment resulted in greater removal of hemicellulose from pretreated bagasse, but under these conditions were found low concentrations of xylose and high concentrations of furfural in the hydrolysates. The concentration of xylose in the hemicellulosic hydrolyzate were dependet of temperature and acid concentration. The variable with greatest influence on the formation of furfural was temperature, followed by acid concentration and time. The enzymatic digestibility of the pretreated solids, obtained according to experimental design, in 24 h, ranged from 25.35 to 63.76% depending on the chemical composition of solids. The temperature of the pretreatment was the factor that showed greater influence on the conversion of cellulose solids. In order to evaluate the effect of washing the solids in the enzymatic digestibility of cellulose, pretreated bagasses obtained in milder and severe conditions of pretreatment, non-washed and washed solids, were submitted to enzymatic saccharification. Saccharification of non-washed solids was impaired by the presence of inhibitors in hemicellulosic hydrolysates, ranging from 0 to 23.9% in 72h. The pretreatment conditions of sugarcane bagasse that maximize the concentration of xylose in the hemicellulosic hydrolyzate and enzymatic saccharification of pretreated bagasse are different. Pretreatment with dilute H_2SO_4 resulted in the decrease of particle size of bagasse.

Keywords: Sugarcane bagasse. Sulfuric acid. Hemicellulose. Xylose. Cellulose. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores reais e codificados das variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 completo composto com 6 pontos centrais 38

Tabela 2 – Determinação das atividades enzimáticas e teor de proteínas do extrato enzimático II (SANTOS,2010) 40

Tabela 3–Composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo..... 46

Tabela 4 – Teores percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar 47

Tabela 5 – Composição química dos bagaços pré-tratados e hidrolisados hemicelulósicos obtidos de acordo com o planejamento experimental 50

Tabela 6 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado 55

Tabela 7 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado.....56

Tabela 8 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado.....57

Tabela 9 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado 58

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de lignina no bagaço pré-tratado 60

Tabela 11 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de lignina em função das condições operacionais de pré-tratamento 61

Tabela 12 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico 62

Tabela 13 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico em função das condições operacionais de pré-tratamento 63

Tabela 14 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico 65

Tabela 15 – Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico em função das condições operacionais de pré-tratamento 66

Tabela 16 – Digestibilidade enzimática de amostras selecionadas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado lavado (SL) e não lavado (SNL) em 24, 48 e 72 horas..... 70

Tabela 17 – Rendimentos de sacarificação enzimática das amostras de bagaço pré-tratadas de acordo com o planejamento experimental 74

Tabela 18 – Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração sacarificação de bagaços pré-tratados em 24h, em função das condições operacionais de pré-tratamento 76

Tabela 19 – Análise de variância do modelo proposto para a predição do rendimento de sacarificação de bagaços pré-tratados com H_2SO_4, em 24h, em função das condições operacionais de pré-tratamento 77

Tabela 20 – Predições pontuais das variáveis dependentes em função das variáveis independentes de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído.....79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição nacional de plantações de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar,etanol e bioeletricidade 18

Figura 2 – (1) Esqueleto da cadeia de celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) Arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar 20

Figura 3 – Estruturas dos alcoóis precursores da lignina 21

Figura 4 – Diferentes tipos de ligações presentes em lignina tipo Guaiacil (G) 22

Figura 5 – Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos 24

Figura 6 – Ação sinérgica de endoglucanase, exoglucanase e β-glicosidase em uma fibrila elementar de celulose 31

Figura 7 – Perfil de absorção de luz dos extratos aquosos e alcoólicos na região do UV e visível 45

Figura 8 – Perfil de absorção de luz dos extratos aquosos e alcoólicos na região do UV...46

Figura 9 – Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* 48

Figura 10 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de celulose da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min 57

Figura 11 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de hemicelulose da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min 59

Figura 12 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de lignina da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min 62

Figura 13 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na concentração de xilose do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento 64

Figura 14 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na concentração de furfural do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min 67

Figura 15 – Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado à 140 °C/ 1% ácido p/p/ 20 minutos e bagaço pré-tratado a 160 °C/ 3% ácido p/p/ 40 minutos 68

Figura 16 – Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na conversão de celulose em glicose do bagaço de cana-de-açúcar obtido após o pré-tratamento 78

Figura 17 – Superposição das curvas de nível que relacionam o rendimento de sacarificação do bagaço pré-tratado em 24 horas de hidrólise e a concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico com a temperatura e a concentração de ácido utilizadas no pré-tratamento 80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1. Cana-de-açúcar 17
2.2. Bagaço de cana-de-açúcar 18
2.2.1. Celulose 19
2.2.2. Hemicelulose 20
2.2.3. Lignina 21
2.2.4. Constituintes encontrados em menores proporções 23
2.3. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos 23
2.3.1. Pré-tratamentos físicos 25
2.3.1.1. Moagem 25
2.3.1.2. Irradiação 25
2.3.1.3. Explosão a vapor 26
2.3.2. Pré-tratamentos químicos 26
2.3.2.1. Organosolve 26
2.3.2.2. Ozonólise 27
2.3.2.3. Pré-tratamento alcalino 27
2.3.2.4. Pré-tratamento ácido 28
2.3.3. Pré-tratamento biológico 29
2.4. Sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos 30
3. OBJETIVOS 33
4. MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1. Bagaço de cana-de-açúcar 34
4.1.1. Granulometria 34
4.1.2. Extração 34
4.1.3. Composição 35
4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído 37
4.2.1. Composição química dos bagaços pré-tratados 39
4.2.2. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos 39
4.2.3. Cálculo do fator de severidade combinada 39
4.3. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído 40
4.3.1. Efeito da lavagem dos sólidos previamente à sacarificação enzimática 41
4.3.2. Sacarificação enzimática dos sólidos submetidos a lavagem 42

4.3.3. Cálculo da eficiência da sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados com H_2SO_4 diluído 42
4.4. Análise estatística dos dados experimentais 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
5.1. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar 44
5.1.1. Composição 44
5.1.2. Granulometria 48
5.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído 49
5.2.1. Análise estatística dos dados experimentais 53
5.2.1.1. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado 55
5.2.1.2. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado 57
5.2.1.3. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de lignina no bagaço pré-tratado 60
5.2.1.4. Elaboração do modelo empírico para predição da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico 62
5.2.1.5. Elaboração do modelo empírico para predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico 64
5.3. Caracterização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído 67
5.4. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com H_2SO_4 diluído 69
5.4.1. Efeito da lavagem dos sólidos previamente à sacarificação enzimática 70
5.4.2. Sacarificação enzimática dos sólidos submetidos a lavagem 73
5.4.2.1. Elaboração do modelo empírico para predição da digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado 76
5.5. Análise global dos resultados 78
5.6. Continuação do trabalho 81
6. CONCLUSÕES 82
REFERÊNCIAS 83

1. INTRODUÇÃO

O aumento da atividade industrial e o crescimento populacional são fatores que influenciam e promovem o aumento do efeito estufa no planeta. Devido às atuais discussões internacionais sobre mudanças climáticas e aquecimento global, torna-se importante a busca por novas fontes renováveis de energia, como o etanol. Neste sentido, torna-se importante aprimorar e diversificar a produção deste combustível limpo em contraposição a utilização de combustíveis fósseis, que além de serem recursos limitados, são poluidores.

No Brasil, etanol é produzido a partir do processamento da cana de açúcar e consiste, tradicionalmente, em três etapas: moagem da cana para obtenção do caldo rico em sacarose, seguida pela fermentação microbiana do caldo e finalmente destilação do vinho rico em etanol. A etapa de moagem da cana resulta em um subproduto denominado bagaço de cana-de-açúcar. Este material lignocelulósico é normalmente utilizado pelas usinas para geração de energia térmica e elétrica.

De natureza lignocelulósica, o bagaço de cana é composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, além de constituintes menores (extrativos e não extrativos). As frações principais estão associadas entre si e ligadas por ligações moleculares formando um complexo estável e recalcitrante à degradação biológica. Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos na fração celulósica e hemicelulósica também representam substratos para fermentação microbiana a etanol, denominado neste caso etanol de segunda geração. O aproveitamento deste subproduto pelas usinas permitiria o aumento da produção de etanol sem, no entanto, aumentar a demanda por mais cana-de-açúcar.

A produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana envolve três etapas que demandam ainda pesquisa e desenvolvimento: pré-tratamento do bagaço, hidrólise enzimática da celulose e fermentação de pentoses. O pré-tratamento tem por objetivo desestabilizar o complexo celulose-hemicelulose-lignina, retirando hemicelulose e/ou lignina e permitindo o acesso das enzimas celulolíticas à celulose para a sua sacarificação. Os processos de pré-tratamento são divididos, basicamente, em físicos, químicos e biológicos. Entre eles, o pré-tratamento com ácidos diluídos tem sido objeto de diversos estudos. Este pré-tratamento proporciona a solubilização da hemicelulose e,

conseqüentemente, enriquece a fração sólida resultante em celulose e lignina. Além da fração sólida, este tipo de pré-tratamento gera uma fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) onde são encontradas altas concentrações de açúcares monoméricos.

Para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído, a definição de condições operacionais tais como concentração ácida, temperatura e tempo de residência no reator é essencial para o sucesso do processo de conversão, tanto em termos de recuperação e fermentabilidade dos açúcares hemicelulósicos contidos no hidrolisado quanto em termos de sacarificação enzimática da celulose contida na fração sólida.

Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar como algumas condições operacionais de pré-tratamento do bagaço de cana com H_2SO_4 diluído, conduzido em um reator piloto aquecido por vapor direto, especificamente temperatura, concentração ácida e tempo de residência, influenciam a distribuição granulométrica, composição química do bagaço pré-tratado (em termos de conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina) e sua digestibilidade enzimática, além da concentração de xilose e formação de furfural no hidrolisado hemicelulósico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente à classe Monocotiledônea, Ordem Cyperales, família Poaceae e gênero *Saccharum*. As espécies de cana-de-açúcar pertencentes a este gênero somam mais de trinta. É uma planta ereta, perene, rizomatosa. Os colmos são cilíndricos, sem pêlo e tricomas, de coloração variável e, internamente, com feixes vasculares inteiramente primários e amplamente dispersos. Os nós apresentam-se protuberantes ou constritos. As folhas da cana-de-açúcar são simples, alternadas e lanceoladas (EMBRAPA, 2010).

As plantações da cana-de-açúcar no Brasil ocupam cerca de 7 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do país, que é o maior produtor mundial seguido por Índia, Tailândia e Austrália. Planta-se cana no Centro-Sul e no Norte-Nordeste do Brasil, o que permite dois períodos de safra e produção de álcool durante o ano todo (UNICA, 2010).

O mapa abaixo (Figura 1) mostra em vermelho as áreas onde se concentram as plantações de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade. Observa-se que a região Centro-Sul possui uma maior concentração de plantações e usinas de processamento em relação a região Norte-Nordeste. Em relação à área total, o estado de São Paulo é responsável por 54,23% (4.357,01 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 8,1% (649,94 mil hectares), Paraná com 7,25% (582,32 mil hectares) e Goiás com 7,46% (599,31 mil hectares) (CONAB, 2011).

Segundo o último relatório da CONAB, publicado em janeiro de 2011, a previsão de produção total de cana-de-açúcar a ser moída pela indústria sucroalcooleira na safra de 2010/11 é de 624,99 milhões de toneladas e pode representar um aumento de produção em 3,40% em relação à produção obtida na safra anterior (2009/10) que foi 604,51 milhões de toneladas (CONAB, 2011).

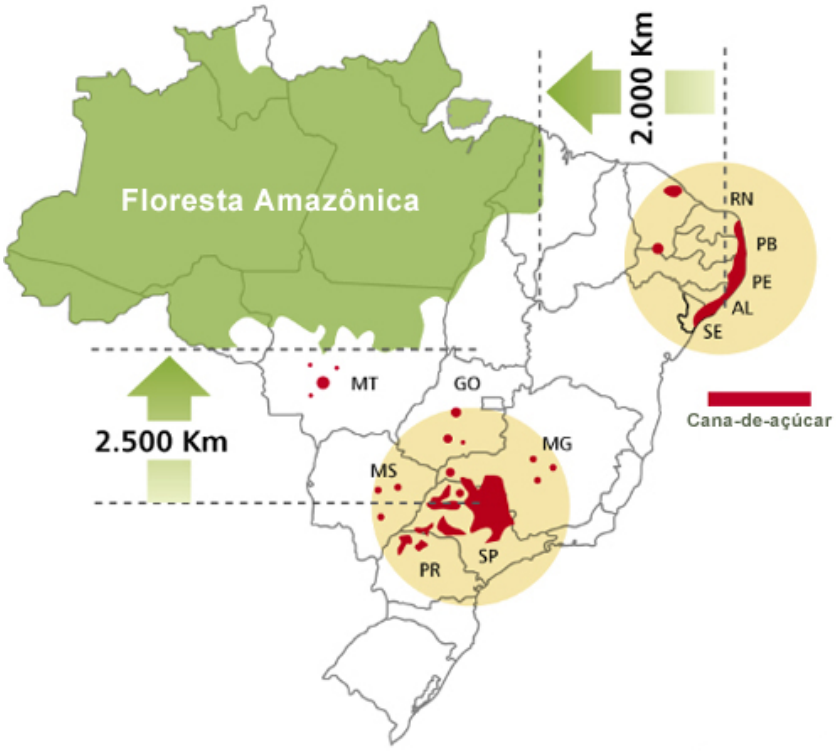

Figura 1. Distribuição nacional de plantações de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade (UNICA, 2010).

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto fibroso de natureza lignocelulósica proveniente dos processos de extração do suco, rico em sacarose, da cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000). Este subproduto geralmente é queimado para a geração de energia para as próprias indústrias (CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

Apresenta grande heterogeneidade morfológica, sendo constituído principalmente de fibras (função estrutural), vasos (elementos de condução) e parênquima (função de armazenamento) (SANJUAN et al., 2001).

É formado por três constituintes principais (celulose, hemicelulose e lignina), os quais estão intimamente associados, além de constituintes encontrados em menores proporções (extraíveis e não extraíveis) (CUNHA, 1999; PANDEY et al., 2000).

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares derivados da celulose e da hemicelulose contida no bagaço de cana-de-açúcar constituem os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol pelas usinas sucro-alcooleiras, aumentando a produção deste

combustível limpo e versátil sem, no entanto, aumentar a demanda por mais cana-de-açúcar (CARPITA, 1996; RAMOS, 2003; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007).

2.2.1. Celulose

A celulose é um polissacarídeo formado por unidades do monossacarídeo β-D-glicose, que se ligam dando origem a um polímero linear. Para a formação do polímero de celulose, acontecem reações de desidratação entre a hidroxila do carbono 1 da β-D-glicose e a hidroxila do carbono 4 de outra β-D-glicose, dando origem a um polímero formado exclusivamente por unidades de β-D-glicose em que o carbono 6 encontra-se alternado, ora para cima, ora para baixo (Figura 2), formando uma cadeia linear (OKAMURA, 1991; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991; FENGEL; WEGENER, 1989).

As cadeias de celulose tendem a formar pontes de hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares. As interações intramoleculares são responsáveis pela rigidez das cadeias unitárias e as interações intermoleculares promovem a formação da fibrila elementar (Figura 2). Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (D'ALMEIDA, 1988; RAMOS, 2003; ZHANG; LYND, 2004).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, chamadas de regiões cristalinas, e regiões menos ordenadas, onde as cadeias apresentam orientação randômica, chamadas de regiões amorfas (DING; HIMMEL, 2006; MATTHEWS et al., 2006).

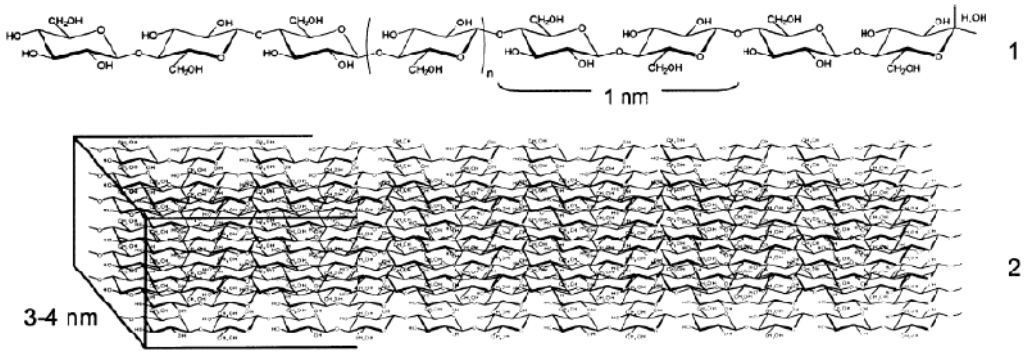

Figura 2. (1) Esqueleto da cadeia de celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) Arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar (RAMOS, 2003).

2.2.2. Hemicelulose

O termo hemicelulose refere-se a um conjunto de polissacarídeos de baixa massa molar, os quais estão intimamente associados com a celulose nos tecidos das plantas. Enquanto a celulose é um homopolissacarídeo composto exclusivamente de unidades de D-glicose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos cuja composição varia entre as seguintes unidades de açúcares e derivados: β-D-xilose, β-D-manose, β-D-glicose, α-L-arabinose, α-D-galactose, ácido β-D-glucurônico, ácido β-D-galacturônico e ácido α-D-4-0-metilglucurônico (D'ALMEIDA, 1988).

Algumas unidades de açúcar possuem apenas cinco átomos de carbono, sendo, portanto, denominadas pentoses; outras, porém, possuem seis átomos de carbono, sendo então denominadas hexoses. Os polímeros firmados pela condensação de pentoses são chamados de pentosanas, e os formados por hexoses, hexosanas.

Hemiceluloses de folhosas (madeiras duras) são do tipo glucuronoxilanas e glucomananas. Já as polioses de coníferas (madeiras moles) são constituídas principalmente de galactoglucomananas e glucomananas. Gramíneas, por sua vez, possuem um tipo de hemicelulose que é basicamente uma cadeia principal de xilana com grupos pendentes de acido 4-metil glucuronico e arabinose, sendo denominada glucuronoarabinoxilana (GIRIO et al., 2010; RAMOS, 2003; CARPITA, 1996).

2.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula que confere rigidez à parede da célula gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e tensão (FENGEL; WEGENER, 1989). A lignina é uma macromolécula natural cuja estrutura provém da polimerização radicalar, iniciada por enzimas, dos seguintes precursores primários: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-para-cumarílico (Figura 3) (CARVALHO et al., 2009).

Figura 3. Estruturas dos alcoóis precursores da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).

Essa polimerização gera macromoléculas complexas com diferentes tipos de ligações em todas as direções (FENGEL; WEGENER, 1989). Os tipos mais comuns de ligações entre as unidades básicas da lignina são β-O-4 e α-O-4 (50-65%), β-1 (9-15%), β-5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β-β (2-5%) (Figura 4).

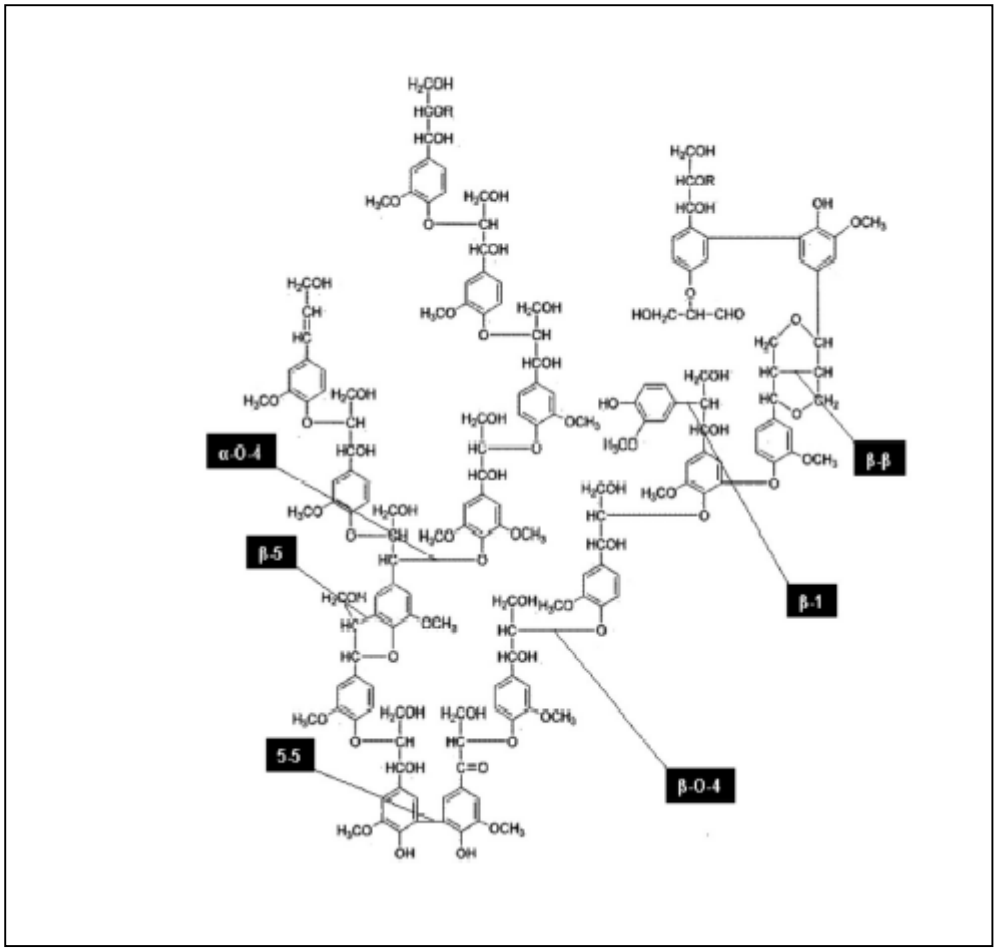

Figura 4. Diferentes tipos de ligações presentes em lignina tipo Guaiacil (G) (CARVALHO et al., 2009).

A lignina de coníferas é composta quase que exclusivamente por resíduos derivados do álcool coniferílico (lignina do tipo G), enquanto que a lignina de folhosas contem resíduos derivados dos alcoóis coniferílico e sinapílico (lignina do tipo GS). Em contraste, as ligninas derivadas de gramíneas contem os três precursores básicos (lignina do tipo HGS) (CARVALHO et al., 2009; RAMOS, 2003). Como conseqüência, as ligninas das folhosas possuem alta quantidade de grupos metoxilícos, são menos condensadas e mais susceptíveis a conversão química do que as ligninas derivadas de coníferas (RAMOS, 2003; CARVALHO et al., 2009).

2.2.4. Constituintes encontrados em menores proporções

Todas as espécies de vegetais contêm, além da celulose, da hemicelulose e da lignina, quantidades variáveis de outras substâncias, sumariamente citadas como constituintes menores. Esses constituintes menores incluem os mais diversos compostos orgânicos e inorgânicos, sendo que nenhuma espécie de planta contém todos os compostos possíveis ou mesmo todas as diferentes classes de compostos (BROWNING, 1967; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991).

Os constituintes menores dividem-se em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis com água ou solventes orgânicos neutros, ou ainda volatilizados em presença de vapor. A segunda classe engloba materiais que não são extraíveis comumente com os agentes mencionados, como, por exemplo, alguns compostos inorgânicos, proteínas e substâncias pécticas (D'ALMEIDA, 1988). Tais compostos são freqüentemente responsáveis por características como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas. Sua composição e quantidade relativa dependem de diversos fatores, tais como espécie, idade da planta e região de ocorrência (KAI, 1991; D'ALMEIDA, 1988).

2.3. Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Os componentes estruturais contidos na parede celular dos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) são fortemente associados, formando um complexo estável e recalcitrante. A celulose contida nos materiais lignocelulósicos é circundada por uma matriz de hemicelulose e lignina, que confere proteção ao polissacarídeo (FENGEL; WEGENER, 1989). Esta matriz é uma barreira física que impede o acesso das enzimas celulolíticas à celulose. A cristalinidade das fibrilas elementares de celulose, por sua vez, limita a velocidade de hidrólise enzimática deste polissacarídeo (GAMEZ et al., 2006; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ZHU et al., 2008).

Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos têm a finalidade de reduzir a estabilidade das fibras, sendo utilizados com o intuito de reduzir a interação entre celulose,

hemicelulose e lignina, solubilizando a hemicelulose e/ou a lignina, e tornando o substrato mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG; NAGWANI; HOLTZAPPLE, 1998; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), como exemplificado na Figura 5.

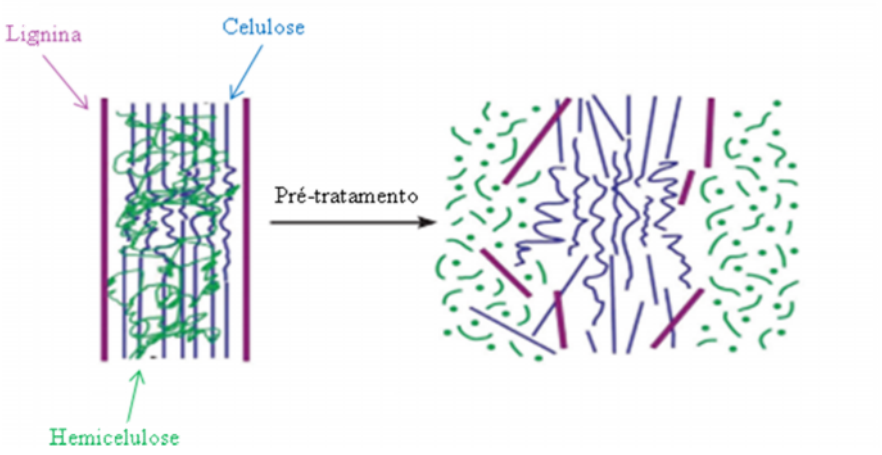

Figura 5. Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (Adaptado de Canilha et al., 2010).

Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios: evitar a necessidade de redução do tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação de compostos que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos, minimizar a demanda de energia (HOLTZAPPLE; HUMPHREY, 1984; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Estas propriedades, incluindo o baixo custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de ser reciclável e a geração de co-produtos de alto valor agregado, fornecem uma base de comparação para as várias opções de pré-tratamento (WYMAN, 1994; DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996; HINMAN et al., 1992; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Os métodos de pré-tratamento são divididos em três categorias básicas: físicos, químicos e biológicos. A combinação de métodos distintos é comum na conversão de diferentes materiais lignocelulósicos em diferentes produtos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Nos subtópicos seguintes, serão apresentados e descritos alguns exemplos de pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos.

2.3.1. Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, seja por trituração, moagem ou esfarelamento, ou pela ausência de reagentes químicos no processo, como irradiação e explosão a vapor (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996).

Em escala industrial, pré-tratamentos físicos como moagem e irradiação se tornam inviáveis pelo seu alto custo (SUN; CHENG, 2002; ALVIRA et al., 2010).

2.3.1.1. Moagem

Um dos pré-tratamentos físicos mais comuns é o de moagem. Este processo permite o aumento da susceptibilidade da celulose à hidrolise enzimática pela redução de tamanho das partículas do material e redução do grau de cristalinidade do lignocelulósico (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Zheng e colaboradores (2006), estudando o efeito do tamanho de partículas de forragem de milho na hidrólise enzimática, relataram que, sem nenhum pré-tratamento químico ou térmico, a sacarificação enzimática deste material com partículas com tamanhos de 53-57 µm foi 1,5 vezes mais produtiva que aquela conduzida em partículas maiores com tamanhos de 425-710 µm.

2.3.1.2. Irradiação

O processo consiste na emissão de raios gama, feixe de elétrons ou microondas no material lignocelulósico. Este tipo de pré-tratamento altera a estrutura da molécula, mas requer alta quantidade de energia para produzir a radiação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

2.3.1.3. Explosão a vapor

Uma das maneiras de se fazer pré-tratamentos eficientes é fazer com que o material lignocelulósico sofra um forte impacto de descompressão. No tratamento a vapor, o material é levado a temperaturas de 160 a 200 °C e pressões de 5 a 10 Kgf/cm² e, depois de um curto período de tempo, de 1 a 10 min, o material é descomprimido bruscamente (RAMOS, 2003; MOSIER et al., 2005). Sob a ação da temperatura, os agrupamentos acetil presentes na hemicelulose são hidrolisados a acido acético que catalisa a quebra de ligações do complexo lignina-hemicelulose-celulose, provocando a solubilização da hemicelulose (HAN et al, 2010). O aumento da severidade do processo (temperatura e/ou tempo) favorece a hidrólise da celulose e hemicelulose, promovendo também reações de desidratação das pentoses e hexoses em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. (RAMOS, 2003; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Apesar de provocar reações químicas no material lignocelulósico, o método de explosão a vapor pode ser considerado como pré-tratamento físico uma vez que não são adicionados reagentes químicos (ácidos, básicos e/ou oxidantes) ao processo. Entretanto, a adição de catalisadores, como H_2SO_4 e SO_2, pode aumentar a susceptibilidade dos polissacarídeos à hidrólise, além de permitir a diminuição da temperatura de trabalho e do tempo de residência usados no pré-tratamento. Tais artifícios, amplamente descritos na literatura (GALBE; ZACCHI, 2002; BAUDEL; ZAROR; ABREU, 2005; MARTIN et al., 2002; PITARELO, 2007), caracterizam a explosão a vapor como um pré-tratamento físico-químico.

2.3.2. Pré-tratamentos químicos

2.3.2.1. Organosolve

No processo organosolve, um solvente orgânico ou uma mistura aquosa de solventes orgânicos com sais inorgânicos são usados para solubilizar a lignina e quebrar ligações na hemicelulose. Os solventes orgânicos utilizados no processo incluem metanol,

etanol, acetona, etilenoglicol, trietilenoglicol e álcool tetrahidrofurfurílico (CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990). Uma série de catalisadores, principalmente ácidos orgânicos, podem ser adicionados ao processo organosolve, contribuindo para a desestabilização da biomassa lignocelulósica, como revisado por Johansson; Aaltonen; Yline (1987). A redução de custos deste processo requer a recuperação dos solventes orgânicos, por métodos envolvendo drenagem, evaporação, condensação e reciclagem. Esta remoção de solventes a partir do sistema torna-se necessária, uma vez que estes podem inibir o crescimento de microrganismos, e também a hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

2.3.2.2. Ozonólise

Ozonólize é um pré-tratamento químico de biomassa lignocelulósica e sua ação se deve à exposição do material a ozônio, um poderoso agente oxidante. O principal efeito deste pré-tratamento é a remoção de lignina e parte da hemicelulose, favorecendo o aumento da digestibilidade enzimática do material pré-tratado (QUESADA; RUBIO; GOMEZ et al., 1999; GARCIA-CUBERO et al., 2009). O processo geralmente é conduzido à temperatura ambiente e não leva à formação de compostos inibidores de fermentação microbiana, como furfural e hidroximetilfurfural. Entretanto, por vias reações de degradação, o processo de ozonólise pode gerar ácidos orgânicos, como ácido carboxílico e fórmico (VIDAL; MOLINIER, 1988). A principal desvantagem deste pré-tratamento é que sua aplicação em larga escala pode ter um custo alto, uma vez que são requeridas grandes quantidades de ozônio (SUN; CHENG, 2002; GARCIA-CÚBERO et al., 2009).

2.3.2.3. Pré-tratamento alcalino

Bases como $Ca(OH)_2$, KOH, NH_4OH e NaOH também podem ser utilizadas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. A ação alcalina é atribuída à saponificação de ligações ésteres entre a hemicelulose e a lignina (CARRILLO et al., 2005). Álcalis também

removem grupos acetil da hemicelulose, reduzindo o impedimento espacial à enzimas hidrolíticas e melhorando a digestão enzimática de carboidratos (KONG; SOLTES, 1992). Além disso, o tratamento com NaOH causa o inchamento interno na estrutura celulósica e conseqüentemente aumenta a área superficial. O inchamento reduz a interação entre lignina e carboidratos, causando ainda rompimento na estrutura da lignina que é solúvel nestas condições (FENGEL; WEGNER, 1989).

2.3.2.4. Pré-tratamento ácido

Ácidos concentrados como sulfúrico, clorídrico, nítrico e fosfórico podem ser utilizados em processos de sacarificação de materiais lignocelulósicos. Apesar de serem poderosos agentes na sacarificação da celulose e da hemicelulose, trabalhar com ácidos concentrados requer cuidados especiais uma vez que são tóxicos e perigosos, além de requerer reatores, tubulações e maquinários resistentes à corrosão. A principal desvantagem é que a viabilidade econômica do processo depende fortemente da recuperação eficiente destes ácidos ao final da hidrólise (GÍRIO et al., 2010; ALVIRA, et al., 2010; ZHU; PAN, 2010).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácidos diluídos, principalmente sulfúrico, é um dos métodos mais efetivos e utilizados para a remoção e solubilização da hemicelulose. A hemicelulose solubilizada pode continuar a sofrer reações hidrolíticas, produzindo monômeros, furfural e hidroximetilfurfural, entre outros. Este tipo de pré-tratamento possui mínima influência na extração da lignina (SILVERSTEIN et al*.,* 2007). A alteração estrutural e a redistribuição da lignina é o principal efeito do pré-tratamento na macromolécula, o que pode aumentar substancialmente a sacarificação de materiais lignocelulósicos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Geralmente, durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácidos diluídos, a lignina solubilizada a quente é rapidamente condensada durante o abaixamento da temperatura, pois precipita em ambientes ácidos. As interações lignina-hemicelulose-celulose podem ser completamente alteradas, tornando a celulose mais acessível às enzimas que a hidrolisam mesmo na presença de grandes quantidades de lignina residual (GROHMANN et al., 1984).

A recuperação da hemicelulose solubilizada após o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácido sulfúrico diluído é importante uma vez que o hidrolisado

hemicelulósico é uma fonte de carboidratos com grande potencial para uso em processos fermentativos, podendo ser utilizado para obtenção de vários compostos de interesse, entre eles o xilitol e o etanol (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003 CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007; CANILHA et al., 2010). A eficiência da sacarificação enzimática dos polissacarídeos contidos na fração sólida obtida após o pré-tratamento é outro fator igualmente importante (CANILHA et al., 2011). Neste contexto, é importante enfatizar que as condições operacionais de pré-tratamento descritas na literatura, como concentração ácida, temperatura, tempo de residência e teor de sólidos, variam amplamente (CARVALHO et al., 2004; ABEDINIFAR et al., 2009; SINGH et al., 2009). Tais condições dependem do tipo de material lignocelulósico (KUMAR; WYMAN, 2009) e do tipo de aparato experimental (ESTEGHLALIAN et al., 1997; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.3.3. Pré-tratamento biológico

Dentre os microrganismos mais efetivos na biodegradação de materiais lignocelulósicos podem ser citados os fungos de decomposição branca, que degradam componentes da madeira, principalmente a lignina, e os fungos de decomposição parda, responsáveis pela degradação preferencial de polissacarídeos (LEE, 1997).

A biodegradação de componentes da madeira por fungos de decomposição branca é atribuída ao sistema enzimático extracelular, composto por enzimas ligninolíticas como peroxidases e lacases (KUMAR, et al., 2009). Sendo assim, estes microrganismos podem ser utilizados em pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos com vistas ao aproveitamento subseqüente dos carboidratos, caracterizando o pré-tratamento biológico (SUN; CHENG, 2002).

As principais vantagens do pré-tratamento biológico são o baixo consumo de energia e as condições reacionais brandas. Entretanto, a velocidade de biodegradação que envolve o pré-tratamento biológico é lenta, tornando este processo pouco atrativo às indústrias (ALVIRA et al., 2010).

2.4. Sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos

Devido à constituição física dos materiais lignocelulósicos e ao fato de que na natureza a celulose ocorre sempre associada à lignina e a hemicelulose, a estratégia de liberação dos açúcares fermentescíveis da celulose requer, após a etapa de pré-tratamento, ações coordenadas de várias enzimas (ALVIRA, et al., 2010). A hidrólise enzimática da celulose representa uma alternativa importante para a produção de etanol usando resíduos agroindustriais, por se tratar de um processo limpo e específico.

Para a hidrólise enzimática da celulose, são requeridas: 1) exo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.91), 2) endo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.4), e 3) 1,4-β-D-glicosidases (EC 3.2.1.21) (ERIKSSON; BOJERSSON; TJERNELD, 2002; VÄLJAMÄE et al., 2003).

As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da cadeia da molécula de celulose, diminuindo o grau de polimerização da cadeia de celulose. As exoglucanases, também chamadas celobiohidrolases, atuam nas regiões terminais da cadeia de celulose, promovendo sua despolimerização gradativa através da retirada de unidades terminais de celobiose. As β-glicosidases hidrolisam a celobiose à glicose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases (BHAT; BHAT, 1997; RAMOS, 2003).

Estas três classes de enzimas supramencionadas atuam em sinergia para hidrolisar a celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras (Figura 6) e aliviando problemas de inibição pelos produtos (VÄLJAMÄE et al., 2003).

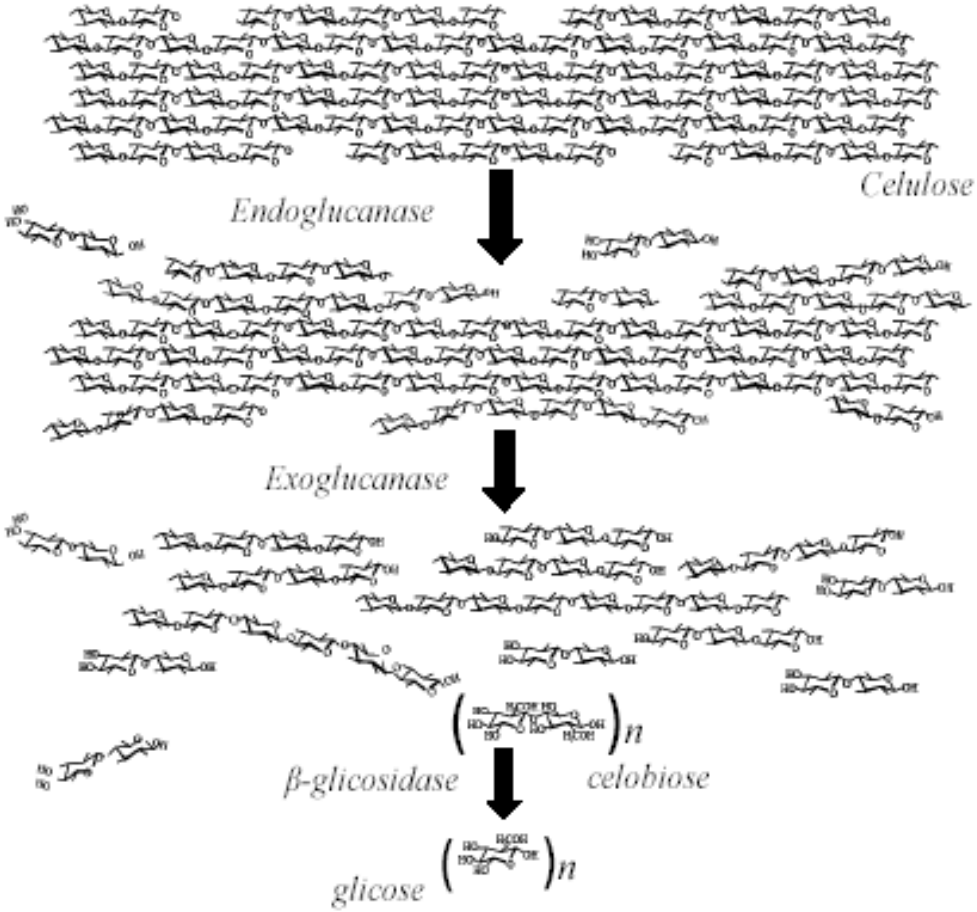

Figura 6. Ação sinérgica de endoglucanase, exoglucanase e β-glicosidase em uma fibrila elementar de celulose (MARTINS, 2005).

Dependendo do tipo e das condições empregadas durante o pré-tratamento, parte da hemicelulose pode permanecer no material pré-tratado e prejudicar a hidrólise enzimática da celulose. Nestes casos, a hidrólise eficiente do material pré-tratado requer, em adição às celulases, o emprego de hemicelulases (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

O sistema hemicelulolítico requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea. Inclui, entre outras enzimas: 1) endo-1,4-β-D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações glicosídicas internas aleatoriamente na cadeia de xilana, 2) 1,4-β-D-xilosidases (EC 3.2.1.37), que "atacam" xilooligossacarídeos a partir das pontas não redutoras da cadeia de xilana liberando xilose, 3) endo-1,4-β-D-mananases (EC 3.2.1.78), que clivam ligações internas na cadeia de manana, 4) 1,4-β-D-manosidases (EC 3.2.1.25), que clivam manooligossacarídeos em manose, e 5) enzimas envolvidas na remoção dos grupos substituintes laterais (ramificações) como α-D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α-L-

arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (BEG et al., 2001, SHALLOM ; SHOHAM, 2003).

3. OBJETIVOS

- Submeter o bagaço de cana-de-açúcar a pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído em um reator piloto aquecido por vapor direto com capacidade de 100L, sob diferentes condições de temperatura, tempo de residência e concentração ácida;

- Avaliar os efeitos provocados pelos pré-tratamentos na composição, digestibilidade enzimática e distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado;

- Avaliar os efeitos provocados pelos pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar na concentração de xilose e furfural no hidrolisado hemicelulósico;

- Avaliar o efeito da presença de compostos solúveis do hidrolisado hemicelulósico na digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi proveniente da Usina Ester, sediada em Cosmópolis, São Paulo.

4.1.1. Granulometria

A análise granulométrica foi realizada determinando-se a fração mássica seletivamente retida em um conjunto de peneiras padronizadas da série Tyler. As peneiras utilizadas foram 6, 10, 20, 35 e 65 mesh, com aberturas de 3,36, 1,68, 0,85, 0,42 e 0,21 mm, respectivamente. Para esta análise, foram utilizadas amostras de 100 g. As peneiras foram posicionadas em ordem decrescente de tamanho das malhas, de modo que a primeira peneira fosse aquela com malha de maior abertura e a última fosse aquela que tivesse a menor abertura de malha. O sistema de peneiras foi aclopado à um agitador magnético e em seguida a amostra de bagaço de cana (100g) foi adicionada à primeira peneira. A agitação do sistema foi feita durante 1h e 20 minutos, com a finalidade de distribuir as frações granulométricas da amostra de bagaço de cana ao longo do sistema de peneiras com diferentes aberturas de malhas. Este tempo foi estabelecido, uma vez que tempos superiores não levaram a diferenças nas massas de bagaço retidas pelas diferentes peneiras.

4.1.2. Extração

Antes de passar pelo processo de extração, uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi moída em moinho de facas até passar por uma peneira com malha de 20 mesh.

A extração foi realizada com água seguida de etanol 95%. Para isso, foram pesados

4,5 g de bagaço *in natura* moído, que foram colocados em cartuchos de papel de filtro. O volume do solvente extrator (água ou etanol 95%) foi de 800 ml. A extração foi executada em aparelho Soxhlet por aproximadamente 24 h em cada solvente. Cada um dos solventes foi trocado em intervalos de 12 horas, sendo retiradas alíquotas dos extratos aquosos e alcoólicos para análises, mantendo-se os cartuchos com o bagaço de cana moído em contato com o solvente extrator.

A amostra de bagaço extraído foi, então, seca ao ar para evaporação dos solventes e transferida quantitativamente para pesa-filtro tarado, para secagem em estufa a 105 °C até massa constante.

Os extratos aquosos e alcoólicos foram analisados quanto à presença de açúcares totais, pelo método colorimétrico proposto por Dubois e colaboradores (1956). Além desta análise, os extratos aquosos e alcoólicos foram submetidos a uma varredura da absorção de luz na região do visível e ultravioleta (200-700 nm) após diluição apropriada. Os resultados foram plotados em gráficos como absorbância relativa, após correção pelo fator de diluição.

4.1.3. Composição

Após a extração com água seguida de etanol, a amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizada quanto aos teores percentuais de lignina total (solúvel e insolúvel), celulose, hemicelulose e cinzas.

Para tal, 2 g de bagaço foram transferidos para um béquer de 100 mL com 15 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). A mistura foi agitada com bastão de vidro continuamente em banho termostático a 45 °C por 7 min. À reação foram então adicionados 275 mL de água destilada e o conteúdo do béquer transferido para um Erlenmeyer de 500 mL para ser autoclavado a 121 ºC por 30 min (1 atm). Após resfriada, a suspensão foi filtrada em papel de filtro, sendo transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. O volume do balão foi completado com água destilada e homogeneizado. O resíduo sólido (lignina insolúvel + cinzas insolúveis) presente no papel de filtro foi seco ao ar e, posteriormente, em estufa a 105 °C até massa constante. A partir da diferença entre a massa do resíduo seco e a massa das cinzas insolúveis em meio ácido, determinadas

posteriormente, calculou-se a percentagem de lignina insolúvel. Para determinação das cinzas insolúveis em meio ácido, o material seco a 105 °C foi aquecido em mufla elétrica a 800 °C durante 4 h. Após resfriamento, o material calcinado foi quantificado gravimetricamente (GOUVEIA et al., 2009).

A fração líquida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que foram utilizadas nos cálculos dos teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes no material de partida.

A determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético se deu nas seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45 °C, fase móvel solução de ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min, volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Sep-Pak C18. O eluente, antes do uso, foi filtrado à vácuo em membrana de 0,45 µm e, em seguida, degaseificado pela ação de ultra-som por 25 min sob vácuo.

Para a determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, foram utilizadas as seguintes condições: coluna Resolve 5µm Spherical C18 (3,9 x 300 mm), temperatura da coluna de 25 °C, detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS, fase móvel solução de acetonitrila e água (1:8) com 1% de ácido acético (v/v), volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm. O eluente foi filtrado a vácuo em membrana de 0,45 µm e em seguida degaseificado pela ação de ultrasom e vácuo por 10 min.

Para a determinação da concentração de lignina solúvel, alíquotas de 5 mL da fração líquida foram diluídas em balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados cerca de 50 mL de água destilada e 40 gotas de NaOH 6,5 mol/L (pH = 12) e, após homogeneização, o volume foi completado com água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 280 nm. O espectrofotômetro foi zerado com água destilada.

Para o cálculo da concentração de lignina solúvel, foram utilizadas as Equações1 e 2 (GOUVEIA et al., 2009):

$$Apd = (C_F \times \varepsilon_F + C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \times L \qquad (1)$$

$$\text{Lignina solúvel (g/L)} = 0{,}04187 \times (A - Apd) - 0{,}0003279 \quad (2)$$

Onde: A: absorbância da solução em 280 nm, Apd: absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) em 280 nm, C_F e C_{HMF}: concentração de furfural e HMF determinadas por CLAE, ε_F e ε_{HMF} : absortividade do furfural (146,85 L/g.cm) e HMF (114,00 L/g.cm), e L: caminho ótico da cubeta.

Para a determinação do teor de lignina no material de partida, foi feito o somatório das quantidades calculadas de lignina solúvel e insolúvel, para cada amostra.

Para o cálculo dos teores de celulose e hemicelulose, foram utilizadas as seguintes equações (GOUVEIA et al., 2009, com modificações):

$$\%\ \text{celulose} = \%\text{celobiose} \times 0{,}95 + \%\text{glicose} \times 0{,}90 + \%\text{HMF} \times 1{,}29 \quad (3)$$

$$\%\ \text{hemicelulose} = \%\text{xilose} \times 0{,}88 + \%\text{arabinose} \times 0{,}88 + \%\text{furfural} \times 1{,}38 + \%\text{ácido acético} \times 0{,}70 \quad (4)$$

4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído

Os experimentos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído foram realizados em um reator piloto com capacidade de 100 L, aquecido por vapor direto e dotado de camisa dupla para circulação de água de resfriamento, situado no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL).

Com o intuito de correlacionar as composições químicas dos bagaços pré-tratados e dos hidrolisados hemicelulósicos com as condições operacionais de pré-tratamento (temperatura, concentração de ácido sulfúrico e tempo de residência), foi empregado um planejamento fatorial 2^3 completo com 6 repetições no ponto central. Os valores reais e codificados das variáveis independentes avaliados nos ensaios estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores reais e codificados das variáveis independentes do planejamento fatorial 2^3 completo composto com 6 pontos centrais

Exp.	Valores reais			Valores codificados		
	Temperatura (°C)	Ácido (% p/p)	Tempo (min)	Temperatura	Ácido	Tempo
1	140	1	20	-1	-1	-1
2	160	1	20	1	-1	-1
3	140	3	20	-1	1	-1
4	160	3	20	1	1	-1
5	140	1	40	-1	-1	1
6	160	1	40	1	-1	1
7	140	3	40	-1	1	1
8	160	3	40	1	1	1
9	150	2	30	0	0	0
10	150	2	30	0	0	0
11	150	2	30	0	0	0
12	131,91	2	30	-1,81	0	0
13	168,09	2	30	1,81	0	0
14	150	0,19	30	0	-1,81	0
15	150	3,81	30	0	1,81	0
16	150	2	11,9	0	0	-1,81
17	150	2	48,09	0	0	1,81
18	150	2	30	0	0	0
19	150	2	30	0	0	0
20	150	2	30	0	0	0

Para a execução do planejamento experimental, em cada experimento foi utilizada massa inicial de 20 kg, incluindo bagaço, ácido e água destilada. O teor de sólidos inicial foi fixado em 15% em relação à massa total (20 kg). A concentração de ácido (% p/p) variou conforme a condição experimental. Uma parte da água destilada (9L) foi adicionada ao bagaço de cana 15 horas antes da realização do pré-tratamento.

Após cada experimento de pré-tratamento, uma parte representativa do "*slurry*" obtido foi levada para o laboratório e filtrada. Uma parte da fração sólida (bagaço pré-tratado) foi armazenada em sacos plásticos congelada a -4ºC, sem passar por nenhuma lavagem. A fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi armazenada em garrafas plásticas, também sob refrigeração de -4°C. O restante da fração sólida foi lavado exaustivamente com água aquecida a 80 °C até pH neutro e armazenado em sacos plásticos a -4°C.

4.2.1. Composição química dos bagaços pré-tratados

O protocolo de análise composicional das amostras de bagaços pré-tratados foi idêntico àquele descrito no item 4.1.3.

4.2.2. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos no planejamento experimental foram analisados por CLAE quanto à composição de açúcares (glicose, xilose e arabinose), ácido acético e produtos de desidratação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), conforme descrito anteriormente (item 4.1.3).

4.2.3. Cálculo do fator de severidade combinada

O fator de severidade combinada, que combina os efeitos do tempo de residência,

da temperatura e da concentração de ácido em uma única variável (SCHELL et al., 2003), foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$FSC = \log R_0 = \log_{10} (t \times \exp[T-100/14,75]) - pH \quad (5)$$

Onde t é o tempo de residência e T é a temperatura do pré-tratamento, de acordo com o planejamento experimental. O valor de pH é referente àquele determinado no respectivo hidrolisado hemicelulósico.

4.3. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído

Os bagaços de cana-de-açúcar obtidos após a execução dos experimentos de pré-tratamentos com H_2SO_4 diluído foram submetidos a ensaios de sacarificação enzimática.

O extrato utilizado nestes ensaios diluído foi um coquetel enzimático comercial produzido especialmente para o processamento de materiais lignocelulósicos, denominado aqui como "Extrato II". A caracterização deste extrato, em termos de suas enzimas constituintes e teor de proteínas, é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2– Determinação das atividades enzimáticas e teor de proteínas do extrato enzimático II (SANTOS, 2010)

	Extrato II
Celulase total (*FPU/mL*)	93,5±9,2*
Endoglucanase (UCMC/mL)	925,0
Exoglucanase (UI/mL)	98,0
Celobiase (UCB/mL)	115,8
β-Glicosidase (UI/mL)	139,0
Xilanase (UI/mL)	1249,0
Manganês Peroxidase (UI/mL)	-
Lacase (UI/mL)	-
Lignina peroxidase (UI/mL)	-
Proteínas (mg/mL)	152,45±10,0*

** desvio padrão foi calculado a partir de triplicatas; - = atividade enzimática não detectada.*

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 ml. Em cada frasco foi adicionado 12,5 mL de tampão citrato de sódio (100 mM, pH 4,8) com azida sódica 0,02%. Previamente, os teores de umidade dos bagaços pré-tratados foram determinados por balança de infravermelho, durante 90 min a 105 °C. O teor de sólidos em cada ensaio foi definido em 10%, a carga enzimática foi de 10 FPU/ g de bagaço (equivalente a 16,30 mg proteínas totais/g de bagaço) e a concentração de surfactante (Tween 20) foi de 0,025g/g. O volume final em cada experimento (25 ml) foi completado com água destilada. Paralelamente, brancos de enzima e substratos correspondentes aos respectivos ensaios de hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados foram realizados. Os experimentos foram conduzidos a 45 °C, em shaker a 150 rpm. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas de hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas de 1 mL. Em seguida, estas alíquotas foram fervidas por 5 minutos (para desnaturação das enzimas, interrompendo a hidrólise do material), e centrifugadas por 30 min, a 12.000 *g*.

Como descrito no item 4.2, após cada experimento de pré-tratamento com H_2SO_4, o "*slurry*" obtido foi separado em sua fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) e sua fração sólida (bagaço pré-tratado). Parte da fração sólida obtida foi armazenada, sem passar por lavagens sucessivas com água. A outra parte, antes de ser devidamente armazenada, foi submetida a exaustivas lavagens com água quente (80°C) até pH neutro.

Com o intuito de avaliar o efeito da lavagem dos sólidos e a presença de compostos solúveis no hidrolisado hemicelulósico na digestibilidade enzimática da celulose, bagaços pré-tratados com H_2SO_4 diluído obtidos sob a mesma condição de pré-tratamento, lavados (SL) e não-lavados (SNL), foram submetidos à sacarificação enzimática. As amostras utilizadas neste experimento adicional foram àquelas obtidas nas condições mais severa e branda de pré-tratamento, segundo o fator de severidade combinada.

4.3.1. Efeito da lavagem dos sólidos previamente à sacarificação enzimática

Neste experimento adicional foram utilizados os sólidos pré-tratados lavados (SL) e não lavados (SNL), obtidos nas condições 13 e 14 da matriz experimental (Tabela 1).

Os ensaios foram realizados em duplicatas, nas mesmas condições operacionais descritas no item 4.3: 10 % de sólidos, 0,025 g surfactante (Tween 20)/g bagaço e 10 FPU/g bagaço, conduzidos a 45°C com agitação em shaker de 150 rpm.

Para a preparação dos ensaios de hidrólise enzimática dos sólidos não-lavados (SNL), o pH dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos nas respectivas condições de pré-tratamento foi ajustado com solução de NaOH 6,5 M a pH 4,8. A massa de hidrolisado adicionado à reação foi correspondente a diferença entre a massa total de reação (25 ml) e a massa conjunta de enzima, bagaço e surfactante. Desta forma, foi possível representar uma situação onde o "slurry", obtido após o pré-tratamento com H_2SO_4, foi diretamente submetido à sacarificação enzimática.

Já os ensaios de sacarificação enzimática dos sólidos lavados (SL) foram conduzidos na presença de tampão citrato de sódio (100 mM, pH 4,8) com azida sódica 0,02%; conduzidos de forma idêntica àquela descrita no item 4.3.

4.3.2. Sacarificação enzimática dos sólidos submetidos a lavagem

As 20 amostras de bagaços, que foram submetidas à lavagem e obtidas de acordo com o planejamento experimental foram submetidas a ensaios de sacarificação enzimática, com a finalidade de avaliar os efeitos das condições operacionais de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído na digestibilidade enzimática destas amostras.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos, de acordo com a metodologia já apresentada no item 4.3.

4.3.3. Cálculo da eficiência da sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados com H_2SO_4 diluído

A digestibilidade da celulose (D_C) foi calculada de acordo com a equação 6:

$$D_C = (((C_G \text{ x } V_R) \text{ x } 0{,}90) / M_I) \text{ x } 100 \qquad (6)$$

Onde C_G é a concentração de glicose no meio reacional; V_R é o volume reacional; e M_I é a massa inicial de celulose adicionada à reação.

4.4. Análise estatística dos dados experimentais

Os experimentos foram realizados de acordo com as metodologias de planejamento de experimentos e análise de superfícies de resposta (BOX; HUNTER; HUNTER et al., 1978), empregando-se um planejamento fatorial completo, com a finalidade de permitir a elaboração de modelos empíricos para predição dos teores de celulose, hemicelulose e lignina nos sólidos pré-tratados; concentrações de xilose e seu respectivo produto de desidratação, furfural, nos hidrolisados hemicelulósicos, e dos rendimentos de hidrólise enzimática das amostras de bagaço obtidas de acordo com o planejamento experimental, em função das condições de pré-tratamento (temperatura, tempo de residência e concentração de ácido).

Os modelos empíricos foram elaborados através do ajuste de modelos quadráticos (Equação 7) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados.

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i x_i + \sum_{i=1}^{n} b_{ii} x^2_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} b_{ij} x_i x_j \qquad (7)$$

Onde Y_i é a variável dependente, b_o, b_{ii}, e b_{ij} representam os coeficientes de regressão, e x_i e x_j representam as variáveis independentes.

A significância dos coeficientes de regressão mantidos no modelo foi avaliada considerando-se como coeficientes estatisticamente significativos aqueles que apresentaram significância ao nível de 5% ($p < 0,05$).

As análises supramencionadas foram realizadas utilizando os softwares *Design Expert 5.0* e *Statgraphics Plus 6.0*. As superfícies de resposta descritas pelos modelos foram plotadas com o software *Statistica 5.0*.

Para a realização das análises estatísticas, os valores reais das variáveis independentes foram codificados em níveis de acordo com a Equação 8.

$$VC = (VR - V0) / (\Delta VR / 2) \qquad (8)$$

Onde *VC* é o valor codificado da variável independente; *VR* é o valor real da variável independente; *V0* é o valor real da variável independente no nível central e ΔVR é a diferença entre o valor real máximo e o valor real mínimo da variável independente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado neste trabalho foi caracterizado quimicamente e os teores percentuais de seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose, lignina) e não estruturais (cinzas e extrativos) foram determinados. Esta caracterização química inicial do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi importante, uma vez que a partir dos dados obtidos, permitiu-se observar variações nos teores estruturais dos bagaços pré-tratados com H_2SO_4 diluído em função das condições operacionais de pré-tratamento (temperatura, concentração ácida e tempo de residência). Além disso, a análise da distribuição granulométrica das frações do bagaço *in natura* e referentes àqueles obtidos após o pré-tratamento também foi realizada. Os resultados da caracterização química e granulométrica do bagaço de cana *in natura* são apresentados nos itens a seguir (5.1.1 e 5.1.2).

5.1.1. Composição

Antes do procedimento de análise composicional da amostra, esta foi submetida à extração com água seguida de etanol (48h; 24h em cada solvente, sendo que os solventes foram renovados a cada 12 horas) em extrator de Soxhlet.

Verificou-se que o conteúdo de compostos extraíveis do bagaço de cana foi de 6,1%, e que a quantidade total de açúcares presentes nesses extratos (determinada de acordo com o método proposto por Dubois et al., 1956) foi equivalente a 1,61% (base massa seca de bagaço *in natura*). Portanto, o teor de extrativos de natureza não sacarídica foi de 4,49.

O teor de extrativos encontrado no presente estudo corrobora com resultados encontrados na literatura. Por exemplo, Mesa e colaboradores (2010) determinaram que o teor de compostos extraíveis de outra amostra de bagaço de cana com água seguida de etanol foi de 5,6%. Canilha et al. (2007), por outro lado, realizando extração de uma

terceira amostra de bagaço com ciclohexano, observou que o teor de extrativos foi de 6,1%.

A fim de realizar uma caracterização preliminar dos extrativos recuperados a partir do bagaço de cana-de-açúcar usado no presente estudo, foi realizada uma varredura de absorção de luz pelos extratos aquosos e alcoólicos na região do visível e do ultravioleta (Figura 7).

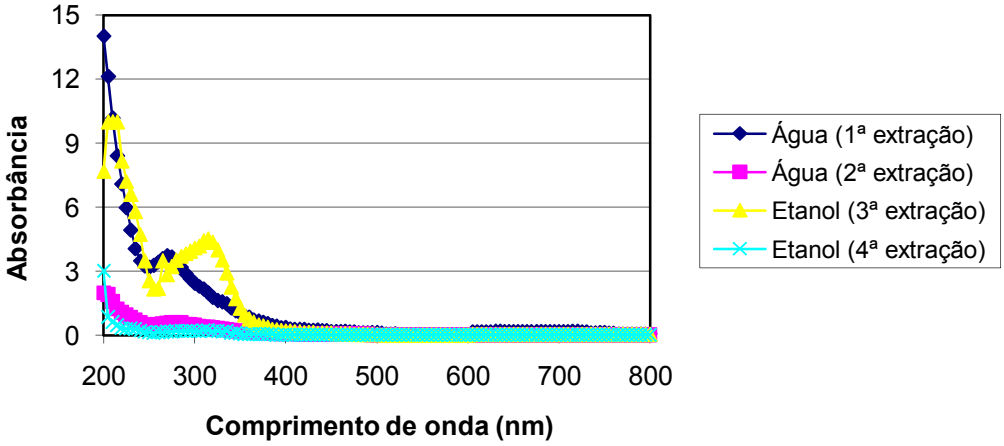

Figura 7. Perfil de absorção de luz dos extratos aquosos e alcoólicos na região do UV e visível

A Figura 7mostra que, na região do visível (400 a 700 nm) não houve absorção de luz pelos extratos alcoólicos e aquosos. Para melhor visualização dos picos de absorção na região do ultravioleta, os dados referentes a esta região (200 a 400 nm) foram plotados em um novo gráfico, sendo gerada a Figura 8.

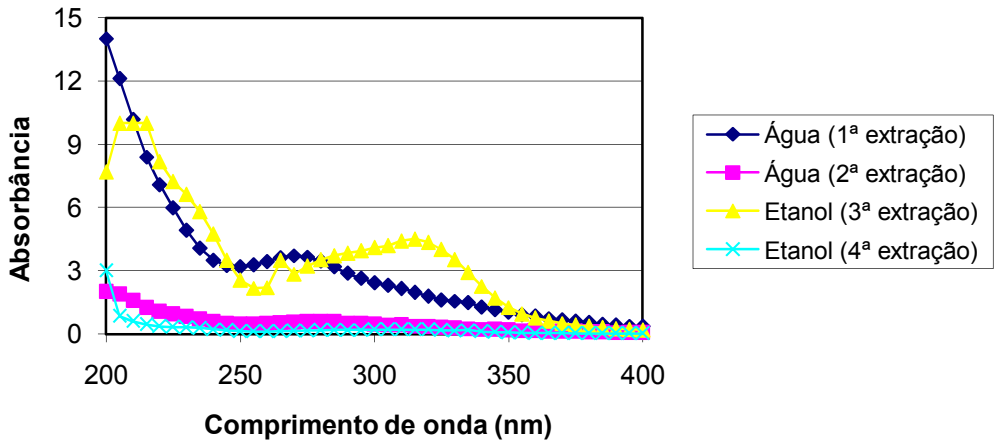

Figura 8. Perfil de absorção de luz dos extratos aquosos e alcoólicos na região do UV

A figura 8 permite observar que os picos de absorção de luz pelos extratos provenientes das primeiras extrações com água e álcool são bastante acentuados em relação à absorção de luz pelos extratos provenientes das segundas extrações.

De acordo com Browning (1967), a extração com solventes orgânicos, como etanol, solubiliza resinas, ácidos graxos, ceras, substâncias insaponificáveis e materiais corantes. Os compostos extraíveis em água são sais inorgânicos, açúcares e algumas substâncias fenólicas. Devido à diversidade de extrativos, não há procedimentos generalizados para o isolamento e identificação destes compostos.

No presente trabalho, os picos de absorção de radiação ultravioleta indicam a presença de compostos de origem aromática (SAKAKIBARA, 1991).

Após a extração, a amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi caracterizada quimicamente em termos de seus constituintes principais. Os resultados, expressos em relação à massa seca de bagaço *in natura*, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo

Componente	Composição percentual
Celulose	35,7±0,2
Hemicelulose	25,9±0,1
Lignina	21,0±2,1
Cinzas	4,9±0,1
Extrativos	6,1±0,1

A Tabela 4 apresenta uma comparação entre análises composicionais de diferentes amostras de bagaço de cana, determinadas por diferentes autores. Conforme pode ser observado, a porcentagem de celulose no bagaço utilizado no presente trabalho (35,7%) é inferior àquelas observadas em bagaços de cana utilizados por outros autores. O teor percentual de hemicelulose (25,9%) corrobora com resultados relatados por Brienzo, Siqueira e Milagres (2009), e também com aqueles determinados por Santos et al. (2009). Entretanto, o conteúdo de hemicelulose do bagaço utilizado por Sun e colaboradores (2004) foi sensivelmente maior (33,5%). O conteúdo de lignina determinado no bagaço utilizado no presente estudo (21,0%) foi semelhante àqueles descritos na literatura.

Hames et al. (2003) relataram que a variabilidade na composição química de amostras de materiais lignocelulósicos está relacionada às condições de plantio, métodos de colheita e condições de estocagem e processamento do material, e aos procedimentos analíticos de caracterização da composição química.

Tabela 4. Teores percentuais de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar

	Referências			
Componentes (%)	Presente estudo	Sun et al., 2004	Brienzo et al., 2009	Santos et al., 2009
Celulose	35,7	43,6	42,4	45,0
Hemicelulose	25,9	33,5	25,2	25,8
Lignina	21,0	18,1	19,6	19,2
Cinzas	4,9	2,3	1,6	1,0

Uma diferença marcante em relação aos bagaços de cana caracterizados por outros autores foi o alto conteúdo de cinzas determinado no bagaço utilizado no presente estudo (4,9%). Windham, Hill e Stuedemenn (1991) determinaram os teores de cinzas em amostras de forragem a) no pasto, b) no estômago e c) nas fezes de ruminantes, por gravimetria e por espectroscopia no infravermelho próximo. Estes autores mostraram que o teor de cinzas nas amostras supramencionadas foi de 7,45, 16,66 e 32,66%, respectivamente. Os elevados conteúdos de cinzas encontrados nas diferentes amostras foram atribuídos à contaminações com minerais contidos no solo e na saliva e trato digestivo dos animais, além da digestão da matéria orgânica. Tijani (2009), por outro lado, estudou a bioacumulação de metais em plantas cultivadas em sistemas contaminados com metais e concluiu que os vegetais plantados em solos contaminados apresentam uma concentração maior de metais do que aqueles plantados em solos não contaminados. Deste

modo, se a cana-de-açúcar que gerou o bagaço utilizado no presente estudo foi plantada em solo suplementado com fertilizantes minerais, é possível afirmar que, em seu crescimento, a planta absorveu uma maior quantidade destes nutrientes e, por fim, apresentou um teor de cinzas (compostos minerais) mais elevado em relação a outros bagaços provenientes de canas plantadas em solos não suplementados.

5.1.2. Granulometria

Com intuito de verificar a distribuição granulométrica do bagaço de cana *in natura*, para fins de comparação com o material pré-tratado com ácido diluído, foi realizada a sua análise granulométrica. A Figura 9 mostra a distribuição das frações mássicas em função da abertura das peneiras.

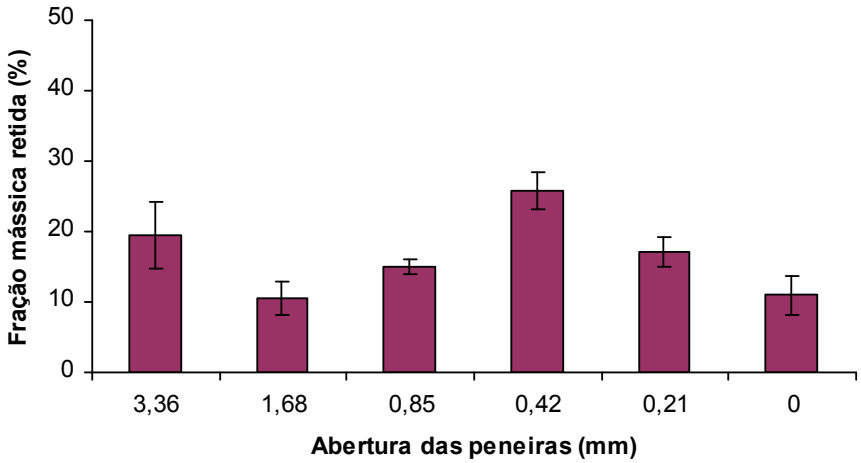

Figura 9. Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

É possível observar que a maior fração mássica (25,7%) passou pela peneira de abertura 0,85 mm (20 mesh) e ficou retida na peneira de abertura 0,42 mm (35 mesh). Entretanto, 19,4% da massa de bagaço ficou retida na peneira de maior abertura, 3,36 mm (6 mesh).

Costa et al. (2008) estudaram a distribuição granulométrica de uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar proveniente de uma usina em Minas Gerais, utilizando peneiras padronizadas com aberturas de 0,30, 0,42, 0,60, 1,20, 2,36 e 4,75 mm. Estes autores relataram que apenas 0,25% e 0,01% da massa inicial de bagaço ficaram retidas nas

peneiras com aberturas de 0,42 mm e 0,30 mm, respectivamente. Enquanto que as proporções de 42,75%, 10,87% e 19,76% ficaram retidas nas peneiras com aberturas de 1,20 mm, 2,36 mm e 4,75 mm, respectivamente.

Comparando-se os resultados supramencionados, percebe-se que o bagaço caracterizado por Costa e colaboradores (2008) apresentou distribuição granulométrica concentrada em peneiras com maiores aberturas, diferentemente da distribuição granulométrica mais heterogênea evidenciada para o bagaço de cana caracterizado no presente estudo. Estes resultados mostram diferenças também entre as distribuições granulométricas de amostras de bagaço de cana de procedências diferentes, confirmando a heterogeneidade deste material lignocelulósico.

5.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído

A Tabela 5 apresenta a composição química das 20 amostras de bagaço pré-tratadas (frações sólidas), assim como dos respectivos hidrolisados hemicelulósicos (frações líquidas). O fator de severidade combinada correspondente a cada uma das condições de pré-tratamento, definidas em função do tipo de planejamento experimental adotado, também é mostrado.

Tabela 5. Composição química dos bagaços pré-tratados e hidrolisados hemicelulósicos obtidos de acordo com o planejamento experimental

Exp	Bagaço pré-tratado			Hidrolisado hemicelulósico							FSC*
	Celulose (%p/p)	Hemicelulose (%p/p)	Lignina (%p/p)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	pH	($\log R_0$)
1	53,56	14,51	23,51	0,09	13,04	2,03	2,62	0,08	0,03	1,17	1,31
2	57,97	5,93	26,96	2,96	17,29	1,80	2,88	1,28	0,06	1,24	1,83
3	62,35	4,61	28,92	3,49	19,53	2,43	3,35	1,09	0,06	0,82	1,66
4	63,94	0,79	31,77	4,43	13,52	1,77	3,05	3,73	0,10	0,91	2,16
5	59,41	9,05	29,18	1,98	16,59	1,90	2,91	0,48	0,05	1,18	1,60
6	64,01	1,82	29,85	3,51	14,08	1,68	3,13	3,53	0,12	1,29	2,08
7	61,64	5,38	30,21	3,91	20,53	2,47	3,47	1,66	0,67	0,85	1,93
8	59,76	0,14	35,48	5,18	7,02	1,09	2,67	4,40	0,15	0,97	2,40
9	62,02	5,47	29,55	2,09	11,71	1,34	2,08	1,02	0,05	1,14	1,81
10	61,62	5,88	29,28	3,61	19,61	2,26	3,56	1,40	0,06	0,93	2,02
11	60,86	5,48	29,46	3,73	19,71	2,77	3,29	1,32	0,07	0,93	2,02
12	55,31	11,13	23,43	2,91	18,27	2,40	3,36	0,34	0,04	0,91	1,51
13	64,04	1,23	30,05	5,29	1,43	1,87	3,66	4,68	0,15	0,93	2,55
14	52,38	17,62	21,25	0,19	8,61	1,67	1,71	0,11	0,03	1,79	1,16
15	61,31	4,28	26,83	3,47	20,13	2,56	3,33	1,20	0,06	0,68	2,27
16	58,11	8,78	29,41	2,56	17,94	2,17	3,11	0,59	0,05	0,89	1,63
17	65,81	3,04	30,47	3,84	17,07	2,10	3,40	1,68	0,09	0,99	2,16
18	60,28	1,56	30,21	3,94	21,05	2,55	4,46	1,68	0,07	0,93	2,02
19	60,34	5,18	30,04	3,91	20,50	2,32	3,67	2,04	0,07	0,97	1,98
20	62,13	5,38	28,27	3,53	20,08	2,26	3,57	1,74	0,06	0,97	1,98

* Fator de Severidade Combinada

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, é possível observar variações consideráveis nos teores de celulose, hemicelulose e lignina dos bagaços pré-tratados em função das condições operacionais de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído.

Os teores percentuais de celulose variaram entre 52,38 a 65,81% p/p, enquanto a variação no teor percentual de lignina foi de 21,25 a 35,48%. Este comportamento de variação considerável nos teores de celulose e lignina está relacionado com a remoção de hemicelulose durante o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, enriquecendo as amostras pré-tratadas em celulose e lignina (RODRIGUES et al., 2010).

Para a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas, este tipo de pré-tratamento com ácidos diluídos aumenta o rendimento de sacarificação enzimática por proporcionar o aumento da área superficial e da porosidade do material como é mostrado por diversos trabalhos (ZHAO; ZHANG; LIU, 2008; KUMAR; WYMAN, 2009; ALVIRA et al., 2010; GIRIO et al., 2010). Entretanto, uma quantidade elevada de lignina, comum em materiais pré-tratados com ácidos diluídos, pode ser prejudicial à sacarificação enzimática do material, pois as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose podem se adsorver improdutivamente à esta molécula diminuindo assim a eficiência de sacarificação enzimática da celulose (LU et al., 2002; BERLIN et al., 2005; TU; PAN; SADDLER, 2009).

Conforme pode ser observado na Tabela 5, dentre os principais componentes do bagaço de cana, a hemicelulose foi o que sofreu a maior variação após os pré-tratamentos conduzidos de acordo o planejamento experimental; seu conteúdo na fração sólida obtida após o pré-tratamento variou de 0,14 a 17,62% p/p. Em todas as condições experimentais foi observada diminuição do teor de hemicelulose em relação ao conteúdo inicialmente presente no bagaço *in natura* (25,9% p/p). Merece destaque o experimento 8, conduzido a 160°C e 3% de ácido por 40 minutos, que resultou em um bagaço pré-tratado com apenas 0,14% de hemicelulose residual.

Segundo diversos trabalhos reportados na literatura, os principais efeitos provocados por pré-tratamentos com ácidos diluídos são a remoção da hemicelulose presente no material lignocelulósico, bem como a redistribuição da lignina na superfície do material (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; SUN; CHENG, 2002; GIRIO et al., 2010; SELIG et al., 2007).

Realizando o pré-tratamento de forragem de milho, álamo e “switchgrass” com ácido sulfúrico diluído, Esteghlalian e colaboradores (1997) relataram a remoção de mais de 90% da fração hemicelulósica nos três materiais avaliados, em experimentos

conduzidos em reator de aço inoxidável (600 ml) a 180 °C e 0,6% de ácido, com consistência de 10%, em 4 min de reação.

Rodrigues e colaboradores (2010), avaliando o aumento de escala do pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar com ácido sulfúrico diluído, relataram a remoção de 74% de hemicelulose após o pré-tratamento em escala piloto. Para isso, os autores conduziram este experimento em um reator com capacidade de 350L, a 121° C por 10 min, usando uma concentração de catalisador igual a 100mg H_2SO_4/g de bagaço. Nestas condições, os autores reportaram a presença majoritária de xilose (19,19 g/L) no hidrolisado hemicelulósico, associada a uma baixa concentração de furfural (0,082 g/L).

Além da fração sólida enriquecida em celulose e lignina, o pré-tratamento de gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, com H_2SO_4 diluído gera uma fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) caracterizada pela presença majoritária de xilose (NEUREITER et al., 2002; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007). Do ponto de vista econômico, a eficiente recuperação da xilose contida nesses materiais é fundamental uma vez que xilanas representam cerca de 1/3 do total de carboidratos presentes (HINMAN et al., 1992; WYMAN, 1994).

A xilose recuperada no hidrolisado hemicelulósico após o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído pode ser utilizada para aumentar a produção de etanol (CANILHA et al., 2010) e pode ser também utilizada para a produção de outros insumos de maior valor agregado, como, por exemplo, o xilitol (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5 a concentração de xilose nos hidrolisados hemicelulósicos obtidos no presente estudo variou de 1,43 a 21,05 g/L.

Durante o pré-tratamento em meio ácido sob temperatura elevada, a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico pode ser degradada a furfural, que pode inibir a fermentação microbiana (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

No presente estudo, dependendo das condições experimentais, a concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico variou entre 0,08 g/L a 4,68 g/L (Tabela 5).

É interessante observar que experimentos conduzidos em condições mais severas, que podem ser caracterizadas pelo fator de severidade combinada (SCHELL et al., 2003), acarretam em maiores remoções da hemicelulose presente no material de partida. Contudo, são detectadas baixas concentrações de xilose e altas concentrações de furfural no hidrolisado hemicelulósico correspondente, evidenciando a decomposição de xilose em

furfural. Por exemplo, o experimento 13, conduzido a 168,09 °C com 2% de H_2SO_4 por 30 minutos resultou em um sólido pré-tratado com apenas 1,23% de hemicelulose; entretanto, o hidrolisado hemicelulósico obtido nesta condição apresentou baixa concentração de xilose (1,43 g/L) e alta concentração de furfural (4,68 g/L). O fator de severidade combinada, que combina os efeitos provocados pelo tempo de residência, temperatura de trabalho e concentração de ácido em uma única variável foi o mais alto em relação àqueles determinados para as demais condições do planejamento (log R_0 = 2,55), indicando que esta foi a condição mais severa de pré-tratamento. Por outro lado, o experimento 1, conduzido a 140 °C e 1% de H_2SO_4 por 20 min, com fator de severidade combinada igual a 1,31, acarretou em um sólido pré-tratado com conteúdo de hemicelulose igual a 14,51 %. Neste experimento, a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico foi de 13,04 g/L, enquanto a concentração de furfural foi de apenas 0,08 g/L. Tais resultados evidenciam que condições brandas de pré-tratamento resultam em baixas remoção de hemicelulose e decomposição de xilose, em comparação com experimentos conduzidos em condições severas.

5.2.1. Análise estatística dos dados experimentais

A temperatura, a concentração ácida e o tempo de residência do pré-tratamento são fatores que influenciam a recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico e também na formação de compostos inibitórios de fermentação como o furfural (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2002; CARVALHO; CANILHA; SILVA , 2007).

Analisando o pré-tratamento de bagaço de cana com ácido diluído em diferentes condições, Neureiter e colaboradores (2002) demonstraram, através de análises estatísticas, que a concentração ácida foi o parâmetro com maior poder de influência na recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico, enquanto que a temperatura de trabalho foi o fator de maior significância na decomposição de xilose em furfural. Por outro lado, em trabalho de natureza semelhante, Esteghlalian et al. (1997), avaliando o efeito da temperatura (140 a 160 °C) e da concentração de H_2SO_4 (0,6 a 1,2 % p/p) na recuperação de xilose em hidrolisados hemicelulósicos de forragem de milho, álamo e “switchgrass”, observaram que a temperatura foi a variável que provocou maior efeito nesta variável resposta para os três materiais lignocelulósicos. Os resultados deste trabalho ainda mostraram que, apenas

em altas temperaturas (180 ° C), o aumento da concentração do ácido afetou a recuperação de xilose.

Os resultados descritos acima sugerem que a influência de fatores como temperatura e concentração ácida na composição dos hidrolisados hemicelulósicos pode ser dependente do tipo de material e do aparato utilizados.

Assim como a composição química dos hidrolisados hemicelulósicos, a composição química dos sólidos obtidos após pré-tratamento com ácidos diluídos também sofre influência das condições operacionais de pré-tratamento, como demonstrado por Hsu et al (2010). Estes autores, avaliando os efeitos da temperatura (160-190°C), concentração ácida (0,5-1% p/p) e tempo (1-25 min) na composição química de palha de arroz pré-tratada com H_2SO_4 diluído, relatam que a temperatura e a concentração ácida são as principais variáveis que influenciam os teores de celulose e hemicelulose nos sólidos pré-tratados, e ainda que a condução do pré-tratamento em níveis operacionais máximos acarreta em sólidos pré-tratados com teores mínimos de hemicelulose residual. Em trabalho semelhante, Canilha et al (2010) estudando os efeitos provocados pela temperatura (112,5-157,5°C), concentração ácida (0-3% p/v) e tempo de residência (5-35 min) na composição química de bagaços pré-tratados com H_2SO_4, diluído atribuem, por análises estatísticas, à temperatura como a variável que exerce maior poder de influencia nos teores de celulose, hemicelulose e lignina nos sólidos pré-tratados, seguida pela concentração ácida e tempo de reação.

No presente estudo, as influências das condições de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar (temperatura, concentração de ácido e tempo de residência) sobre os teores de celulose, hemicelulose e lignina dos bagaços pré-tratados e sobre as concentrações de xilose e furfural dos hidrolisados hemicelulósicos foram avaliadas levando-se em consideração a realidade no momento de realização do estudo, ou seja, utilizando-se a amostra de bagaço de cana-de-açúcar, os reagentes, os métodos e o aparato experimental disponíveis.

5.2.1.1. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado

A Tabela 6 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que correlaciona o teor de celulose do bagaço pré-tratado com as variáveis que o influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 6. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	61,22	0,41	
A	1,68	0,38	0,0008
B	1,98	0,38	0,0002
C	1,43	0,38	0,0026
B^2	-1,21	0,34	0,0033
AB	-1,16	0,52	0,0431
BC	-2,09	0,52	0,0014

A: Temperatura, B: Concentração de ácido e C: Tempo de residência.

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que as respectivas variáveis de pré-tratamento influenciam significativamente o percentual de celulose presente na fração sólida obtida após o pré-tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, o modelo que correlaciona o teor de celulose do bagaço pré-tratado com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 9:

$$T_C = 61,22 + 1,68A + 1,98B + 1,43C - 1,21B^2 - 1,16AB - 2,09BC \qquad (9)$$

Onde T_C é o teor de celulose determinado em função da temperatura (*A*), concentração de ácido sulfúrico (*B*) e tempo de residência (*C*) utilizados no pré-tratamento, e os valores das variáveis independentes são codificados conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Equação 9, quantitativamente a concentração de ácido sulfúrico é a variável com maior poder de influência no teor de celulose da fração sólida obtida após o pré-tratamento, seguida por temperatura e tempo de residência, respectivamente.

A Tabela 7 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 9). Conforme pode ser observado, o modelo é significativo ($p<0,05$), não apresenta falta de ajuste e possui boa capacidade de predição ($R^2=0,82$).

Tabela 7. Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de celulose no bagaço pré-tratado

CV	GL	SQ	MQ	F_{calc}	*p*
Modelo	6	201,36	33,56	15,6	< 0,0001
Resíduo	13	27,97	2,15		
Falta de ajuste	8	24,65	3,08	4,64	0,0539
Erro puro	5	3,32	0,66		
Total	19	229,32			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. $R^2=0,82$.

Para a elaboração do gráfico de superfície de resposta, o modelo que relaciona o teor de celulose com as variáveis independentes que o influenciam (Equação 9) foi reduzido, fixando-se a variável tempo de residência em seu nível máximo (1,81), resultando na Equação 10.

$$T_C= 63,80+1,68A -1,8B-1,21B^2-1,16AB \quad (10)$$

Onde T_C é o teor de celulose determinado em função da temperatura (*A*) e da concentração de ácido sulfúrico (*B*).

A superfície de resposta descrita pela Equação 10 é apresentada na Figura 10. Conforme pode ser observado, de acordo com o modelo proposto teores de celulose superiores a 66 % p/p podem ser obtidos se a concentração ácida estiver próxima do valor mínimo e se a temperatura estiver próxima do valor máximo (região demarcada em preto). Esta condição de pré-tratamento é bastante interessante do ponto de vista de economia de processo, pois a menor concentração de catalisador implica em menor custo.

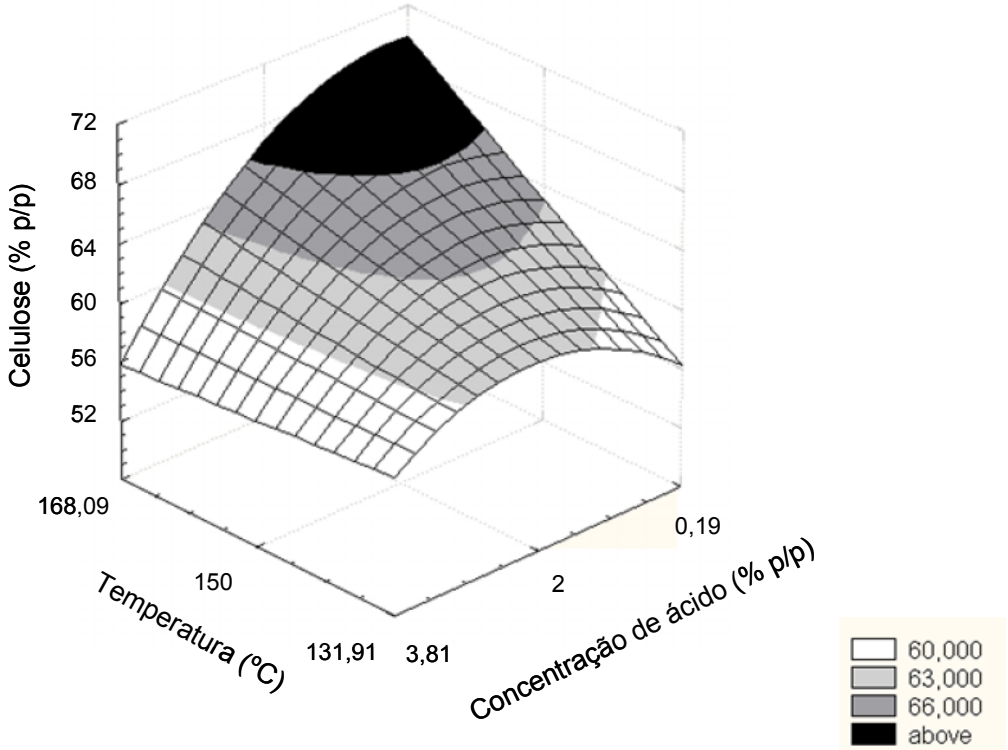

Figura 10. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de celulose da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min.

5.2.1.2. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado

A Tabela 8 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que correlaciona o teor de hemicelulose do bagaço pré-tratado com as variáveis que o influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 8. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	4,76	0,53	
A	-2,95	0,50	<0,0001
B	-3,06	0,50	<0,0001
C	-1,37	0,50	0,0153
B^2	1,51	0,44	0,0035

A: Temperatura, B: Concentração de ácido e C: Tempo de residência.

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que as respectivas variáveis de pré-tratamento influenciam significativamente o percentual de hemicelulose presente na fração sólida obtida após o pré-tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 8, o modelo que correlaciona o teor de hemicelulose do bagaço pré-tratado com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 11:

$$T_H = 4{,}76 - 2{,}95A - 3{,}06B - 1{,}37C + 1{,}51B^2 \qquad (11)$$

Onde T_H é o teor de hemicelulose determinado em função da temperatura (*A*), concentração de ácido sulfúrico (*B*) e tempo de residência (*C*) utilizados no pré-tratamento, e os valores das variáveis independentes são codificados conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Equação 11, a concentração ácida e a temperatura são os fatores que, quantitativamente, exercem as maiores influências na remoção da hemicelulose durante o pré-tratamento, seguidas pelo tempo de residência.

A Tabela 9 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 11). Conforme pode ser observado, o modelo é significativo ($p<0{,}05$), não apresenta falta de ajuste e boa capacidade de predição ($R^2=0{,}85$).

Tabela 9. Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de hemicelulose no bagaço pré-tratado

CV	GL	SQ	MQ	Falc	*P*
Modelo	4	333,03	88,26	26,92	<0,0001
Resíduo	15	54,50	3,63		
Falta de ajuste	10	41,56	4,16	1,61	0,3133
Erro puro	5	12,93	2,59		
Total	19	387,53			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. $R^2= 0{,}85$.

Para a elaboração do gráfico de superfície de resposta (Figura 12), o modelo que relaciona o teor de hemicelulose com as variáveis independentes que o influenciam (Equação 11) foi reduzido, fixando-se a variável tempo de residência em seu nível máximo (1,81), resultando na Equação 12.

$$T_H = 2{,}28 - 2{,}95A - 3{,}06B + 1{,}51B^2 \qquad (12)$$

Onde T_H é o teor de hemicelulose determinado em função da temperatura (*A*) e da concentração de ácido sulfúrico (*B*).

A superfície de resposta descrita pela Equação 12 é apresentada na Figura 11. Conforme pode ser observado, teores mínimos de hemicelulose (abaixo de 4% p/p) podem ser alcançados trabalhando-se nas condições experimentais delimitadas pela região do gráfico ilustrada em branco. Sendo assim, o aumento da concentração ácida associado ao aumento da temperatura acarreta na diminuição do teor de hemicelulose contida no material pré-tratado.

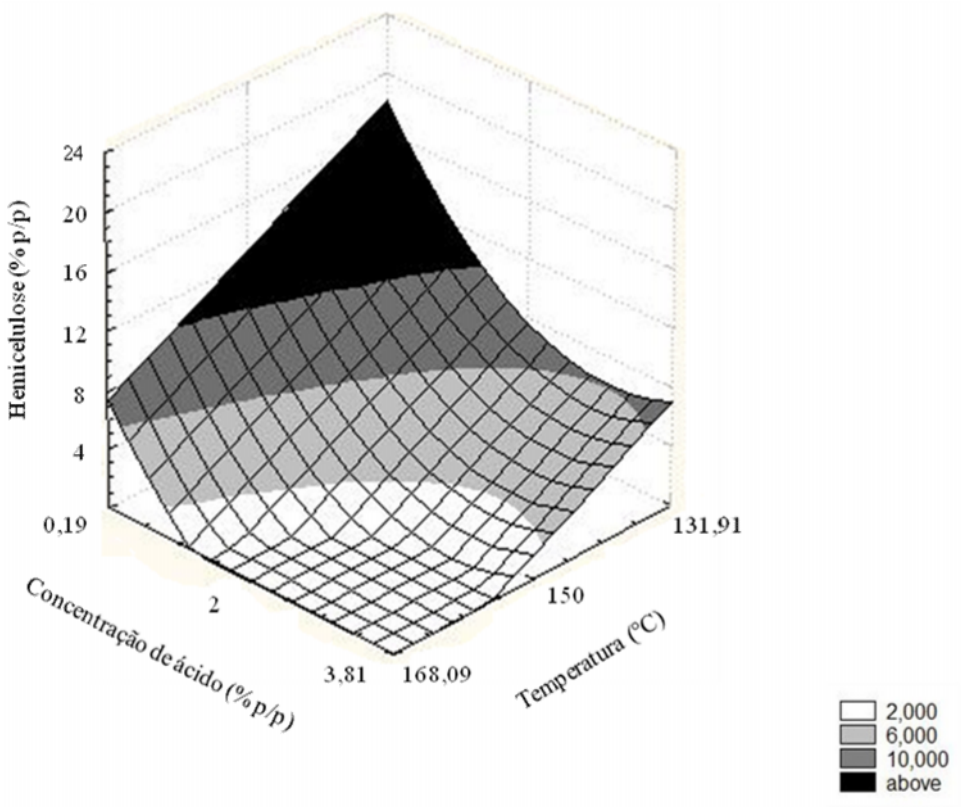

Figura 11. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de hemicelulose da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min.

5.2.1.3. Elaboração do modelo empírico para predição do teor de lignina no bagaço pré-tratado

A Tabela 10 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que correlaciona o teor de lignina do bagaço pré-tratado com as variáveis que o influenciam, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 10. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do teor de lignina no bagaço pré-tratado

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	29,56	0,44	
A	1,66	0,41	0,0013
B	1,85	0,41	0,0005
C	1,06	0,41	0,0223
B²	-1,29	0,36	0,0032

A: Temperatura, B: Concentração de ácido e C: Tempo de residência.

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que as respectivas variáveis de pré-tratamento influenciam significativamente o percentual de lignina presente na fração sólida obtida após o pré-tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, o modelo que correlaciona o teor de lignina do bagaço pré-tratado com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 13:

$$T_L = 29{,}56 + 1{,}66A + 1{,}85B + 1{,}06C - 1{,}29B^2 \qquad (13)$$

Onde T_L é o teor de lignina determinado em função da temperatura (*A*), concentração de ácido sulfúrico (*B*) e tempo de residência (*C*) utilizados no pré-tratamento, e os valores das variáveis independentes são codificados conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Equação 13, a concentração ácida é a variável que, quantitativamente, exerce maior poder de influência no teor de lignina da amostra de bagaço pré-tratada com H_2SO_4 diluído, seguida pela temperatura e tempo de residência.

A Tabela 11 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 13). Novamente, o modelo é significativo, não possui falta de ajuste e o valor de R^2 (0,79) demonstra que o mesmo possui boa capacidade de predição.

Tabela 11. Análise de variância do modelo proposto para a predição do teor de lignina em função das condições operacionais de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	Fcalc	*p*
Modelo	4	138,19	34,55	13,85	<0,0001
Resíduo	14	34,93	2,49		
Falta de ajuste	10	32,58	3,26	5,55	0,0564
Erro puro	4	2,35	0,59		
Total	18	187,55			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. R^2= 0,79.

Para elaboração do gráfico de superfície de resposta o modelo supramencionado (Equação 13) foi reduzido, fixando-se a variável tempo no nível máximo (1,81), dando origem à Equação 14.

$$T_L = 31,47 + 1,66A + 1,85B - 1,29B^2 \quad (14)$$

Onde T_L é o teor de lignina determinado em função da temperatura (*A*) e da concentração de ácido sulfúrico (*B*).

A superfície de resposta descrita pela Equação 14 é apresentada na Figura 12. De acordo com os dados exibidos na Figura, nota-se que concentrações de ácido e temperaturas baixas acarretam em menores teores de lignina (% p/p) no material sólido obtido após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. O aumento nos níveis destas variáveis, por outro lado, leva ao aumento do teor de lignina residual.

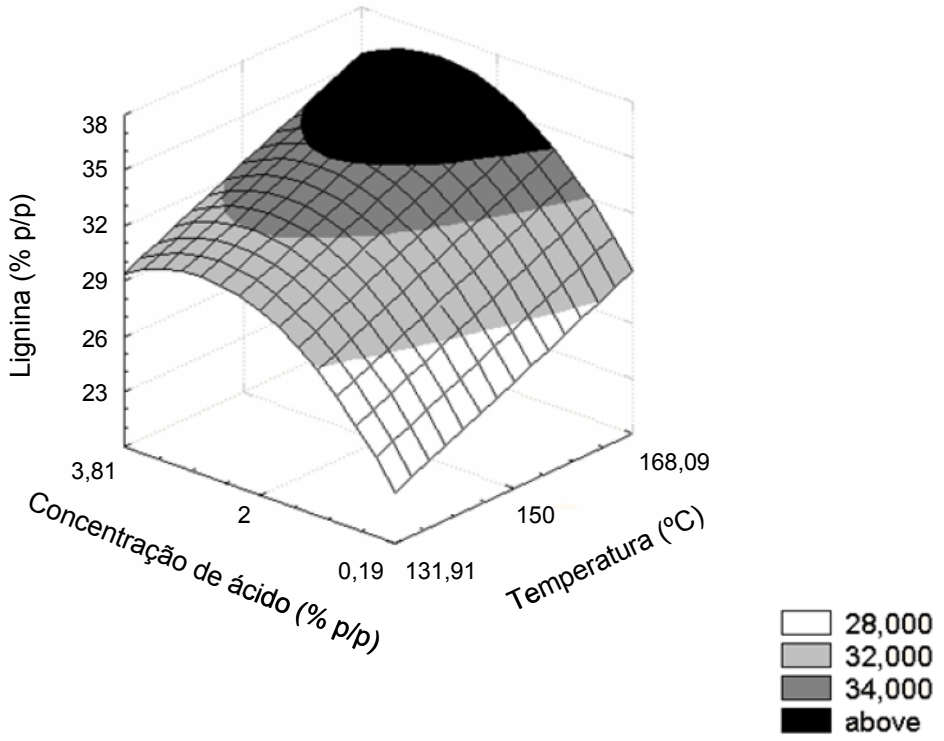

Figura 12. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura no teor de lignina da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min.

5.2.1.4. Elaboração do modelo empírico para predição da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico

A Tabela 12 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico com as variáveis que a influenciam, com seus respectivos níveis de significância.

Tabela 12. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	18,61	1,18	
A	-3,32	0,91	0,003
B	1,41	0,91	0,1467
A^2	-2,55	0,81	0,0076
B^2	-1,17	0,81	0,1723
AB	-2,66	1,23	0,0496

A: Temperatura, B: Concentração de ácido

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que as respectivas variáveis de pré-tratamento influenciam significativamente a concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 12, o modelo que correlaciona a concentração de xilose determinada no hidrolisado hemicelulósico com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 15:

$$C_X = 18{,}61 - 3{,}32A + 1{,}41B - 2{,}55A^2 - 1{,}17B^2 - 2{,}66AB \qquad (15)$$

Onde C_X é a concentração de xilose determinada no hidrolisado hemicelulósico em função da temperatura (*A*) e da concentração de ácido sulfúrico (*B*) utilizadas no pré-tratamento, e os valores das variáveis independentes são codificados conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Tabela 12, a temperatura é a única variável que influenciou a recuperação de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico, evidenciando que os efeitos provocados pela concentração ácida e pelo tempo de residência, isoladamente, não foram significantes. Entretanto, a interação entre temperatura (A) e concentração ácida (B) foi significativa ($p < 0{,}05$) e, por este motivo, a concentração ácida (B) foi mantida no modelo matemático (Equação 15).

A Tabela 13 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 15). O modelo é significativo ($p < 0{,}05$), não possui falta de ajuste e apresenta valor razoável de R^2, igual a 0,70.

Tabela 13. Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico em função das condições operacionais de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	Falc	*p*
Modelo	5	377,88	75,58	6,27	0,0036
Resíduo	13	156,81	12,06		
Falta de ajuste	9	114,2	12,69	1,19	0,4664
Erro puro	4	42,65	10,65		
Total	18	535,59			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. R^2= 0,70.

Como o tempo não se mostrou uma variável significante na predição da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico, a equação 15 foi utilizada para a elaboração do gráfico de superfície de resposta (Figura 13), demonstrando o efeito da

concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento.

Os dados contidos na Figura 13 evidenciam que as condições experimentais que acarretam em maiores concentrações de xilose no hidrolisado hemicelulósico (acima de 22,0 g/L) são ilustradas na região demarcada em preto. Condições severas de pré-tratamento, com altas temperaturas, levam a baixas concentrações de xilose no hidrolisado; tais condições experimentais estão demarcadas na região em branco.

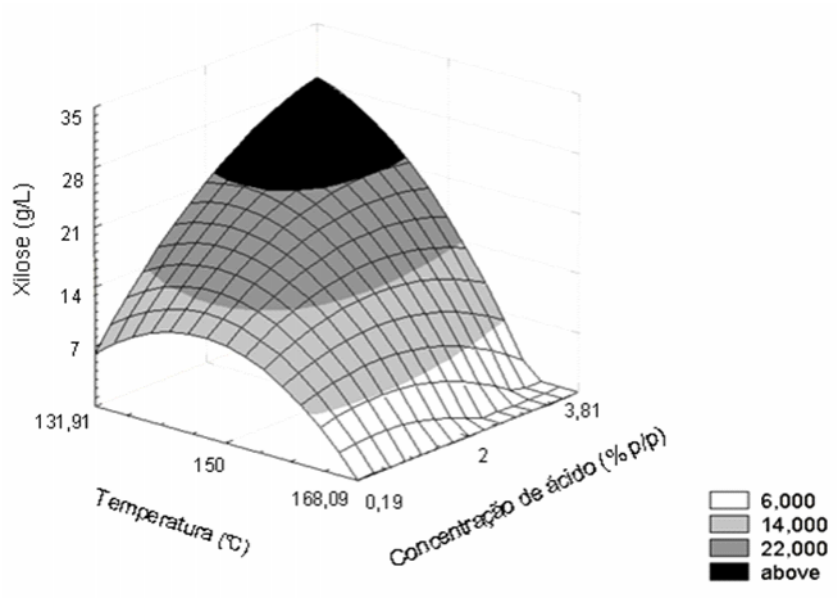

Figura 13. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na concentração de xilose do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento.

5.2.1.5. Elaboração do modelo empírico para predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico

A Tabela 14 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona a concentração de furfural presente no hidrolisado hemicelulósico com as variáveis que o influenciam, com seus respectivos níveis de significância.

Tabela 14. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	1,40	0,15	
A	1,20	0,14	<0,0001
B	0,51	0,14	0,0026
C	0,40	0,14	0,0128
A²	0,42	0,13	0,0044

A: Temperatura, B: Concentração de ácido e C: Tempo de residência.

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que as respectivas variáveis de pré-tratamento influenciam significativamente a concentração de furfural presente no hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 14, o modelo que correlaciona a concentração de furfural determinada no hidrolisado hemicelulósico com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 16:

$$C_F=1,40+1,20\ A+0,51\ B+0,40\ C+0,42\ A^2 \qquad (16)$$

Onde C_F é a concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico determinada em função da temperatura (*A*), concentração de ácido sulfúrico (*B*) e tempo de residência (*C*) utilizados no pré-tratamento, e os valores das variáveis independentes são codificados conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Equação 16, observa-se que a as três variáveis aqui analisadas influenciam estatisticamente a concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico, sendo que, quantitativamente, efeito da temperatura > efeito da concentração ácida > efeito do tempo de residência.

A Tabela 15 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 16). Novamente, o modelo é significativo ($p<0,05$), não possui falta de ajuste e o valor de demonstra que o mesmo possui boa capacidade de predição ($R^2=0,87$).

Tabela 15. Análise de variância do modelo proposto para a predição da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico em função das condições operacionais de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	Fcalc	*p*
Modelo	4	30,54	7,64	25,83	<0,0001
Resíduo	15	4,43	0,3		
Falta de ajuste	10	3,79	0,38	2,68	0,12
Erro puro	5	0,65	0,13		
Total	19	34,98			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. R^2= 0,87.

Para elaboração do gráfico de superfície de resposta, o modelo supramencionado (Equação 16) foi reduzido, fixando-se a variável tempo no nível máximo (1,81), dando origem à Equação 17.

$$T_F=2,12+1,20\ A+0,51\ B+0,42\ A^2 \qquad (17)$$

Onde T_F é a concentração de furfural determinada no hidrolisado hemicelulósico em função da temperatura (*A*) e da concentração de ácido sulfúrico (*B*).

A superfície de resposta descrita pela Equação 17 é apresentada na Figura 14. Conforme ilustrado, condições mais brandas de pré-tratamento, em termos de temperatura e concentração ácida, acarretam em menor degradação de xilose em furfural. Concentrações deste composto inferiores a 1 g/L são alcançadas trabalhando-se em valores de temperatura e concentração ácida compreendidos na região demarcada em branco na Figura 14.

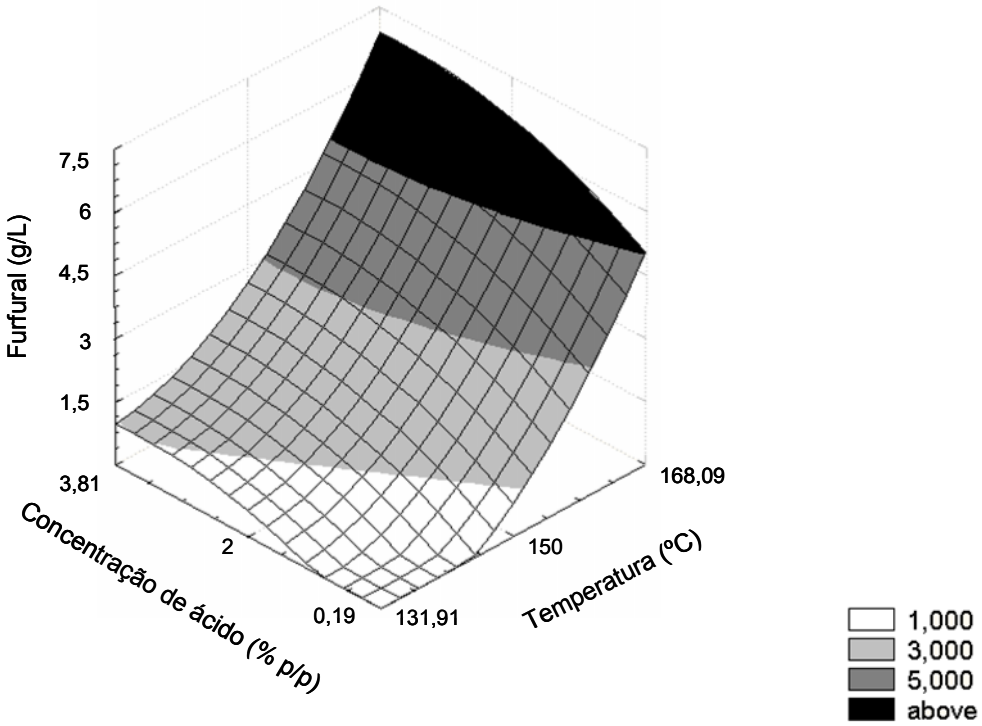

Figura 14. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na concentração de furfural do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento. O tempo de residência foi fixado em 48,09 min.

5.3. Caracterização granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído

A distribuição granulométrica das 20 amostras de bagaço pré-tratadas de acordo com o planejamento experimental foi caracterizada com a finalidade de avaliar como as condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído influenciam esta propriedade.

Os resultados obtidos evidenciaram que o pré-tratamento promoveu a redução do tamanho das partículas do bagaço de cana em todas as condições experimentais avaliadas.

Para ilustrar o comportamento supramencionado, a Figura 15 foi elaborada utilizando os dados de distribuição granulométrica dos bagaços pré-tratados a 140 °C, 1% de ácido e 20 minutos (experimento 1) e a 160°C, 3% de ácido e 40 minutos (experimento 8). A distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* também foi incluída na Figura, para facilitar a comparação.

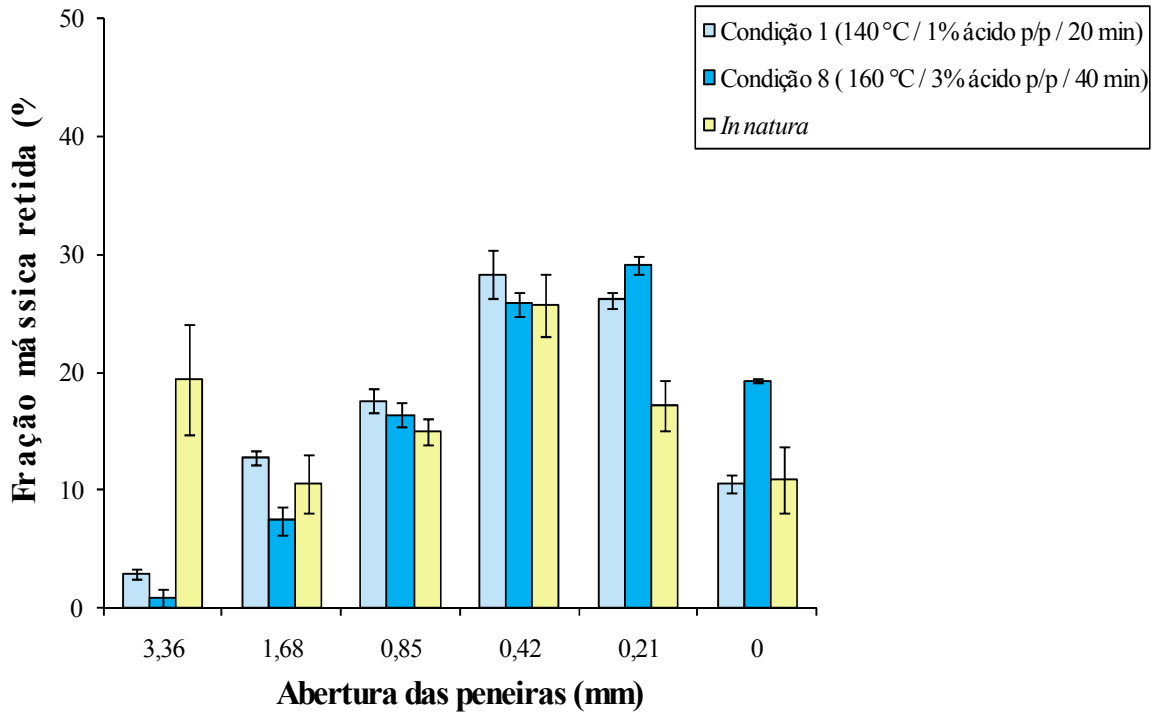

Figura 15. Distribuição granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado à 140 °C/ 1% ácido p/p/ 20 minutos , e pré-tratado a 160 °C/ 3% ácido p/p/ 40 minutos.

A Figura 15 mostra que apenas 2,85 e 0,85% da massa total do bagaço pré-tratado nas condições 1 e 8 foram retidas pela peneira com abertura de 3,36 mm, respectivamente, enquanto a porcentagem da massa de bagaço *in natura* retida pela mesma peneira foi de 19,4%. Estes dados, *per se*, já mostram que o pré-tratamento resultou na redução do tamanho das partículas do bagaço de cana. É possível observar também que 26,14 e 29,14% da massa total dos bagaços pré-tratados nas condições 1 e 8 passaram pela peneira com abertura de 0,42 mm (35 mesh) e ficaram retidas na peneira com abertura de 0,21 mm (65 mesh), respectivamente, enquanto a fração mássica do bagaço *in natura* retida nas mesmas condições foi de apenas 17,5%. Estes dados novamente evidenciam a redução do tamanho das partículas do bagaço de cana após o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído.

Do ponto de vista da engenharia de processo, a redução do tamanho das partículas do material lignocelulósico facilita o seu transporte durante o processamento e melhora a digestão enzimática dos polissacarídeos remanescentes por promover o aumento da área superficial do material e diminuir a cristalinalidade da celulose (SUN; CHENG, 2002; ZHENG et al., 2007; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Zheng e colaboradores (2007) estudaram a influência do tamanho das partículas de palha de milho na hidrólise enzimática da celulose. Observaram que, quanto menor o

tamanho das partículas, maior foi o rendimento da hidrólise enzimática. Utilizando partículas de palha de milho com tamanho de 425 a 710 μm, os autores obtiveram uma conversão de celulose em glicose de 14,6% após 72 horas de reação; em partículas com tamanho de 53 a 75 μm, obtiveram uma conversão de 25.9% no mesmo tempo de reação. Tais resultados demonstraram que, apenas com a redução do tamanho das partículas, foi possível um aumento de 1,77 vezes no rendimento da hidrólise enzimática da celulose.

Por sua vez, Silva e colaboradores (2010), estudando o efeito da moagem de bagaço e palha de cana na hidrólise enzimática, observaram que a redução do tamanho das partículas, tanto do bagaço quanto da palha, aumentou os níveis de sacarificação destes materiais. O rendimento de hidrólise enzimática do bagaço *in natura* foi de 22% e, após moagem em moinho de bolas por 30 minutos, passou a 61,7%. Tais resultados representaram um aumento de 2,8 vezes no rendimento da hidrólise enzimática do bagaço *in natura*. Estes autores também relataram que, quanto maior o tempo de moagem, maior foi o rendimento de sacarificação do bagaço. Quando este material foi moído por 120 h, foi observado 83,3% de conversão de celulose em glicose. Além de avaliar a influência da redução da granulometria na sacarificação enzimática, os autores determinaram o índice de cristalinidade do bagaço *in natura* e moído nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. O índice de cristalinidade do bagaço *in natura* foi de 0,38. Após 60 minutos de moagem, esse índice caiu para 0.

Os artigos supramencionados demonstram claramente que a redução do tamanho das partículas de materiais lignocelulósicos favorece a sacarificação enzimática da celulose contida nesses materiais.

5.4. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com H_2SO_4 diluído

Como mostrado e discutido anteriormente (item 5.2), as diferentes condições de pré-tratamento do bagaço *in natura* com ácido sulfúrico diluído geraram 20 amostras com variações nos seus percentuais de celulose, hemicelulose e lignina. Estas amostras, que após o pré-tratamento foram exaustivamente lavadas com água, foram submetidas à sacarificação enzimática a fim de verificar a influência das condições de pré-tratamento na digestibilidade enzimática da celulose contida nos bagaços pré-tratados. Além disso, o

efeito da lavagem dos sólidos no rendimento de sacarificação enzimática de bagaços pré-tratados foi avaliado submetendo sólidos lavados e não lavados, após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática. Os dados referentes aos experimentos supramencionados são apresentados nos subitens seguintes.

5.4.1. Efeito da lavagem dos sólidos previamente à sacarificação enzimática

Com o intuito de avaliar o efeito da lavagem dos sólidos na digestibilidade enzimática da celulose, bagaços pré-tratados com H_2SO_4 diluído obtidos sob a mesma condição de pré-tratamento, lavados (SL) e não-lavados (SNL), foram submetidos à sacarificação enzimática. As amostras utilizadas neste experimento foram àquelas obtidas nas condições mais branda e severa de pré-tratamento (experimentos 14 e 13, respectivamente) segundo o fator de severidade combinada (Tabela 5).

A Tabela 16 mostra os rendimentos de sacarificação enzimática das amostras supramencionadas nos tempos de 24, 48 e 72h.

Tabela 16. Digestibilidade enzimática de amostras selecionadas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado lavado (SL) e não lavado (SNL) em 24, 48 e 72 horas.

Exp	Composição química				Hidrólise enzimática			FSC*
	Bagaço (% p/p)			Hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Glicose	24h	48h	72h	log R_0
13 SL[1]	64,04	1,23	30,05	5,29	52,26±3,9	65,06±3,4	75,00±0,5	2,55
13SNL[2]					0	0	0	
14 SL[1]	52,38	17,62	21,25	0,19	24,75±2,3	29,47±2,2	32,16±1,5	1,16
14SNL[2]					18,37±0,0	23,35±2,0	23,94±0,2	

[1] Sólidos lavados; [2]Sólidos não lavados.
**Fator de severidade combinada*

Os dados apresentados na Tabela 16 demonstram que os rendimentos de sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados lavados (SL) ou não (SNL) com água variaram de acordo com o fator de severidade combinada, com o teor de hemicelulose residual e com as concentrações de glicose nos respectivos hidrolisados hemicelulósicos.

Observa-se que em 72 horas de hidrólise os rendimentos de sacarificação dos sólidos pré-tratados lavados (SL), obtidos sob as condições experimentais 13 e 14, foram

75,00% e 32,16%, respectivamente. A maior conversão de celulose foi observada no experimento 13 (SL), que corresponde à condição de pré-tratamento mais severa segundo o fator de severidade combinada (log R_0 = 2,55). Estes dados demonstram que, quanto maior a severidade de reação, menor o teor residual de hemicelulose no bagaço pré-tratado e, como conseqüência, há o aumento da digestão enzimática da celulose remanescente nessa fração, comprovando que a remoção de hemicelulose favorece e incrementa os rendimentos de sacarificação enzimática da celulose (OHGREN et al, 2007; JENSEN et al, 2010).

Observam-se também diferenças entre rendimentos de sacarificação enzimática de bagaços lavados (SL) ou não (SNL) com água, obtidos nas mesmas condições de pré-tratamento. Por exemplo, em 72h de reação o bagaço obtido na condição 13 lavado com água (13 SL) alcançou rendimento máximo de conversão (75,0%), enquanto não foi observada nenhuma conversão no bagaço não lavado obtido sob a mesma condição de pré-tratamento (13 SNL).

Sabe-se que a hidrólise enzimática da celulose é realizada pela ação sinérgica de três classes de enzimas: endoglucanes, exoglucanases e β-glicosidases. Esta ação sinérgica é essencial para que a hidrólise da celulose seja eficiente, uma vez que a atividade destas enzimas pode ser inibida pela presença de compostos de origem sacarídica como glicose e celobiose (RAMOS; BREUIL; SADDLER, 1993) e fenólica como vanilina e siringaldeido (XIMENES et al., 2010). Celobiose, o produto da exoglucanase, inibe tanto a atividade de exoglucanases quanto de endoglucanases (GRUNO et al., 2004), e a glicose é responsável por inibir diretamente a ação de β-glicosidases (DEKKER, 1986).

Inibidores de fermentação microbiana, como furfural, ácido acético, também podem atuar como inibidores da sacarificação enzimática de celulose, mas de forma limitada quando comparada à inibição exercida por açúcares. Hodges et al (2008), por exemplo, estudando o efeito inibitório destes compostos na sacarificação enzimática de forragem de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, não observaram diminuição no rendimento da hidrólise enzimática conduzida na presença de 3,9 g/L de furfural. Entretanto, relataram a diminuição em 10% no rendimento de sacarificação na presença de 15 g/L de ácido acético. Estes autores atribuíram à glicose o papel de principal agente inibidor da hidrólise enzimática, uma vez que foi observada uma diminuição de 20% no rendimento da conversão de celulose conduzida na presença deste açúcar. Em trabalho de natureza semelhante, Andric e colaboradores (2010), estudando o efeito da glicose durante a hidrólise enzimática de palha de trigo pré-tratada termicamente, relataram a diminuição do

rendimento de sacarificação devido à adição de glicose ao meio reacional. Estes autores observaram que a atividade especifica (grama de glicose formada por grama de enzima utilizada) sem a adição de glicose ao meio reacional foi de 1 g/g enzima em 24 horas de reação. Adicionando 10g/L de glicose à reação, a atividade específica caiu para 0,5 g/g enzima no mesmo tempo de reação, diminuindo fortemente o rendimento de sacarificação enzimática da palha de trigo pré-tratada.

Os dados apresentados nos trabalhos citados acima permitem explicar, pelo menos em parte, a diminuição da conversão de celulose entre bagaços lavados e não lavados obtidos sob a mesma condição pré-tratamento. Tendo como exemplo, a discrepância entre os rendimentos de sacarificação dos sólidos pré-tratados, lavados e não lavados obtidos na condição de pré-tratamento mais severa e com menor teor de hemicelulose residual (experimento 13 SL e SNL): 75, 00% e 0%, respectivamente. A concentração de glicose, determinada no hidrolisado hemicelulósico correspondente é de 5, 29g/L, a maior encontrada em relação aos hidrolisados referentes às demais condições de pré-tratamento (Tabela 5). Como os ensaios de hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados não lavados (SNL) foram conduzidos na presença de seu respectivo hidrolisado hemicelulósico, supõe-se que a alta concentração de glicose tenha inibido a ação de β-glicosidases e não sendo observada conversão de celulose.

Já os rendimentos de sacarificação de bagaços lavados (SL) e não lavados (SNL), em 72h de hidrólise obtidos na condição mais branda de pré-tratamento (14) são próximos: 32,18 e 23, 94%, respectivamente. Observando a concentração de glicose, determinada no hidrolisado hemicelulósico correspondente a este experimento, nota-se que é mais baixa, em relação à condição 13: 0,19 g/L, demonstrando que concentrações baixas de glicose inibem a conversão enzimática, de forma reduzida.

Os resultados apresentados nesta sessão justificam a lavagem dos sólidos pré-tratados previamente à sacarificação enzimática, a fim de remover os compostos solúveis que atrapalham a hidrólise dos polissacarídeos remanescentes no material pré-tratado.

5.4.2. Sacarificação enzimática dos sólidos submetidos a lavagem

As 20 amostras de bagaço pré-tratado lavadas com água, obtidas de acordo com o planejamento experimental (Tabela 5), foram submetidas à sacarificação enzimática.

Os rendimentos de hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* e das amostras mencionadas acima, determinados nos tempos de 24, 48 e 72 horas, são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Rendimentos de sacarificação enzimática das amostras de bagaço pré-tratadas de acordo com o planejamento experimental

Exp	Composição química			Conversão de celulose (%)			FSC*
	Celulose	Hemicelulose	Lignina				
	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	24h	48h	72h	log R_0
in natura	35,7	25,90	21,00	9,40	15,08	16,07	-
1	53,56	14,51	23,51	30,99	32,36	36,60	1,31
2	57,97	5,93	26,96	55,81	62,60	67,57	1,83
3	62,35	4,61	28,92	49,20	58,25	61,91	1,66
4	63,94	0,79	31,77	54,82	58,10	61,86	2,16
5	59,41	9,05	29,18	44,37	51,40	57,71	1,6
6	64,01	1,82	29,85	53,28	61,07	76,97	2,08
7	61,64	5,38	30,21	44,90	57,93	65,32	1,93
8	59,76	0,14	35,48	63,76	84,11	87,72	2,40
9	62,02	5,47	29,55	49,76	53,81	60,10	1,81
10	61,62	5,88	29,28	42,69	51,80	56,99	2,02
11	60,86	5,48	29,46	52,05	55,99	59,48	2,02
12	55,31	11,13	23,43	41,45	48,16	58,47	1,51
13	64,04	1,23	30,05	57,30	64,57	74,78	2,55
14	52,38	17,62	21,25	25,35	29,82	35,43	1,16
15	61,31	4,28	26,83	42,69	52,48	54,98	2,27
16	58,11	8,78	29,41	39,55	49,72	53,90	1,63
17	65,81	3,04	30,47	45,11	42,99	57,23	2,16
18	60,28	1,56	30,21	50,30	52,02	62,83	2,02
19	60,34	5,18	30,04	46,34	56,08	61,07	1,98
20	62,13	5,38	28,27	46,17	52,68	59,53	1,98

*Fator de severidade combinada

De acordo com os dados apresentados na Tabela 17, observam-se diferenças nos rendimentos de conversão de celulose em função da composição química dos bagaços obtidos após os experimentos de pré-tratamento.

Em 24 horas de hidrólise, a conversão de celulose nas amostras pré-tratadas variou de 25,35 a 63,76%. Por sua vez, os rendimentos de sacarificação enzimática observados nos tempos de 48 e 72 horas variaram, respectivamente, de 29,82 a 84,11%, e de 35,43 a 87,72%, respectivamente. Estes resultados demonstram que o rendimento da sacarificação enzimática é afetado pela composição química dos sólidos pré-tratados, que por sua vez é dependente das condições de pré-tratamento, e proporção dos constituintes estruturais de materiais lignocelulósicos, como já discutido na literatura (CANILHA et al., 2011).

Em todos os experimentos foi observado aumento considerável de conversão da celulose em relação aos valores determinados para o bagaço *in natura* (9,14, 15,08 e 16,07%, em 24, 48 e 72 h de hidrólise). Estes resultados comprovam a importância do pré-tratamento como etapa anterior à sacarificação enzimática da celulose (RAMOS; NAZHAD; SADDLER, 1993) e demonstram como o pré-tratamento com ácido diluído favorece a acessibilidade das enzimas celulolíticas à celulose (SAHA et al,. 2005).

Ainda de acordo com os dados apresentados na Tabela 17, observa-se que os valores mínimos de conversão nos três tempos analisados correspondem à condição experimental de pré-tratamento 14, onde se obteve um sólido com 17,62% de hemicelulose residual. Por outro lado, os valores máximos de conversão de celulose foram observados na condição experimental 8 onde se obteve um sólido com mínimo teor de hemicelulose (0,14%). Novamente, é possível comprovar que a remoção da hemicelulose promovida pelo pré-tratamento com ácido diluído favorece a sacarificação enzimática da celulose (LIAOet al., 2005 ÖHGREN, et al., 2007).

É possível observar que a maior parte da conversão total de celulose acontece nas primeiras 24 horas. Sendo assim, escolheu-se analisar estatisticamente os resultados determinados no tempo de 24 horas de hidrólise, e assim correlacionar a digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado com os níveis das variáveis independentes de pré-tratamento estudados de acordo com o planejamento fatorial (Tabela 1).

5.4.2.1. Elaboração do modelo empírico para predição da digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado

A Tabela 18 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo que relaciona o rendimento de digestibilidade enzimática, em 24 horas, do bagaço pré-tratado com as variáveis do planejamento experimental que o influenciam, com seus respectivos níveis de significância.

Tabela 18. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado, em 24h, em função das condições operacionais de pré-tratamento

Fator	Coeficiente	Erro padrão	*p*
Constante	49,09	1,59	
A	5,97	1,49	0,0010
B	4,08	1,49	0,0146
B²	-3,23	1,31	0,0252

A: Temperatura, B: Concentração de ácido

Valores de nível de significância (*p*) menores que 0,05 indicam que a temperatura e a concentração ácida influenciam significativamente a sacarificação do bagaço pré-tratado em 24h de hidrólise enzimática.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 18, o modelo que correlaciona a sacarificação do bagaço pré-tratado, em 24h de hidrólise enzimática, com as variáveis independentes que o influenciam é expresso pela Equação 18:

$$Cc_{24}=49,09+5,97\ A+4,08\ B-3,23\ B^2 \qquad (18)$$

Onde Cc_{24} representa a conversão de celulose contida no bagaço pré-tratado, em 24h de hidrólise enzimática, em função dos valores codificados de temperatura (*A*), concentração de ácido (*B*) utilizados no pré-tratamento. Valores das variáveis independentes codificados, conforme descrito em Material e Métodos.

De acordo com a Equação 18, quantitativamente a temperatura é a variável que exerce maior poder de influência na digestão enzimática da fração sólida obtida após o pré-tratamento, seguida pela concentração ácida.

A Tabela 19 ilustra a análise de variância do modelo supramencionado (Equação 18). Conforme pode ser observado, o modelo é significativo, não apresenta falta de ajuste, porém não possui uma capacidade de predição muito boa ($R^2 = 0,65$).

Tabela 19. Análise de variância do modelo proposto para a predição da digestibilidade enzimática do bagaço pré-tratado, em 24h, em função das condições operacionais de pré-tratamento

CV	GL	SQ	MQ	Fcalc	*p*
Modelo	3	958,74	319,58	9,88	0,0006
Resíduo	16	517,41	32,34		
Falta de ajuste	11	457,74	41,61	3,49	0,0894
Erro puro	5	59,67	11,93		
Total	19	1476,15			

CV: causa de variação; GL: graus de liberdade, SQ: soma quadrática; MQ: média quadrática. R^2= 0,65.

Como o tempo não se mostrou uma variável significante na predição da sacarificação do bagaço pré-tratado, a equação 18 foi utilizada para a elaboração do gráfico de superfície de resposta (Figura 16).

De acordo com os dados exibidos na Figura 16, nota-se que concentrações ácidas e temperaturas baixas acarretam em menores rendimentos de sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados, demarcadas na região ilustradas em branco. Entretanto, pode-se observar um aumento considerável na conversão de celulose com o aumento da temperatura e da concentração de ácido utilizadas durante o pré-tratamento do bagaço. Como discutido anteriormente no item 5.2.1.2, o aumento da temperatura e da concentração de ácido no pré-tratamento também resultou em maior remoção da hemicelulose no bagaço (Figura 11).

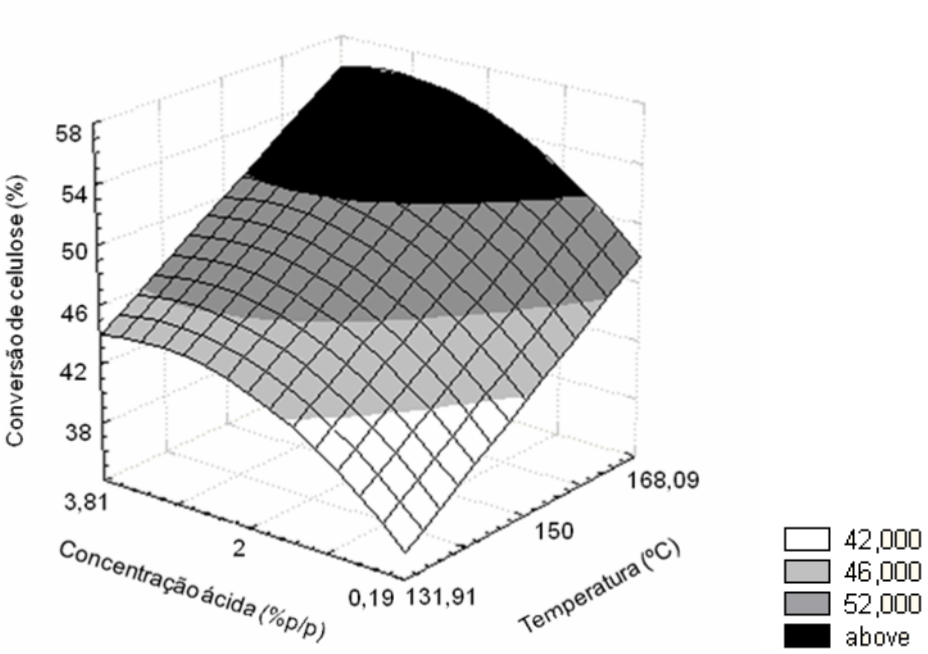

Figura 16. Superfície de resposta que demonstra o efeito da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura na conversão de celulose em glicose do bagaço de cana-de-açúcar obtido após o pré-tratamento.

5.5. Análise global dos resultados

Como mencionado anteriormente, a economia do processo de pré-tratamento com H_2S0_4 diluído é favorecida pela recuperação da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico uma vez que esta pentose pode ser utilizada para aumentar a produção de etanol, além de representar um substrato importante na produção de produtos com alto valor agregado como xilitol. Sendo assim, os critérios de estabelecimento das condições operacionais de pré-tratamento devem satisfazer a produção de um sólido com pouco conteúdo de hemicelulose, tendo assim uma alta reatividade à sacarificação enzimática da celulose, e ao mesmo tempo gerar um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e com baixa concentração de produtos de decomposição de açúcares.

A Tabela 20 mostra combinações das variáveis de pré-tratamento em seus níveis codificados máximos e mínimos, e os valores das predições para as concentrações de xilose e furfural no hidrolisado hemicelulósico, teor de hemicelulose residual no bagaço pré-tratado, e rendimento de conversão enzimática de celulose em glicose após 24h de sacarificação.

Tabela 20. Predições pontuais das variáveis dependentes em função das variáveis independentes de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído

Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes			
A **(°C)**	***B*** **(%p/p)**	***C*** **(min)**	C_X **(g/L)**	C_{C24} **(%)**	T_H **(%p/p)**	C_F **(g/L)**
-1,81	-1,81	-1,81	1,2	20,34	23,12	0
1,81			6,61	41,96	12,47	3,27
-1,81	1,81		23,7	35,17	12,04	0,79
1,81			0	56,79	1,39	5,14
-1,81	-1,81	1,81	1,2	20,34	18,18	0,38
1,81			6,61	41,96	7,54	4,73
-1,81	1,81		23,7	35,17	7,1	2,24
1,81			0	56,79	0	6,59

A: Temperatura; B: Concentração ácida; C: tempo de residência; C_X *e* C_F*: concentração de xilose e furfural determinadas no hidrolisado hemicelulósico, respectivamente;* T_H*: teor de hemicelulose determinado no bagaço pré-tratado e* C_{C24}*: conversão de celulose em glicose em 24 horas de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.*

Os dados apresentados na Tabela 20 mostram que as condições operacionais de pré-tratamento onde é possível obter máximas concentrações de xilose no hidrolisado hemicelulósico e máximos rendimentos de sacarificação enzimática da celulose contida no bagaço pré-tratado são diferentes. Por exemplo, para maximizar concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico a 23,70 g/L é necessário conduzir o pré-tratamento na concentração máxima de ácido associada à uma menor temperatura, independentemente do tempo de residência, enquanto que para se otimizar a sacarificação enzimática da celulose contida no bagaço pré-tratado a 56,8% é necessário utilizar uma maior concentração de ácido associada à uma maior temperatura, independentemente do tempo de residência. Este comportamento se deve ao fato de que quando o pré-tratamento é conduzido em altas temperaturas, é observada uma maior remoção no teor de hemicelulose do bagaço pré-tratado, como já discutido no item 5.2.1.2. A remoção de hemicelulose favorece o acesso das enzimas responsáveis por hidrolisar a celulose, o que acarreta em aumento no rendimento de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados. Por outro lado, sob altas temperaturas e condições mais severas de pré-tratamento, a xilose é desidratada a furfural, diminuindo a concentração desta pentose no hidrolisado hemicelulósico.

Para fins ilustrativos, uma superposição das curvas de nível relacionando os modelos matemáticos descritos para o rendimento de sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado e para a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico (Figura 17) foi

elaborada com o intuito de avaliar o comportamento simultâneo destas duas variáveis em função da temperatura e concentração ácida usadas no pré-tratamento.

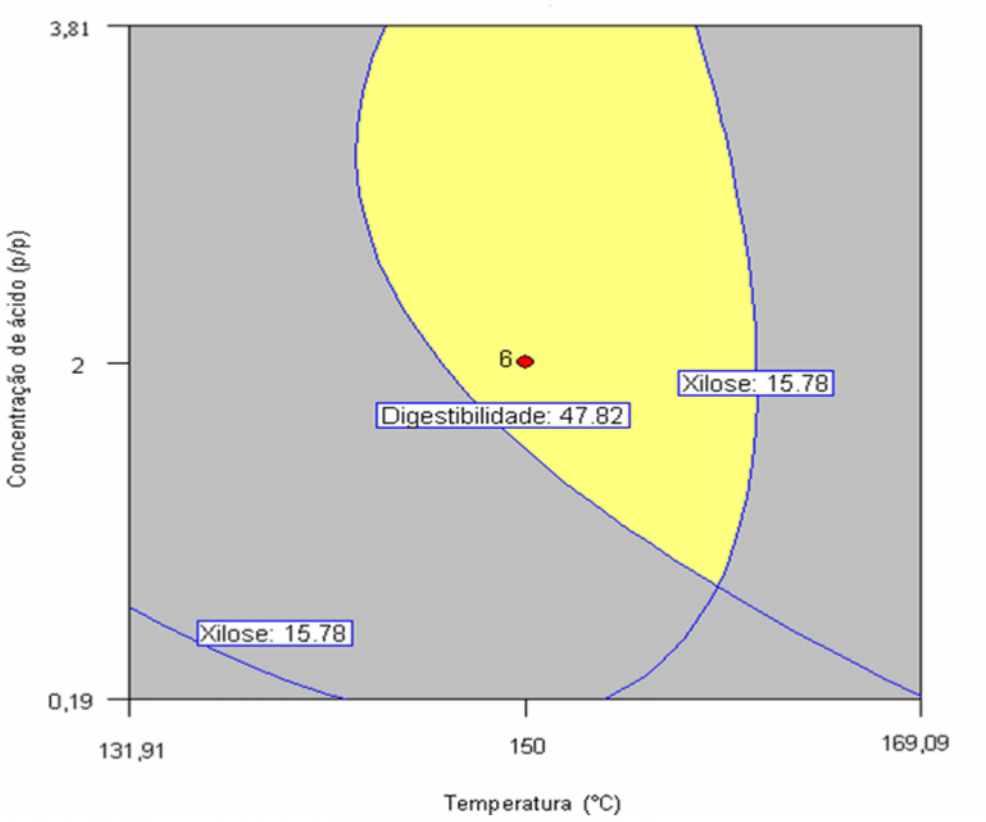

Figura 17. Superposição das curvas de nível que relacionam o rendimento de sacarificação do bagaço pré-tratado em 24 horas de hidrólise e a concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico com a temperatura e a concentração de ácido utilizadas no pré-tratamento.

Como discutido anteriormente, as condições de pré-tratamento que maximizam a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e o rendimento de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados são diferentes. Sendo assim, esta superposição de curvas foi elaborada estabelecendo como critério a obtenção de 75% dos valores máximos obtidos para ambas as respostas: 63,76% de digestão enzimática da celulose em 24 h de hidrólise (Tabela 17) e 21,05 g/L para a concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico (Tabela 5). A área de interseção das curvas descritas para os modelos supramencionados (ilustrada em amarelo) representa as condições experimentais que permitem a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico com 15,79g/L de xilose e, ao mesmo tempo, alcançar 47,82% de conversão de celulose em 24h de hidrólise enzimática.

5.6. Continuação do trabalho

O processamento da biomassa lignocelulósica a etanol ainda demanda desenvolvimento tecnológico e requer a otimização integrada das três etapas principais mencionadas ao longo do trabalho: pré-tratamento da biomassa, digestão enzimática dos sólidos pré-tratados e fermentação dos açúcares (pentoses e hexoses) a etanol.

O pré-tratamento de gramíneas como o bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído tem sido objeto de vários estudos e, como foi mostrado também no presente trabalho, gera um hidrolisado hemicelulósico que é característico por apresentar altas concentrações de xilose. Esta pentose pode ser utilizada para aumentar significativamente a produção de etanol a partir destes materiais. Neste sentido, a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído também é uma resposta muito importante a ser considerada quando se pensa no processamento dessa biomassa como um todo, dentro do conceito de biorrefinaria. Sendo assim, os hidrolisados hemicelulósicos obtidos de acordo com o planejamento experimental executado neste trabalho estão reservados e, futuramente, avaliar-se-á a fermentabilidade dos mesmos a fim de determinar como as condições operacionais de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído influenciam esta variável reposta da mais alta importância.

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído se mostrou eficiente na remoção de hemicelulose. A temperatura, a concentração ácida e o tempo de residência de pré-tratamento influenciaram a composição química dos sólidos pré-tratados, sendo que, quantitativamente, a variável com maior poder de influência no teor de celulose, hemicelulose e lignina foi a concentração de ácido, seguida pela temperatura e tempo de residência, respectivamente.

A digestibilidade enzimática dos sólidos pré-tratados variou conforme a composição química dos bagaços, que por sua vez, foi dependente das condições de pré-tratamento. A temperatura de pré-tratamento foi o fator que exerceu maior influência na sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados, seguida pela concentração ácida.

A xilose foi o açúcar predominante nos hidrolisados hemicelulósicos, obtidos após o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído; as variáveis de pré-tratamento que exerceram maior influência na concentração desta pentose foram a temperatura de trabalho e a concentração ácida. A variável com maior poder de influência na concentração de furfural foi a temperatura, seguida da concentração de ácido e do tempo de residência, respectivamente. Conclui-se também, que quanto maior a severidade das condições de pré-tratamento, maior é a remoção de hemicelulose nos sólidos pré-tratados, contudo, condições muito severas acarretam em uma maior decomposição de xilose em furfural.

Conclui-se que, as condições operacionais de pré-tratamento que maximizam a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e a digestibilidade enzimática dos bagaços pré-tratados são antagônicas.

A sacarificação enzimática dos bagaços pré-tratados não lavados após o pré-tratamento foi prejudicada pela presença de compostos solúveis no hidrolisado hemicelulósico.

O pré-tratamento com H_2SO_4 diluído acarretou na redução do tamanho das partículas do bagaço de cana-de-açúcar, em todas as condições testadas.

REFERÊNCIAS

ABEDINIFAR, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass and Bioenergy,** v. 33, p. 828-833, 2009.

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 Biotechnology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANDRIC, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSESN, K. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 160, p. 280-297, 2010.

BAUDEL, H.M.; ZAROR, C.; ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: a environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 309-315, 2005.

BERLIN A.; GILKES N.; KURABI A.; BURA R.; TU M.B.; KILBURN D. Weak lignin-binding enzymes – A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 121, 163–170, 2005.

BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.L. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 56, p. 326–338, 2001.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Celullose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583–620, 1997.

BOUCHARD, J., NGUYEN, T.S., CHORNET, E., OVEREND, R.P. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 121–131, 1991.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building.** New York: John Wiley & Sons Inc. 1978. 653p.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A.M.F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BROWNING, B.L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc.1967. p.882

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA (CBQ-2007): RECURSOS NÃO RENOVÁVEIS, 47., setembro 2007, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil, 2007 (CD-ROM).

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 92, p. 161-184, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Doi 10.1007/s10295-010-0931-2, 2011.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Reviews on Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** v. 47, p. 445–476, 1996.

CARRILLO, F.; LIS, M.J.; COLOM, X.; LÓPES-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3360–3364, 2005.

CARVALHO, W.; BATISTA, A.M.; CANILHA, L.; SANTOS, J.S.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1308-1312, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 47-53, 2007.

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

CERQUEIRA-LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 135 159, 1998.

CHUM, H.L.; JOHNSON, D.K.; BLACK, S.K. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: catalyst effects and the combined severity parameter. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 29, p. 156-162, 1990.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2010/2011**. Disponível em: *www.conab.gov.br*. Acessado em: 24/01/2011

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 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

COSTA, J. M. G.; CORRÊA, J. L. G.; SANTOS, J. C. P.; AZEVEDO, V. M. Caracterização do bagaço de cana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 17., setembro 2008, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. **Anais**, 2008 (CD-ROM).

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação da pasta celulósica.** São Paulo: IPT-SENA, 1988. v.1, cap. 3, p. 46-53; 68; 69; 76; 77; 95.

DEKKER R.F.H. Kinetic, inhibition, and stability properties of commercial β-D-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocelluloses. **Biotechnology and Bioengineenier**, v.28, p. 1438-1442, 1986.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces*

cerevisiae, Zymomonas mobilis, *Pichia stipitis,* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology***,* v. 19, p. 220–225, 1996.

DING, S.Y.; HIMMEL, M.E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** v. 54, p. 597–606, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EMPRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Agroecologia da cana-de-açúcar.** Disponível em *http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html*. Acessado em 01/06/2010.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 353–364, 2002.

ESTEGHLALIAN, A.; HASHIMOTO, A.G.; FESKE, J.J.; PENNER, M.H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, polplar and switchgrass, **Bioresouce Technology**, v. 59, p. 129-136, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, Berlim: Walter de Gruyter, 1989. p. 67-68;106-108;133-134;139-141.

GALBE, M.; ZACCHI, G.A. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 59, p. 618-628, 2002.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering,** v. 74, p. 78-88, 2006.

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

GARROTE, G., PARAJO, J.C. Non-isothermal autohydrolysis of eucalyptus wood. **Wood Science and Technolology**, v. 36, p. 111–123, 2002.

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

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

GROHMMAN, K.; HIMMEL, M.; RIVARD, C.; TUCKER, M.; TORGET, R.; GRABOSKI, M. Chemical-mechanical methods for the enhanced utilization straw. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 14, p. 137-157, 1984.

GRUNO, M.; VÄLJAMÄE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 11, p. 86-92, 2004.

HAMES, B.R.; THOMAS, S.R.; SLUITER, A.D.; ROTH, C.J.; TEMPLETON, D.W. Rapid Biomass Analysis, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 5-16, 2003.

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

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

HINMAN, N.D.; SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; BERGERON, P.W.; WALTER, P.J. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. **Applied Biochemestry Biotechnology,** v. 34, 639–649, 1992.

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

HOLTZAPPLE M.T., HUMPHREY A.E. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p. 670–676, 1984.

HSU, T.C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907-4913, 2010.

JENSEN, J.R.; MORINELLY, J.E.; GOSSEN, K.R.; BRODEUR-CAMPBELL, M.J.; SHONNARD, D.R. Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2317-2325, 2010.

JOHANSSON, A.; AALTONEN, O.; YLINEN, P. Organosolv pulping -- methods and pulp properties, **Biomass**, v. 13, p. 45-65, 1987.

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

KABEL, M.A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresouce Technology**, v. 98, p. 2034-2042, 2007.

KAI, Y. Chemistry of Extractives. In: HON D.N.S.; SHIRAISHI N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. Nova York: Marcel Dekker., 1991. p. 215.

KONG, C.R.E.; SOLTES, E.J.F. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. **Applied Biochemistry and Biotechnology** ,v.34-35, p. 23–35,1992.

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

KUMAR, S.; SINGH, S.P.; MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1483-1489, 2009.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1–24, 1997.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I.S. Overview of the Chemical Composition of Wood. In: Wood Structure and Composition, Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 2-5.

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

LLOYD, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1967-1977, 2005.

LU, Y., YANG, B., GREGG, D., SADDLER, J.N., MANSFIELD, S.D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam–exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 641–654, 2002.

MARTIN, C.; MATS, G.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L.J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MARTINS, L.F. **Caracterização do complexo celulásico de *Peniccilium echinulatum*.** 2005. 111 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATTHEWS, J.F.; SKOPEC, C.E.; MASON, P.E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R.W.; SUGIYAMA, J. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. **Carbohydrate Research,** v. 341, p. 138–152, 2006.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2^3 experimental design. **Applied Energy**, v. 87, p.109-114, 2010.

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

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49-58, 2002.

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

OKAMURA, K. Structure of Cellulose. In: HON D.N.S.; SHIRAISHI N. **Wood and Cellulosic Chemistry**, Nova York:Marcel Dekker, 1991. p. 89

PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technolology,** v. 74, p. 25–33, 2000.

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

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

QUESADA, M.; RUBIO, M.; GOMEZ, D. Ozonation of lignin rich solid fractions from corn stalks. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v.19, p. 115–137, 1999.

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

RAMOS, L.P.; BREUIL, C.; SADDLER, J.N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma cellulases*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 19-25, 1993.

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

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R.C.L.R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171- 176, 2003.

RODRIGUES, R.C.L.B.; ROCHA, G.J.M.; RODRIGUES-JR, D.; FILHO, H.J.I.; FELIPE, M.G.A.; PESSOA-JR, A.P. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing

sugarcane bagasse hemicellosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1247-1253, 2010.

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

SAKAKIBARA, A. Chemistry of Lignin In: HON D.N.S.; SHIRAISHI N. **Wood and Cellulosic Chemistry**, Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 114

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v. 59, 447-450, 2001.

SANTOS, V.T.O.; CANILHA, L.; CASTRO, P.F.; BASBOSA, L.D.F.O.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 9., novembro 2009, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil. **Livro de resumos**, 2009.

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

SCHELL, D.J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilute–Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 69-85, 2003.

SELIG, M. J.; VIAMAJALA, S.; DECKER, S. R.; TUCKER, M. P.; HIMMEL, M. E.; VINZANT, T. B. Deposition of Lignin Droplets Produced During Dilute Acid Pretreatment of Maize Stems Retards Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 1333-1339, 2007.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology,** v. 6, p. 219–228, 2003.

SILVA, A.S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E.P.S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.

SILVERSTEIN, R.A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; BOYETTE, M.D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3000–3011, 2007.

SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6679-6681, 2009.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrates polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

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

SZCZODRAK, J; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, p. 367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p. 1621-1651, 2008.

TIJANI, M.N. Contamination of shallow groundwater system and soil-plant transfer of trace metals under amended irrigated fields. **Agricultural Water Management**, v. 96, p. 437-444, 2009.

TU, M.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7771-7778, 2009.

UNICA (União da Agroindústria Canavieira de São Paulo). Cana-de-açúcar: subprodutos. Disponível em: *www.unica.com.br/pages/cana_subprodutos.asp*. Acessado em: 08/03/2010.

VÄLJAMÄE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal–like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 84, p. 254–257, 2003.

VIDAL; P.F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin - improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, v. 16, p. 1-17, 1988.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

WINDHAM, W.R.; HILL, N.S.; STUEDEMANN, J.A. Ash in forage, esophageal, and fecal samples analyzed using near-infrared reflectance spectroscopy. **Crop Science,** v. 31, p. 1345–1349, 1991.

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

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

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88**,** p.798 – 824, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3729-3736, 2008.

ZHENG, M.; MOSIER,N.S.; HUANG, C.P.; SHERMAN, D.M.; LADISH, M.R. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn storve due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biotechnolology and Bioengeenier***,* v. 97, p. 265-278, 2007.

ZHU, J.Y.; PAN, X.J. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4992-5002, 2010.

ZHU, L.; O'DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817–3828, 2008.