

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

LÚCIA DANIELA WOLF

**PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSSOLVE DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE
XILOOLIGÔMEROS**

**SÃO CARLOS
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

LÚCIA DANIELA WOLF

**PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSSOLVE DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE
XILOOLIGÔMEROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na área de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

***Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano
Co-orientador: Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha***

**SÃO CARLOS
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

W853po

Wolf, Lúcia Daniela.

Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros / Lucia Daniela Wolf. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
147 f.

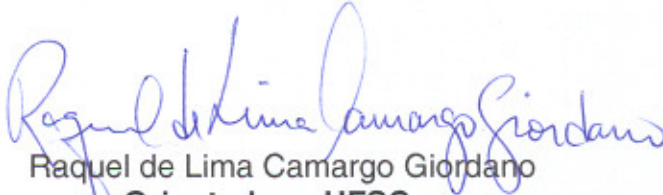
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Engenharia química. 2. Deslignificação. 3. Hidrólise enzimática. 4. Alcool. 5. Xilooligossacarídeos. I. Título.


CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **LÚCIA DANIELA WOLF** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 29 DE MARÇO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:



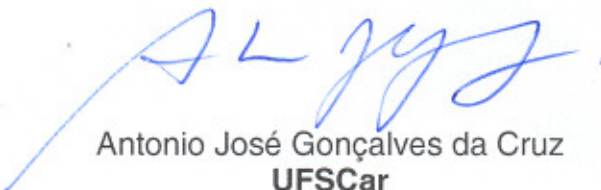
Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar



George Jackson de Moraes Rocha
Co-orientador, CTBE



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA



Antonio José Gonçalves da Cruz
UFSCar

Dedico esta dissertação aos meus pais Aparecida e Antônio, às minhas irmãs Marcia e Alessandra e aos meus cunhados (irmãos) Amauri e Alessandro pelo incentivo e apoio em todos os momentos de minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta realização.

À Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano pela orientação, apoio e confiança no meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos e palavras sábias que contribuíram para meu crescimento profissional e, sobretudo pessoal.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha pela co-orientação e valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, minha sincera gratidão e consideração.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química que fazem parte do Projeto Temático FAPESP BIOEN, principalmente ao Prof. Antônio e Prof. Roberto pelas valiosas discussões.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao BIOEN e ao Departamento de Engenharia Química por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao CTC pelo fornecimento do material de estudo: bagaço de cana-de-açúcar.

Ao CTBE pela disponibilização de suas instalações que foram de vital importância para a realização deste trabalho.

À Empresa Genencor pelo fornecimento das enzimas utilizadas neste trabalho.

À USP de Lorena pela ajuda na caracterização química do bagaço de cana e análises de MEV, principalmente ao Prof. Adilson, à Naila, à Jussara e ao Bento pela disposição em ajudar.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária de São Carlos pela contribuição no uso de equipamentos.

Ao Amadeus, Espanhol, Tiago e Tais pela amizade e importante auxílio técnico durante a realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Lionete, Cláudia, Viviane, Mirella, Diogo, Anny, Sandra, Cristini, Chanel, João, Karina, Ana e Cintia pelos momentos de descontração.

À Anny pela amizade e grande contribuição nos estudos dos xilooligômeros.

À Úrsula pela amizade e ajuda despretensiosa.

À Vivi pelo companheirismo, amizade e por todas as experiências compartilhadas desde o primeiro dia de laboratório.

Em especial aos meus pais, irmãs e cunhados (irmãos) pelos conselhos, incentivos, por acreditarem em mim e torcerem pela concretização de mais uma etapa de minha vida.

Ao meu namorado Daniel pela dedicação, carinho, apoio e presença em todos os momentos.

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

*"O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos, é o inatingível.
Para os temerosos, o desconhecido.
Para os valentes, a oportunidade."*

Victor Hugo

RESUMO

Bagaço de cana é um subproduto lignocelulósico abundante no Brasil, devido à alta produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar, o que torna esse material uma atraente alternativa para obtenção de etanol celulósico e outros produtos de maior valor agregado. O uso de bagaço, entretanto, requer etapa de pré-tratamento para melhor aproveitamento de suas frações. Neste trabalho, propôs-se avaliar diferentes condições operacionais de pré-tratamento organossolve do bagaço, seguido ou não de deslignificação alcalina, catalisado ou não com ácido, visando à aplicação da celulose para produção de etanol e da xilana para produção de xilooligossacarídeos (XOS). As reações de pré-tratamento foram realizadas em reator de alta pressão (Parr) sob diferentes condições de temperatura (150, 170 e 190°C), tempo (10, 30, 60 e 90min), concentração de etanol (30, 50 e 70%), com relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) e agitação de 300 rpm. Os pré-tratamentos com maior grau de severidade foram seguidos de deslignificação com NaOH 1% (m/v) a 100°C por 1h. Catálise ácida com H₂SO₄ 1% (m/m) foi utilizada na condição de tratamento a 190°C/10min/50% etanol com e sem a etapa de deslignificação alcalina. A avaliação de eficiência do pré-tratamento foi feita através da caracterização estrutural, química e gravimétrica da fração sólida obtida, da conversão enzimática da celulose na hidrólise dessa fração e do rendimento em etanol após fermentação do hidrolisado. A fração líquida foi caracterizada quanto ao rendimento da extração de xilana e à proporção obtida entre oligômeros de xilana e xilose. As condições de maior grau de severidade para os pré-tratamentos apresentaram maior solubilização de lignina e hemicelulose com média de 80% e 86,3%, respectivamente, e degradação média de celulose de 2,4%. Essas mesmas condições, quando acrescidas de deslignificação alcalina, levaram a aumento na solubilização de lignina e hemicelulose, 89,7% e 96,8%, respectivamente, porém houve uma perda média de 14% da fração celulósica inicial. Já o uso de catalisador ácido, embora tenha promovido aumento na solubilização de lignina (4%) e de hemicelulose (12%), levou a uma expressiva degradação da fração celulósica, com perda mássica de 34% e 12,6%, com e sem a etapa de deslignificação alcalina, respectivamente. A condição de pré-tratamento a 190°C/10min/50% etanol promoveu maior conversão enzimática (61,2%) com degradação de apenas 1% de celulose e, após etapa de deslignificação alcalina, atingiu 88,2%. A deslignificação alcalina conduziu a aumento na conversão para todas as condições testadas, mas também levou a perdas significativas de celulose. Por outro lado, o uso de catalisador ácido não teve efeito significativo na hidrólise enzimática. A fermentação desses hidrolisados foi igualmente satisfatória para todas as condições avaliadas, com rendimento médio de 80%. As análises de MEV mostraram alterações na estrutura morfológica da fibra em relação ao bagaço *in natura*, para as diferentes condições de pré-tratamento. O licor negro obtido após pré-tratamento foi avaliado quanto sua fração hemicelulósica obtendo, para a melhor condição (170°C/60min/50% etanol), 54,5% de xilooligômeros e apenas 2% de xilose, com rendimento de 75% na recuperação da xilana presente inicialmente no bagaço.

Palavras chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Pré-tratamento organossolve. Deslignificação alcalina. Hidrólise enzimática. Etanol.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is an abundant lignocelulosic byproduct, due to the high ethanol production from sugarcane juice, which turns this residue an attractive alternative for obtaining cellulosic ethanol and other products of higher value added. However, the use of bagasse requires a pre-treatment step for better use of its fractions. It was proposed in this study, an evaluation of different operational conditions of bagasse Organosolv pre-treatment, followed or not by alkaline delignification, acid catalyzed or not, aiming the application of cellulose to ethanol production and xylan to produce xylo-oligosaccharides (XO). The pre-treatment reactions were conducted in a high pressure reactor (Parr) under different temperature conditions (150, 170 and 190°C), time (10, 30, 60 and 90min), ethanol concentration (30, 50 and 70%), with solid:liquid ratio of 1:10 (w/v) and stirring speed of 300 rpm. The pre-treatments with higher severity factor were followed by delignification with 1% NaOH (w/v) at 100°C for 1 hour. Acid catalysis with 1% H₂SO₄ (w/w) was used in the pre-treatment condition at 190°C/10min/50% ethanol with or without the alkaline delignification step. The evaluation of pre-treatment efficiency was carried out using structural, chemical and gravimetric characterization of the obtained solid fraction, cellulose enzymatic conversion in the hydrolysis of this fraction and ethanol yield after hydrolysate fermentation. The liquid fraction was characterized with respect to its xylan yield and the ratio obtained between xylan oligomers and xylose. The conditions of higher severity factor presented higher lignin and hemicelulose solubilization with average values of 80% and 86,3%, respectively, and average cellulose degradation of 2,4%. The same conditions, when associated with alkaline delignification, led to a increase on lignin and hemicelulose solubilization, 89,7% and 96,8%, respectively. However, the average initial cellulosic fraction loss of 14% was depicted. The use of acid catalyst, despite having promoted increase in solubilization of lignin (4%) and hemicelulose (12%), led to a expressive degradation of the cellulosic fraction, with mass loss of 34% and 12,6%, with and without alkaline delignification, respectively. The pre-treatment condition at 190°C/10min/50% ethanol promoted a higher enzymatic conversion (61,2%) with cellulose degradation of only 1% and after alkaline delignification step, reached 88,2%. The alkaline delignification led to a conversion increase for all the conditions tested, but also led to significant cellulose losses. On the other hand, the use of the acid catalyst had no significant effect on enzymatic hydrolysis. The fermentation of the hydrolysates was equally satisfactory for all the conditions evaluated, with average yield of 80%. The SEM analysis showed changes on the morphological structure of the fiber compared to the *in natura* bagasse, for the different pre-treatment conditions. The black liquor obtained after the pre-treatment was evaluated with respect to its hemicelulosic fraction, obtaining 54,5% of xylo-oligomers and only 2% of xylose at the best condition (170°C/60min/50% ethanol), with 75% of recovery yield of xylan initially present in the bagasse.

Keywords: Sugarcane bagasse, Organosolv pre-treatment, Alkaline delignification, enzymatic Hydrolysis, Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Matriz energética brasileira e mundial (adaptado de BRASIL – EPE, 2010).....	23
Figura 2.2	Representação esquemática da cana-de-açúcar (adaptado de http://science.howstuffworks.com/grasses/sugarcane-info.htm).....	25
Figura 2.3	Rotas Tecnológicas para produção de etanol de biomassas (adaptado de PEREIRA JR, 1991).....	28
Figura 2.4	Produtividade média de etanol por área para diferentes culturas (BIOETANOL..., 2008).....	29
Figura 2.5	Arquitetura da parede celular vegetal (adaptada de http://genomics.energy.gov).....	32
Figura 2.6	Representação da cadeia linear de celulose formada por unidades consecutivas de celobiose (TÍMAR-BALÁZSY; EASTOP, 1998).....	33
Figura 2.7	Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na estrutura supramolecular da celulose (adaptado de COUGHLAN, 1985).....	34
Figura 2.8	Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL; WENEGER, 1989).....	35
Figura 2.9	Estrutura dos alcoóis precursores da lignina (DENCE; LIN, 1992).....	37
Figura 2.10	Fração de uma molécula de lignina de <i>Fagus sp</i> segundo Fengel e Wegener (1989).....	37
Figura 2.11	Produtos obtidos a partir da celulose (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).....	40
Figura 2.12	Produtos obtidos a partir da hemicelulose (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).....	41
Figura 2.13	Produtos obtidos a partir da lignina (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).....	43
Figura 2.14	Processo geral para produção de etanol de segunda geração.....	44
Figura 2.15	Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).....	45
Figura 2.16	Reação de condensação entre os fragmentos solubilizados de lignina (adaptado de BIANCHI, 1995).....	51

Figura 2.17	Plataforma de biorrefinaria baseada no pré-tratamento organossolve (adaptada de ZHAO, 2009).....	55
Figura 2.18	Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose (adaptado de PITARELO, 2007).....	57
Figura 2.19	Fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (adaptado de JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).....	58
Figura 2.20	Formação de produtos de degradação da xilose e glicose (adaptado de PEDERSEN; MEYER, 2010).....	60
Figura 3.1	Foto do Reator Parr (1); Reator sendo retirado do sistema de aquecimento e resfriado com auxílio de uma mangueira de água (2) e (3); Tampa do reator com sistema de agitação, manômetro e válvulas de pressão acoplados (4); vaso do reator contendo bagaço pré-tratado (5).....	62
Figura 3.2	Fluxograma da metodologia empregada para o estudo do bagaço de cana.....	64
Figura 3.3	Fluxograma da metodologia empregada para o estudo do bagaço de cana pré-tratado seguido de deslignificação alcalina.....	68
Figura 3.4	Fluxograma das etapas de caracterização do bagaço <i>in natura</i> e bagaço pré-tratado.....	71
Figura 3.5	Fluxograma das etapas de trabalho para obtenção dos xilooligômeros a partir do licor negro.....	80
Figura 4.1	Rampas de aquecimento das reações de pré-tratamento: (a) 150°C/30min; (b) 170°C/60min; (c) 190°C/90min e (d) 190°C/10min, sendo ▲70% de etanol; ■ 50% de etanol e ◆30% de etanol em solução.....	86
Figura 4.2	Foto do bagaço de cana <i>in natura</i> (a) e pré-tratado nas seguintes condições: 150°C/30min (b), 170°C/60min (c) e 190°C/90min (d).....	88
Figura 4.3	Correlação linear do rendimento e da solubilização de lignina e hemicelulose em função da severidade de pré-tratamento para soluções com 30% (a), 50% (b), e 70% (c), de etanol.....	89
Figura 4.4	Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 30% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.....	90
Figura 4.5	Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 50% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.....	92

Figura 4.6	Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 70% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.....	92
Figura 4.7	Comparação dos diferentes tempos de reação na solubilização da fração celulósica (1), da fração hemicelulósica (2) e da fração de lignina (3) para a condição de 50% de etanol em solução e temperatura de 190°C.....	93
Figura 4.8	Rendimento do pré-tratamento a 190°C/90min com solução de etanol a 30% (1); 50% (2) e 70% (3) seguidos ou não de deslignificação alcalina.....	95
Figura 4.9	Fotos do bagaço de cana após pré-tratamento organossolve a 190°C/90min variando a concentração de etanol em solução: (a) 30%; (b) 50% e (c) 70% e bagaço de cana pré-tratado seguido de deslignificação com NaOH (1% m/v) 100°C/1h.....	97
Figura 4.10	Comparação dos diferentes tempos de reação na solubilização da fração celulósica (1), da fração hemicelulósica (2) e da fração de lignina (3) para a condição de pré-tratamento organossolve de 50% de etanol em solução e temperatura de 190°C seguido de deslignificação alcalina.....	98
Figura 4.11	Solubilização dos componentes do bagaço pré-tratado a 190°C/10min/50% etanol (1), pré-tratado com uso de catalisador ácido (2), pré-tratado e deslignificado com NaOH (3) e pré-tratado com catalisador ácido e deslignificado com NaOH (4).....	99
Figura 4.12	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L) em função do tempo de hidrólise para bagaço pré-tratado nas condições de 190°C por 90 min a 50% de etanol.....	102
Figura 4.13	Comportamento da hidrólise enzimática em relação às diferentes quantidades de lignina e hemicelulose presentes no bagaço de cana sob diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	103
Figura 4.14	Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 4,2.....	104
Figura 4.15	Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 5,2.....	105
Figura 4.16	Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 5,9.....	105
Figura 4.17	Comparação entre os pré-tratamentos com e sem deslignificação alcalina em relação à concentração de glicose (g/L) obtida no hidrolisado nas seguintes condições de pré-tratamento: 190°C/90min e concentração de etanol 30% (1); 50% (2), 70% (3).....	108

Figura 4.18	Perfil da conversão enzimática (%) em relação ao tempo de hidrólise para amostras pré-tratadas com e sem a etapa de deslignificação nas condições de 190°C por 90 min e 30% de etanol (a), 50% de etanol (b) e 70% de etanol (c).....	108
Figura 4.19	Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> . Ampliação de 350x, 500x e 1000x.....	113
Figura 4.20	Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 150°C/30min/50% etanol (A), 170°C/60min/50%etanol (B) e 190°C/90min/50%etanol (C). Ampliação de 500x e 1000x.....	114
Figura 4.21	Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 190°C/10min/50% etanol (D) e 190°C/10min/50%etanol seguido da etapa de deslignificação alcalina (E). Ampliação de 500x, 1000x e 3000x.....	115
Figura 4.22	Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 190°C/10min/50% etanol com catalisador ácido (F) e 190°C/10min/50%etanol com catalisador ácido seguido da etapa de deslignificação alcalina (G). Ampliação de 500x e 1000x.....	116
Figura 4.23	Perfis de hidrólise das amostras submetidas a diferentes condições de pré-tratamento organossolve, sendo ◆ concentração de glicose e ■ concentração de etanol em g/L.....	118
Figura 4.24	Perfis de hidrólise das amostras <i>in natura</i> , controle e amostras submetidas ao pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina e pré-tratamento organossolve com uso de catalisador ácido, sendo ◆ concentração de glicose e ■ concentração de etanol, em g/L.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição química de alguns tipos de biomassa.....	32
Tabela 2.2	Diferenças entre celulose e hemicelulose (adaptada de BIANCHI, 1995).....	36
Tabela 2.3	Mudanças nas características composicionais da biomassa devido a alguns tipos de pré-tratamento, além de suas vantagens e desvantagens (adaptada de ZHU, 2005).....	46
Tabela 2.4	Solventes e catalisadores comumente utilizados nos processos organossolve (MUURINEN, 2000; SARKANEM, 1990).....	48
Tabela 3.1	Condições de pré-tratamento organossolve avaliadas para o bagaço de cana.....	65
Tabela 3.2	Condições de pré-tratamento organossolve dos experimentos que seguiram a deslignificação alcalina.....	69
Tabela 3.3	Condições dos experimentos utilizados para análise do licor negro contendo a fração de xilana solubilizada.....	80
Tabela 4.1	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (%).....	83
Tabela 4.2	Valores percentuais do rendimento mássico e da massa de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas, obtidas na caracterização química e gravimétrica da fração sólida obtida após pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de etanol.....	85
Tabela 4.3	Valores da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e bagaço pré-tratado corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento.....	85
Tabela 4.4	Grau de severidade para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	88
Tabela 4.5	Valores da caracterização química do bagaço de cana e corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina.....	95
Tabela 4.6	Solubilização dos componentes do bagaço de cana antes e após deslignificação com NaOH nas condições de 190°C/90min a 30, 50 e 70% de etanol.....	96
Tabela 4.7	Rendimento mássico e composição (% \pm desvio padrão) do material pré-tratado sob diferentes condições.....	99

Tabela 4.8	Concentração de glicose (g/L) e conversão enzimática de celulose em glicose (%) em 42 h da primeira condição de hidrólise da fração sólida avaliada para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	101
Tabela 4.9	Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado em 72h e conversão enzimática (%) em 42 h e 72 h da segunda condição de hidrólise da fração sólida avaliada para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	103
Tabela 4.10	Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado e conversão enzimática (%) em 72 h de hidrólise para as condições de maior grau de severidade do pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina.....	107
Tabela 4.11	Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado e conversão enzimática (%) após 72 h para bagaço pré-tratado a 190°C/10min/50% etanol com e sem deslignificação alcalina e catalisador.....	110
Tabela 4.12	Comparação entre a conversão enzimática (%) e o teor de lignina residual (%) nas amostras pré-tratadas em diferentes condições.....	111
Tabela 4.13	Concentração em g/L de glicose inicial e etanol produzido pela levedura, além de rendimento e eficiência de fermentação dos diferentes hidrolisados submetidos à fermentação.....	117
Tabela 4.14	Concentração em g/L de glicose inicial e etanol produzido pela levedura, além de rendimento e eficiência de fermentação dos diferentes hidrolisados submetidos à fermentação.....	120
Tabela 4.15	Contagem de células por Câmara de Neubauer (cel/mL).....	120
Tabela 4.16	Rendimento de xilooligômeros e xilose em relação à xilana solubilizada (calculada pela perda de xilana na fração sólida) para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Biomassa e Energia.....	22
2.2 A Cana-de-açúcar: Características e origem.....	23
2.2.1 Aspectos econômicos da cana-de-açúcar.....	25
2.3 Bioetanol.....	27
2.4 Bagaço de cana-de-açúcar.....	30
2.5 Composição e estrutura do bagaço de cana-de-açúcar.....	31
2.5.1 Celulose.....	33
2.5.2 Hemicelulose.....	34
2.5.3 Lignina.....	36
2.5.4 Extrativos e Cinzas.....	38
2.6 Conceito de Biorrefinaria.....	38
2.6.1 Produtos obtidos a partir da celulose.....	39
2.6.2 Produtos obtidos a partir da hemicelulose.....	40
2.6.2.1 Xilooligossacarídeos.....	41
2.6.3 Produtos obtidos a partir da lignina.....	43
2.7 Pré-Tratamento do Material Lignocelulósico.....	43
2.7.1 Processos Organossolve.....	47
2.7.1.1 Polpação Organossolve.....	47
2.7.1.2 A deslignificação nos processos organossolve.....	50
2.7.1.3 Pré-Tratamento Organossolve.....	52
2.8 Hidrólise do Material Lignocelulósico.....	55

2.9 Fermentação alcoólica de glicose.....	59
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1 Matéria-prima para estudo.....	61
3.2 Pré-Tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar.....	61
3.3 Deslignificação do bagaço pré-tratado com solução alcalina diluída.....	67
3.4 Estudo do efeito do tempo e do uso de catalisador ácido nas reações de pré-tratamento	70
3.5 Caracterização química do bagaço.....	70
3.5.1 Determinação do teor de umidade.....	72
3.5.2 Moagem.....	72
3.5.3 Determinação do teor de extrativos.....	72
3.5.4 Hidrólise Ácida.....	73
3.5.5 Determinação de lignina insolúvel.....	73
3.5.6 Determinação de cinzas totais.....	74
3.5.7 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos.....	74
3.5.8 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF).....	75
3.5.9 Determinação da lignina solúvel.....	75
3.6 Análise do bagaço de cana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	76
3.7 Hidrólise Enzimática	76
3.8 Fermentação do hidrolisado enzimático.....	79
3.9 Estudo da fração hemicelulósica solubilizada no licor negro.....	80
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar.....	83
4.2 Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana.....	84
4.2.1 Caracterização do bagaço de cana pré-tratado.....	84

4.2.2 Efeito do tempo de reação na solubilização dos componentes do bagaço de cana para o pré-tratamento organossolve.....	93
4.2.3 Efeito do uso de catalisador ácido no pré-tratamento organossolve.....	94
4.2.4 Deslignificação alcalina da celulignina obtida no pré-tratamento organossolve.....	94
4.3 Hidrólise Enzimática do bagaço de cana.....	100
4.3.1 Hidrólise Enzimática do bagaço submetido a diferentes condições de pré-tratamento organossolve.....	100
4.3.2 Hidrólise Enzimática do bagaço pré-tratado em diferentes condições seguido de deslignificação alcalina.....	106
4.4 Análises morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura do bagaço <i>in natura</i> e pré-tratado em diferentes condições.....	111
4.5 Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos.....	117
4.6 Estudo da fração hemicelulósica solubilizada no licor negro derivado do pré-tratamento organossolve.....	122
5 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS.....	128
APÊNDICE.....	144

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se pelo pioneirismo no uso da cana-de-açúcar na produção de etanol combustível a partir da criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) após a primeira crise do petróleo em 1973, com o objetivo de produzir combustível que substituísse a gasolina (BIOETANOL, 2008).

Atualmente, o bioetanol é visto como alternativa promissora diante das atuais preocupações mundiais por ser fonte de energia limpa e renovável. O Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção de bioetanol, atrás somente dos EUA, com projeções de produção para 2020/2021 de 62,91 bilhões de litros de etanol, sendo 49,6 bilhões de litros para consumo e 15,7 bilhões de litros para exportação (GASTES et al., 2010).

O uso de subprodutos e resíduos lignocelulósicos agroindustriais é uma outra possibilidade de matéria-prima para produção de etanol, agora de segunda geração. Na produção de etanol de primeira geração no Brasil, o subproduto bagaço de cana é atualmente utilizado para geração de energia através de sua queima em caldeiras. Contudo, há ainda um grande excedente dessa matéria-prima que vem despertando interesse da indústria sucroalcooleira, devido a possibilidade de agregar tecnologias sustentáveis à sua cadeia produtiva através do conceito de biorrefinaria, podendo gerar etanol e outros insumos de alto valor agregado (CANILHA, 2010).

O bagaço de cana-de-açúcar contém entre 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina e 1,5-5% cinzas (BANERJEE; PANDEY, 2002). Celulose é um polímero de glicose, formada por regiões amorfas e uma região cristalina, de difícil acesso por microrganismos e outros agentes de degradação. Hemicelulose tem natureza amorfa, é um heteropolímero de pentoses e hexoses, com diversas ramificações, sendo xilose o monômero presente em maior quantidade após hidrólise desse material. Lignina é uma estrutura macromolecular e amorfa, hidrofóbica e muito complexa, formada por unidades de fenilpropano (CURVELO, 1992). As ramificações da hemicelulose permitem interação desse material tanto com a hidrofílica celulose quanto com a hidrofóbica lignina.

Diferentes produtos podem ser obtidos a partir das diferentes frações do bagaço de cana. Devido à disponibilidade de grande massa de bagaço excedente, a principal aplicação para celulose deverá ser o etanol, um produto de alta demanda. Etanol pode ser gerado após hidrólise da celulose a glicose e posterior fermentação do açúcar pela levedura *S.cerevisiae*,

tradicionalmente utilizada na indústria alcooleira. Na hemicelulose, o principal polímero é a xilana, que após hidrólise completa gera xilose, que pode ser utilizada para produção de etanol ou de xilitol, um açúcar não metabolizável de interesse comercial. Uma outra emergente aplicação para a fração hemicelulósica é a produção de xilooligossacarídeos (XOS), pequenos oligômeros, constituídos por 2-6 unidades de xilose. Eles podem ser obtidos através da hidrólise controlada da xilana presente na hemicelulose e vêm tendo crescente demanda para diferentes aplicações nutricionais e farmacêuticas. Os xilooligossacarídeos são atualmente reconhecidos por suas propriedades e benefícios à saúde humana, sendo considerados como um prebiótico, ou seja, estimulam a proliferação de bactérias benéficas à saúde humana no intestino. Dentre suas propriedades estão: aumento da atividade biológica do cálcio no organismo, atividade imunológica, com efeito antitumoral, etc. (AKPINAR et al., 2007; GOLDMAN, 2009; NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007).

A utilização das frações do bagaço de cana, contudo, requer pré-tratamento do material lignocelulósico para separação entre elas e aumento da acessibilidade à celulose, sendo etapa de grande importância para viabilizar economicamente a utilização do bagaço de cana para produção de etanol.

Diferentes abordagens para esse pré-tratamento podem ser utilizadas. Na mecânica, obtém-se redução do tamanho da partícula por moagem, o que facilita o acesso dos agentes hidrolíticos, mas tem alto consumo de energia. Entre os tratamentos físicos, tem-se o tratamento hidrotérmico, que utiliza alta temperatura e pressão. Hemicelulose é fração altamente suscetível a ataque químico e calor e pode, assim, ser hidrolisada apenas com água a altas temperaturas, já que nessa condição ocorre formação do íon hidroxônio, que ataca as ramificações acetil, liberando ácido acético, num tratamento conhecido como auto-hidrólise. Assim, tratamento hidrotérmico pode solubilizar hemicelulose com baixa perda de celulose. No pré-tratamento por explosão a vapor, o material após ser submetido a altas temperaturas, pela elevação da pressão, tem esta bruscamente reduzida, o que causa, além da auto-hidrólise, rompimento das fibras.

Diferentes pré-tratamentos químicos vêm sendo testados. Celulose e hemicelulose podem ser hidrolisadas na presença de ácido concentrado a altas temperaturas, tornando-se solúveis na fase aquosa. Esse processo separa os carboidratos na fração líquida, com a lignina permanecendo na fase sólida, o que permite posterior separação entre lignina e carboidratos por filtração comum. Quanto maior a severidade do tratamento, maior a eficiência na separação entre as frações, podendo ainda levar à hidrólise completa dos

carboidratos. Embora isso seja desejável, maior a severidade, maior também é a degradação dos monômeros obtidos, com geração de subprodutos inibidores da fermentação, tais como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético. Visando evitar a formação desses inibidores, as alternativas que mais vem sendo aceitas são aquelas onde a lignina é solubilizada e a celulose é separada na fase sólida, com posterior hidrólise enzimática, catalisada por celulasas, para a obtenção de glicose.

Lignina, um polímero hidrofóbico, é solúvel apenas a quente, em solução alcalina ou na presença de um co-solvente orgânico, como etanol, por exemplo. A separação da lignina do material sólido é importante, pois esta pode reduzir a atividade das enzimas hidrolíticas, seja por adsorção das enzimas seja por dificultar o acesso delas à celulose. O tratamento alcalino ou com co-solvente permite solubilizar lignina, e também permite retirada parcial da hemicelulose. A ausência ou redução de acidez nessa abordagem deve reduzir a hidrólise da hemicelulose, permitindo retirada da xilana principalmente na forma de oligômeros. Assim, se xilooligômeros são o produto visado, deve-se buscar condições de extração da hemicelulose mais suaves, mesmo que isso resulte em menores rendimentos de extração. Se etanol é a aplicação visada, deve-se buscar máxima eficiência de extração do carboidrato, já na forma do monômero xilose, o que pode ser obtido com adição de catalisador durante o pré-tratamento.

Na solubilização da lignina, o pré-tratamento organossolve, em particular, tem a vantagem de recuperação do solvente e requer menor quantidade de água durante o processo em relação ao pré-tratamento alcalino. No tratamento organossolve, as principais variáveis que afetam a eficiência da extração de hemicelulose e lignina e a formação de subprodutos são temperatura, tempo de residência, concentração do solvente, relação sólido:líquido e acidez.

Visando estudar a utilização de bagaço de cana-de-açúcar, está em andamento no Departamento de Engenharia Química da UFSCar o projeto temático FAPESP BIOEN-“Bioprocess systems engineering (BSE) applied to the production of bioethanol from sugarcane lignocellulosic materials”. Nesse projeto pesquisam-se diferentes aspectos da produção de etanol a partir de bagaço de cana, para avaliar, com auxílio de ferramentas computacionais, a viabilidade econômica desse processo.

Integrado ao projeto temático, neste trabalho pretende-se estudar experimentalmente o pré-tratamento organossolve para o bagaço de cana a fim de obter etanol da fração celulósica e xilooligômeros da fração hemicelulósica. Pretende-se selecionar

condições operacionais de pré-tratamento organossolve com etanol, que conduzam, na fração sólida, a máximos rendimentos em glicose, na etapa de hidrólise e em etanol, na etapa de fermentação. Pretende-se, também, analisar a fração líquida, visando selecionar condições de tratamento que conduzam a altos rendimentos de extração de xilana na forma de oligômeros, para produção de XOS.

Para tal, foram realizados estudos com os seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado, pré-tratado seguido de deslignificação alcalina e bagaço pré-tratado com uso de catalisador ácido, em relação a sua composição química;
- Avaliar as diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana quanto à eficiência na solubilização da lignina e hemicelulose;
- Observar mudanças na superfície do bagaço pré-tratado, pré-tratado seguido de deslignificação alcalina e pré-tratado com uso de catalisador ácido, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar as diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana com e sem o uso de catalisador e a etapa de deslignificação alcalina quanto à eficiência na hidrólise da polpa celulósica resultante;
- Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos de todos os processos estudados;
- Analisar a fração líquida (licor negro) resultante dos experimentos de pré-tratamento organossolve, visando à obtenção da fração de xilana solubilizada na forma de xilooligômeros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa e Energia

O esgotamento das reservas de petróleo conhecidas nas próximas décadas é de grande preocupação no mundo atual, já que o petróleo é a principal fonte de energia utilizada no mundo e não é renovável (BASTOS, 2007). Petróleo, gás natural e seus derivados, representam 55% do consumo mundial de energia, possibilitando boa parte das atividades industriais e o desenvolvimento econômico dos países. Os combustíveis fósseis além de serem recursos não renováveis, também são a principal fonte de gases causadores das mudanças climáticas e aquecimento global. Devido a esses problemas, torna-se consistente a perspectiva por uma fonte renovável e menos poluente que substitua o carvão mineral, o petróleo e seus derivados: a biomassa.

Biomassa é todo recurso renovável proveniente de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que dispõe de bioenergia e que pode ser processado para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. A produção de biomassa, como resultado da reação de fotossíntese, depende essencialmente de energia solar e da presença de água e dióxido de carbono (CO₂), desenvolvendo-se nas células vegetais (BIOETANOL..., 2008).

A biomassa é responsável por 9,8% da matriz energética mundial e pode ser dividida em: tradicional, aquela não sustentável, utilizada para queima, como a lenha, carvão vegetal, resíduos animais e vegetais, e biomassa moderna, caso dos biocombustíveis, madeira de reflorestamento, bagaço de cana-de-açúcar e outras fontes utilizadas em processos tecnológicos avançados e eficientes (KAREKESI; COELHO; LATA, 2004).

Segundo Brasil – EPE (2010), aproximadamente 47,3% da matriz energética brasileira é renovável, enquanto a média mundial está em torno de 12,7% (figura 2.1). O componente renovável da matriz brasileira deve-se, em grande parte, à hidroeletricidade com 15,3%, no entanto, dentre as biomassas, a cana-de-açúcar ocupa posição de destaque, representando 18,1% da matriz energética brasileira. Cada tonelada de cana-de-açúcar tem um potencial energético equivalente ao de 1,2 barris de petróleo (CASTRO, 2008; KITAYAMA, 2008).

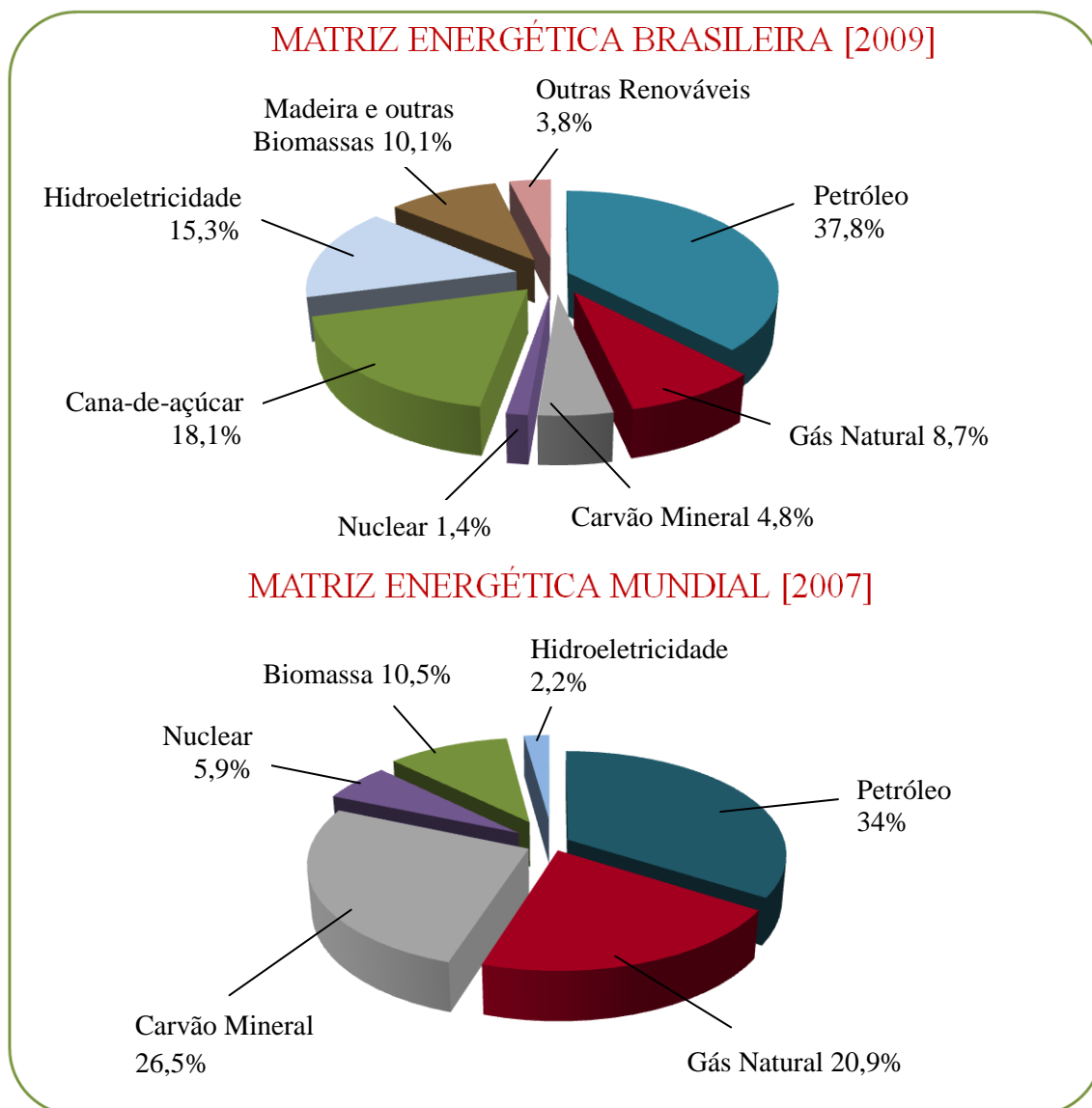


Figura 2.1 - Matriz energética brasileira e mundial (adaptado de BRASIL - EPE, 2010).

2.2 A Cana-de-açúcar: Características e origem

Existem várias teorias que tentam explicar a origem da cana-de-açúcar, porém a maioria das publicações cita que a cana-de-açúcar é originária de Nova Guiné, por volta de 2.500 a.C., utilizada naquela época, tanto para a construção de cercados como para apreciar o seu caldo açucarado, e depois propagada para a Índia, China e regiões vizinhas, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005). Posteriormente, a cana se

disseminou para vários lugares do mundo, principalmente para os países tropicais e subtropicais.

A cana-de-açúcar é uma planta herbácea, alógama, pertencente à família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. A família Poaceae (ou família das gramíneas) tem grande importância para a economia humana, pois nela se incluem cereais, tais como milho, trigo, arroz e sorgo, bem como muitas outras culturas forrageiras (TZVELEV, 1989).

A cana vem passando por modificações, o que resultaram em várias espécies, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Hoje, as variedades de cana-de-açúcar plantadas são híbridas de planta original com outras espécies da mesma família, predominando a contribuição de *S. officinarum*, com menor participação de *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. barberi*. (JOAQUIM, 1997).

A cana é composta por partes subterrâneas e aéreas (figura 2.2). As raízes e rizomas compõem a parte subterrânea, já o colmo (ou talo), as folhas e as flores são componentes da parte aérea (SCHLITTLER, 2006). O caule é um tipo de talo com nós internos ocos ou cheios, com rizomas desenvolvidos ou não, possui forma cilíndrica e está dividido em canudos que variam de 5-30 cm, dependendo do crescimento (CARASCHI, 1997). A cana-de-açúcar pode atingir de 2 a 5 metros de altura, sendo composta, principalmente, por água e açúcares (predominantemente sacarose) que se concentram no talo (SCHLITTLER, 2006). Suas folhas são longas, acopladas de forma alternada entre os nós do colmo, com nervuras paralelas e uma mediana principal, além de limbos finamente serrilhados (MORFOLOGIA..., 2010).

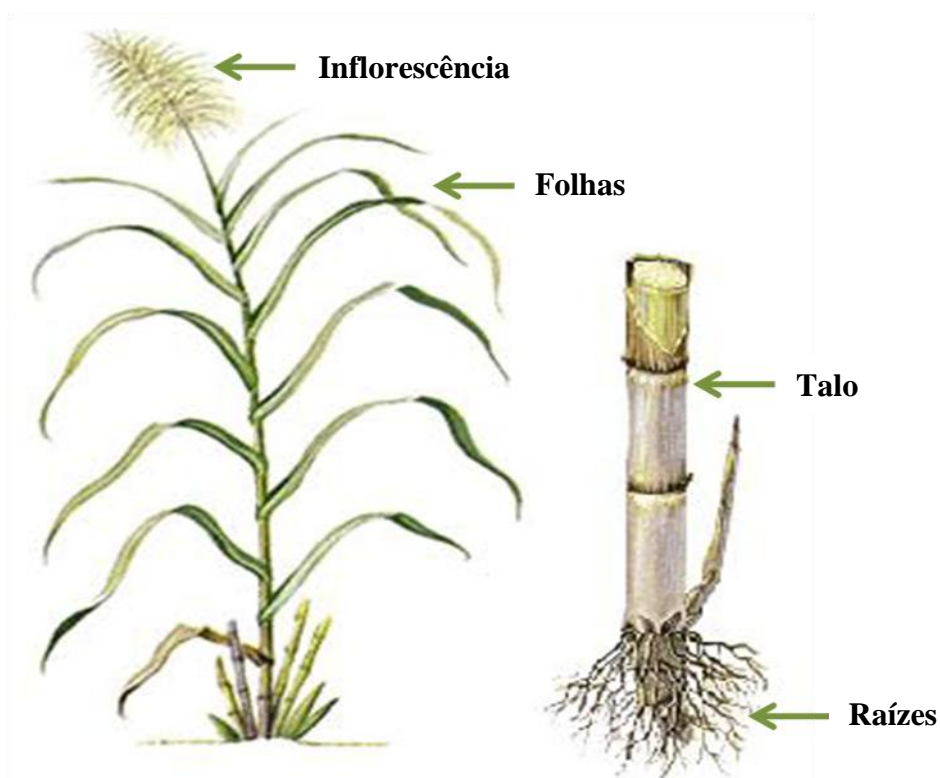


Figura 2.2 - Representação esquemática da cana-de-açúcar (adaptado de <http://science.howstuffworks.com/grasses/sugarcane-info.htm>).

Nas Américas, a cana foi introduzida na primeira metade do século XVI, tornando-se a monocultura mais antiga explorada no Brasil, já que este apresenta clima ideal para o seu cultivo, com uma estação quente e úmida viabilizando a germinação e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca que proporciona maturação e acúmulo de sacarose no talo (BIOETANOL..., 2008).

2.2.1 Aspectos econômicos da cana-de-açúcar

A agroindústria da cana teve forte aumento a partir de 1975, com a criação do Proálcool pelo governo brasileiro, como estratégia para lidar com a crise do petróleo e produzir um combustível alternativo que substituísse a gasolina. Nasceu então o bioetanol, um combustível obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos, tornando a cana-de-açúcar uma cultura bem estabelecida no Brasil (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

A produção mundial de cana totaliza quase 1,5 bilhões de toneladas e está localizada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, com uma área maior que 20 milhões de hectares em todo o mundo (UNICA, 2010).

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, seguido por Índia e China. Atualmente, a cultura da cana é o terceiro cultivo mais importante em superfície ocupada, depois da soja e do milho. Destaca-se a região Centro-Sul-Sudeste, com mais de 85% da produção, e o maior produtor nacional é o Estado de São Paulo, com cerca de 60% da produção (BIOETANOL..., 2008).

A área de cana-de-açúcar, segundo Moraes (2007), equivale a 2,34 % da área com produção agrícola, a 1,70 % da área agricultável e a 0,78 % da área total do território brasileiro, que conta com 388 milhões de hectares destinados a agricultura. Desses, ainda restam 106 milhões de hectares para a produção. Pode-se afirmar que existe área disponível para a expansão da cultura da cana em 30 vezes a área atual plantada com ela, sem nenhum prejuízo das áreas destinadas a produção de alimentos ou ainda as de preservação ambiental. Além disso, com o aprimoramento das técnicas de produção, além de investimentos em pesquisas do etanol celulósico, a necessidade de incorporação de novas áreas de plantio será muito menor.

Segundo dados do Terceiro levantamento de safra de 2010/2011 (CONAB, 2011), a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8 milhões de hectares, distribuídas em todos estados produtores. A previsão do total de cana que será moída é de aproximadamente 625 milhões de toneladas, com incremento de 3,4% em relação à safra 2009/10. Desse total 46,2% serão destinadas à produção de açúcar, o que deve gerar 38,7 milhões de toneladas do produto e 53,8% serão destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.669,55 milhões de litros.

O setor sucroalcooleiro conta com 426 unidades produtoras, sendo 161 produtoras de álcool, 16 de açúcar e 249 de açúcar e álcool, que atendem à demanda interna e geram crescentes excedentes exportáveis, sendo referência para os demais países produtores de açúcar e álcool. (BRASIL - MAPA, 2010).

A participação da cana-de-açúcar leva em consideração não apenas o açúcar, em que o Brasil é o maior produtor e exportador mundial, e o álcool consumido pelos veículos automotores, mas também seu emprego sob forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado e aguardente. Além disso,

aproveita-se o bagaço (subproduto da produção de açúcar e álcool) utilizado nas usinas para a geração de energia elétrica, mecânica e térmica. (BRASIL - MAPA, 2007).

2.3 Bioetanol

O Brasil é pioneiro na produção em larga escala de etanol e em seu uso como combustível alternativo. A partir do Proálcool, houve incentivos no desenvolvimento de veículos movidos exclusivamente a álcool (álcool hidratado), além de introduzir álcool anidro à gasolina (uma mistura que varia de 20% a 25%) e, mais recentemente, veículos “*flex-fuel*”. Com isso, o Brasil transformou-se em um dos maiores produtores, consumidores e exportadores de etanol do mundo, ocupando posição de liderança na tecnologia de sua produção. (CHAVES; GOMES; PEREIRA, 2010).

O bioetanol pode ser produzido a partir de qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido ou açúcares (figura 2.3). Nas matérias-primas amiláceas, como o trigo e o milho, é necessária uma etapa (enzimática) de conversão do amido em açúcares antes da fermentação. Essa etapa adicional aumenta os custos e reduz o rendimento do processo, quando comparado à fermentação direta do caldo da cana, como acontece com as matérias-primas sacaríneas (beterraba e cana-de-açúcar). Para essas matérias-primas, na produção de etanol de primeira geração, os açúcares já estão disponíveis na biomassa e são diretamente fermentáveis. Outra alternativa para produção de bioetanol é a partir da hidrólise da celulose disponível na matéria-prima lignocelulósica, como o bagaço e a palha, seguida de fermentação dos açúcares (BIOETANOL..., 2008).

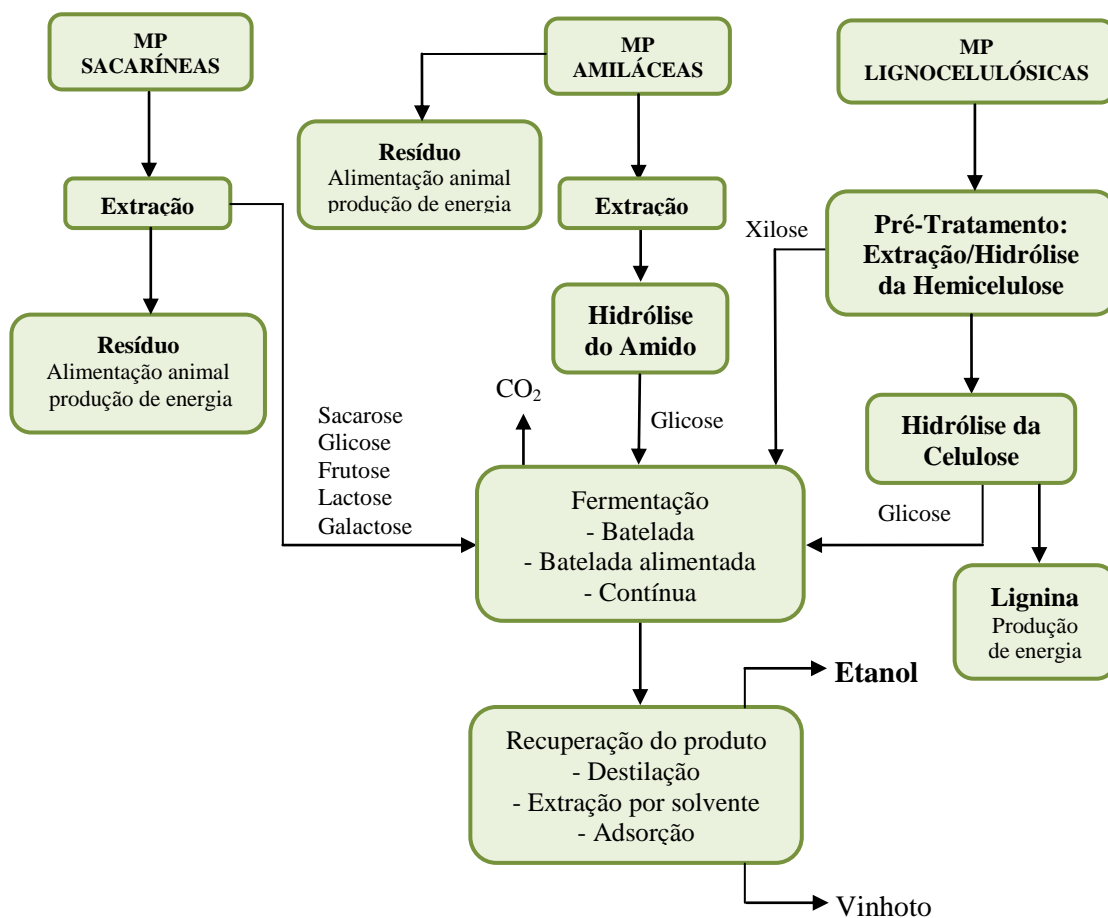


Figura 2.3 - Rotas Tecnológicas para produção de etanol de biomassas (adaptado de PEREIRA JR, 1991).

Desde 2005, os Estados Unidos ocupam o primeiro lugar mundial na produção de etanol. O etanol americano é produzido a partir do milho e é consumido no país misturado à gasolina em proporções até 10% (ETANOL ..., 2010). Em 2009, Os EUA contavam com 200 usinas, responsáveis pela produção de 40,1 bilhões de litros de etanol. O volume foi mais do que o dobro da produção total de 17,7 bilhões de litros nas 400 usinas brasileiras no período (BARREIRA..., 2010). No entanto, etanol da cana continua a ter uma produtividade por hectare quase duas vezes maior do que o de milho (figura 2.4). Isso, aliado ao menor custo de processo, pela não necessidade da hidrólise do amido a glicose, e ao balanço energético positivo, devido à queima do bagaço em caldeiras, faz com que o custo do etanol brasileiro seja consideravelmente inferior ao obtido pelos americanos.

Na figura 2.4 considera-se uma produção de 80 toneladas de cana por hectare, uma produtividade de 85 litros de bioetanol por tonelada de cana processada e a utilização de

30% do bagaço disponível e metade da palha, convertida em bioetanol à razão de 400 litros por tonelada de biomassa celulósica seca (BIOETANOL, 2008).

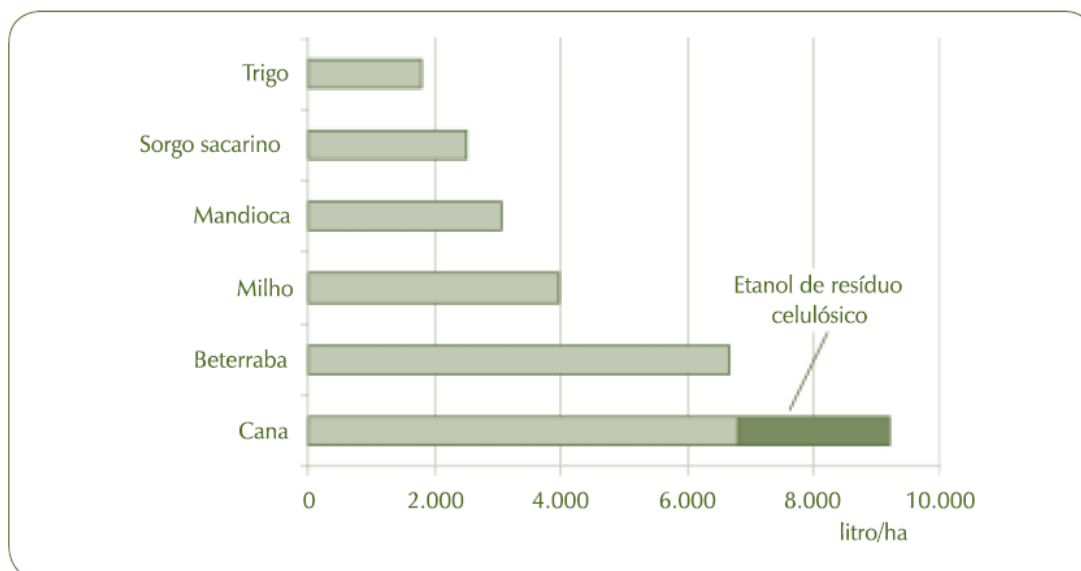


Figura 2.4 - Produtividade média de etanol por área para diferentes culturas (BIOETANOL..., 2008).

Em relação à questão ambiental, o bioetanol da cana reduz a geração de gases de efeito estufa e ajuda a combater o aquecimento global ocasionado pela emissão de gás carbônico com a queima dos combustíveis fósseis. Como o gás carbônico gerado na sua queima é reabsorvido no crescimento da safra no próximo ciclo produtivo, há um equilíbrio entre a emissão e a absorção de gás carbônico, ou seja, seu ciclo é fechado.

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) o etanol de cana-de-açúcar está classificado como “biocombustível avançado”, com 61% de redução comprovada na emissão dos gases causadores do efeito estufa em relação à gasolina, um valor três vezes superior ao obtido pelo etanol de milho, que resulta em apenas 21% de redução (JANK, 2010). Para os países industrializados comprometidos com as metas do Protocolo de Kyoto, o uso de biocombustíveis representa uma das formas mais efetivas de reduzir as emissões líquidas de gases de efeito estufa (MACEDO, 2007).

2.4 Bagaço de cana-de-açúcar

Os resíduos agrícolas e subprodutos agroindustriais vêm apresentando enorme potencial como biomassa energética. Atualmente, o recurso de maior potencial para geração de energia elétrica a partir de biomassa no país é o bagaço de cana-de-açúcar. (BRASIL - MAPA, 2007). Segundo Gonçalves (2008) e Lora (2008), o processamento de uma tonelada de cana gera na ordem de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (ambos em base seca) e, de acordo com os dados da Unica para safra de 2008/2009, o Brasil produziu ao redor de 80 milhões de toneladas de cada resíduo.

Uma tonelada de cana processada requer, em média, cerca de 12 KWh de energia elétrica, o que pode ser gerado pelos próprios resíduos da cana. Atualmente, a totalidade da energia consumida nos processos provém de um sistema de co-geração (produção combinada de calor e potência) instalado dentro da própria usina, utilizando apenas o bagaço como fonte de energia (BIOETANOL..., 2008). Com isso o setor sucroalcooleiro brasileiro é auto-suficiente em energia, sendo que mais de 10% das usinas e destilarias de açúcar e álcool brasileiras vendem energia excedente de seu consumo ao sistema nacional de abastecimento energético.

Segundo estimativas da Unica, o setor tem potencial para suprir 15% das necessidades brasileiras até 2015, com a geração de mais de 14.000 MW médios a partir da utilização de 75 % do bagaço e de 50 % da palha disponível nas usinas (GOES; MARRA; SILVA, 2008). Apesar da geração de energia por combustão ou gaseificação ser sua principal utilização, o bagaço ainda teria um excedente de 25% para ser utilizado em outros processos (KITAYAMA, 2008), embora o bagaço disponível atualmente se situe entre 7 a 10% do bagaço total (CGEE, 2009).

Há várias aplicações possíveis para esse bagaço excedente, tais como produção de polpa celulósica para produção de papel, ácidos orgânicos, furfural, ração animal e compósitos (BAUDEL, 2006; LOBO et al., 2007).

Além dessas aplicações, muito se tem investido no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção do bioetanol celulósico, ou etanol de segunda geração. De acordo com CGEE (2005), com a evolução da agroindústria canavieira e considerando-se a produção de bioetanol com base nos resíduos celulósicos, a produtividade poderia alcançar até o ano de

2020, 10.400 litros de bioetanol por hectare, correspondendo a uma redução de 33% da área plantada por unidade de bioetanol produzido.

2.5 Composição e estrutura do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico não homogêneo constituído, em sua maior parte, por células esclerenquimáticas (fibras), células parenquimáticas (medula) e de células epidérmicas. As fibras, com proporção de 65%, conferem principalmente dureza e rigidez aos tecidos, enquanto a medula e a epiderme não fibrosa, que correspondem a 35%, têm função de sustentação e condução dos alimentos e produtos ao longo do talo da planta (ALFONSO et al., 1990)

Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e substâncias de baixa massa molar (extrativos e cinzas). A biomassa lignocelulósica é o composto orgânico mais abundante do nosso planeta. Suas fontes variam de árvores a resíduos agroindustriais. A tabela 2.1 apresenta os principais componentes da biomassa e suas variações entre tipos de biomassa.

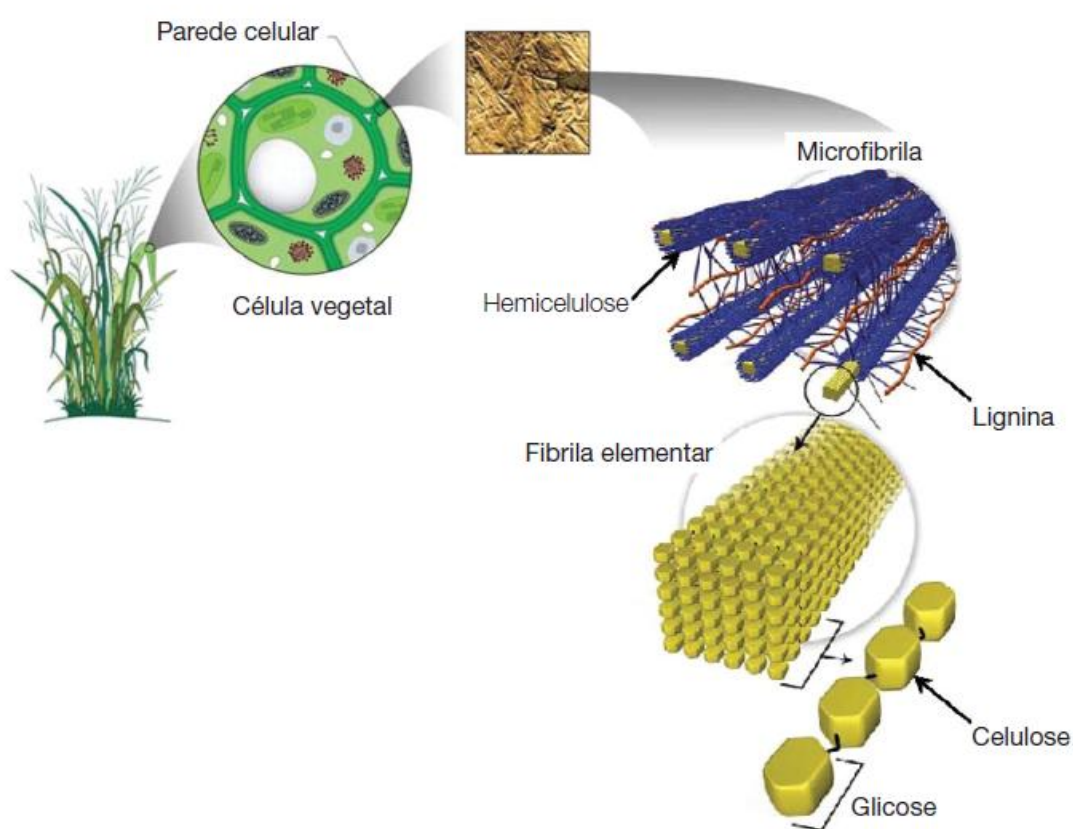
As características estruturais do bagaço e demais substratos têm sido divididas em dois grupos e classificadas como físicas ou químicas. As químicas englobam a porcentagem da celulose, hemicelulose e lignina. As físicas consistem na acessibilidade da área superficial, cristalinidade, dureza, abrasividade, distribuição física da lignina na biomassa, grau de polimerização, volume dos poros e tamanho da partícula da biomassa (GARCIA, 2009).

Os componentes dos materiais lignocelulósicos são encontrados em quantidades diferentes nos vegetais de diferentes origens, dependendo da espécie e de outras variações biológicas, tais como diferença genética entre espécies, condições de crescimento com diferença de solos e condições climáticas, além do manuseio e técnicas de colheita. (GOLDESTEIN, 1981; REIN, 2007). No caso do bagaço de cana-de-açúcar encontramos 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina e 1,5-5% cinzas (BANERJEE; PANDEY, 2002).

Tabela 2.1 - Composição química de alguns tipos de biomassa.

Material lignocelulósico	Composição química (%)				Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros	
Bagaço de cana	42,8	25,9	22,1	7,5	Silva, 2009
Palha de cana	39,8	28,6	22,5	8,6	Oliveira, F., 2010
Palha de milho	54,4	16,2	23,8	8,0	Bianchi, 1995
Sabugo de milho	41,0	36,0	6,0	14,0	Goldestein, 1981
Palha de trigo	30,0	24,0	18,0	10,0	Kuhad; Singh, 1993
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussato; Roberto, 2002
Madeira de Eucalipto	49,4	21,4	27,8	1,5	Junior, 2007
Casca de amendoim	38,0	36,0	16,0	5,0	Kuhad; Singh, 1993

A estrutura lignocelulósica refere-se à parte vegetal que forma a parede celular composta por uma estrutura fibrosa constituída por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) associados a uma estrutura macromolecular e amorfa (lignina) (PEREIRA JR., 2006). A figura 2.5 ilustra esta íntima associação entre as frações.

**Figura 2.5** - Arquitetura da parede celular vegetal (adaptada de <http://genomics.energy.gov>).

A figura 2.5 representa a célula vegetal, apresentando as fibras de celulose envolvidas por uma matrix composta por hemicelulose e lignina que protegem a celulose

contra a degradação por agentes externos. Para maior compreensão da complexidade estrutural desses materiais é necessário uma abordagem mais detalhada das características e propriedades de cada um dos seus componentes.

2.5.1 Celulose

A celulose $((C_6H_{10}O_5)_n)$ é o principal componente da parede celular vegetal, sendo um homopolissacarídeo linear formado por unidades do monossacarídeo β -D-glicopiranosose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) glicosídicas, sendo a celobiose (dímero de glicose) sua unidade repetitiva (FENGEL; WEGENER, 1989). Sua principal função é como componente estrutural das plantas estando freqüentemente entrelaçada por polissacarídeos e impregnada com lignina (GOLDSTEIN, 1981).

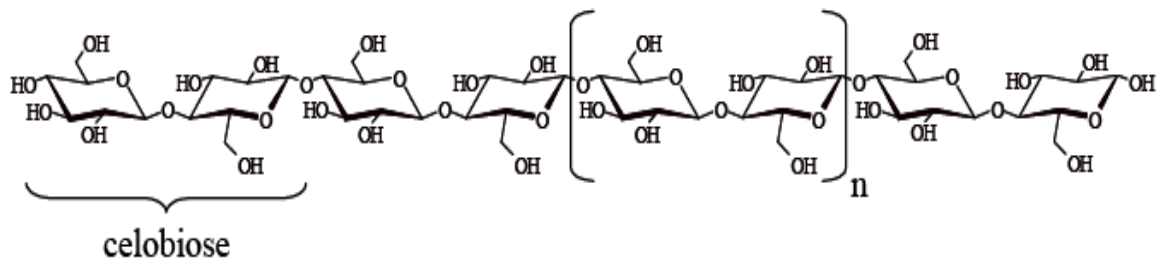


Figura 2.6 - Representação da cadeia linear de celulose formada por unidades consecutivas de celobiose (TÍMAR-BALÁZSY; EASTOP, 1998).

Sua estrutura composta por vários grupos hidroxila permite a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares (entre grupos hidroxila da mesma molécula) e intermoleculares (entre grupos hidroxila de cadeias adjacentes) gerando regiões cristalinas com alto grau de rigidez e organização entre as cadeias (figura 2.7). As ligações de hidrogênio intramoleculares são responsáveis pela rigidez da cadeia de celulose, já as ligações intermoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989).

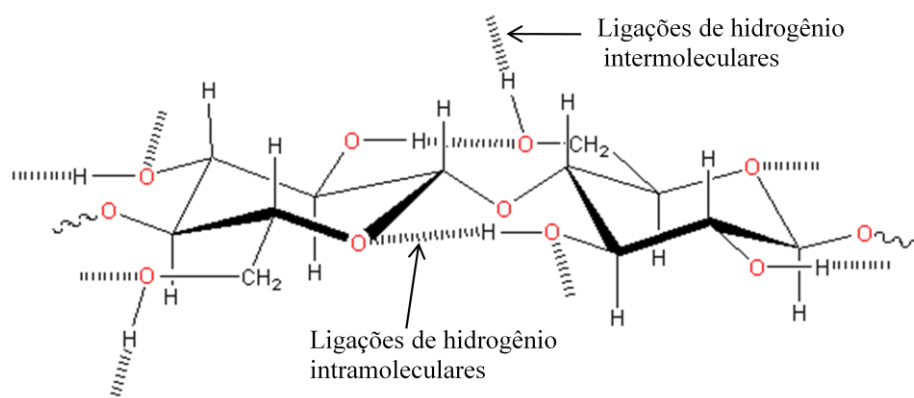


Figura 2.7 - Representação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares na estrutura supramolecular da celulose (adaptado de COUGHLAN, 1985).

As cadeias de celulose se arranjam formando regiões cristalinas intercaladas por regiões amorfas. As regiões cristalinas são fortemente organizadas conferindo resistência e proteção à célula contra degradação de agentes externos, o que não acontece com as regiões amorfas, onde há uma menor orientação entre as moléculas, sendo mais susceptíveis a degradação (FENGEL; WENEGER, 1989).

2.5.2 Hemicelulose

A hemicelulose (poliose) é considerada o segundo polissacarídeo natural mais abundante nos vegetais, depois da celulose (BISARIA; GHOSE, 1981). É um heteropolissacarídeo amorfo formado por cadeias lineares com ramificações laterais, sendo compostas por hexoses, pentoses e ácidos urônicos (figura 2.8). As unidades de pentose (açúcares de cinco carbonos), como arabinose e xilose e unidades de hexose (açúcares de seis carbonos) como glicose, manose, galactose são polímeros complexos que mantêm ligações cruzadas entre si por pontes de hidrogênio conferindo resistência aos materiais lignocelulósicos (FASANELLA, 2008). As hemiceluloses garantem elasticidade e flexibilidade ao agregado devido às cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, estando depositadas de forma intercalada nas microfibrilas de celulose em um estágio anterior à lignificação (MARTINS, 2005; RAMOS, 2003). Essas cadeias laterais permitem ainda que a hemicelulose interaja tanto com celulose quanto com lignina, funcionando como um ligante entre esses dois polímeros, o primeiro polar e o segundo apolar.

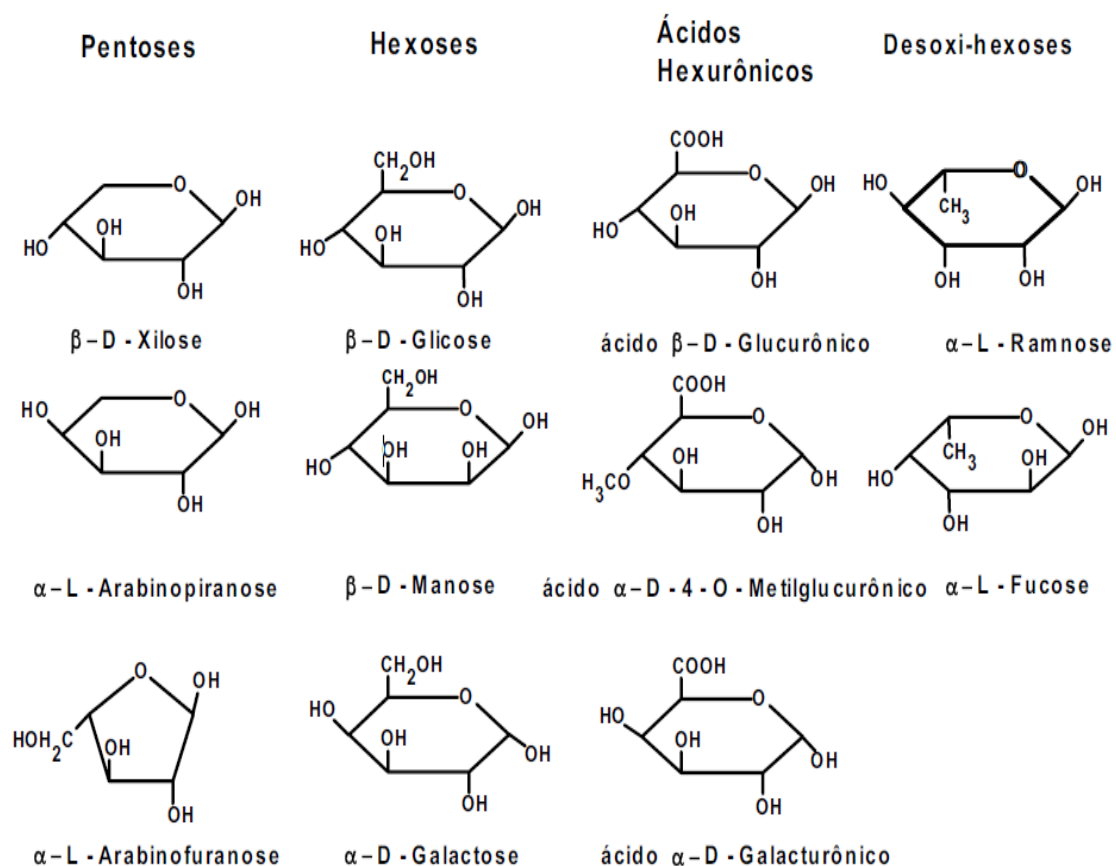


Figura 2.8 - Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL; WENEGER, 1989).

As cadeias principais de hemiceluloses podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas (xilose), ou por duas ou mais unidades, como as glucomananas (glicose e manose). A principal hemicelulose da cana-de-açúcar são os glucuronoarabinoxilanos (GAXs), que possuem cadeia principal de xilose com ramificações de ácido glucurônico e arabinose. Também são encontrados nos tecidos de cana, em grande quantidade, os β - glucanos (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

As principais diferenças entre celulose e hemiceluloses estão apresentadas pela tabela 2.2, de acordo com Curvelo (1992); Fengel e Wegener (1989) e Zhang e Lynd (2004), adaptada de Bianchi (1995).

Tabela 2.2 - Diferenças entre celulose e hemicelulose (adaptada de BIANCHI, 1995).

Celulose	Hemicelulose
Possui natureza Homopolissacarídica (unidades de glicose ligadas entre si)	Possui natureza Heteropolissacarídica (várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si)
Alto grau de polimerização (100 a 15000)	Baixo grau de polimerização (50 a 300)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresenta somente regiões amorfas
Difícil hidrólise por ácido inorgânico diluído a quente	Hidrolisa facilmente em ácido inorgânico diluído a quente
Insolúvel em soluções alcalinas (porém é solúvel a elevadas temperaturas e/ou concentração de reagentes)	Solúvel em soluções alcalinas diluídas

2.5.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática heterogênea formada por ligações éter biologicamente estáveis (HIGUCHI, 1982). Sua estrutura química é hidrofóbica e muito complexa, formada por unidades de fenilpropano derivadas da polimerização oxidativa de três alcoóis precursores: álcool trans-p-cumarílico, álcool trans coniferílico e o álcool trans-sinapílico (figura 2.9), de acordo com Curvelo (1992). Estes precursores são obtidos a partir da glicose (gerada pela fotossíntese) através de rotas enzimáticas, que geram as unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacilicas e seringilicas (FENGEL; WENEGER, 1989). A lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar contém resíduos dos três precursores com predominância de unidades de p-hidroxibenzílicas (HOAREAU et al., 2004; RUGGIERO et al., 2006).

Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, conferindo resistência e rigidez às paredes celulares, permitindo o transporte de água, nutrientes e metabólitos para diferentes regiões das plantas e protege as células contra a ação destrutiva de microrganismos e enzimas (CARASHI, 1997).

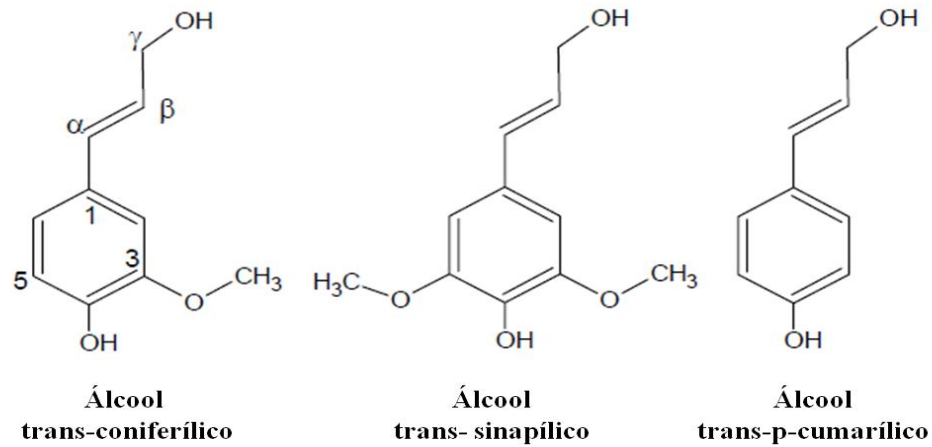


Figura 2.9 - Estrutura dos alcoóis precursores da lignina (DENCE; LIN, 1992).

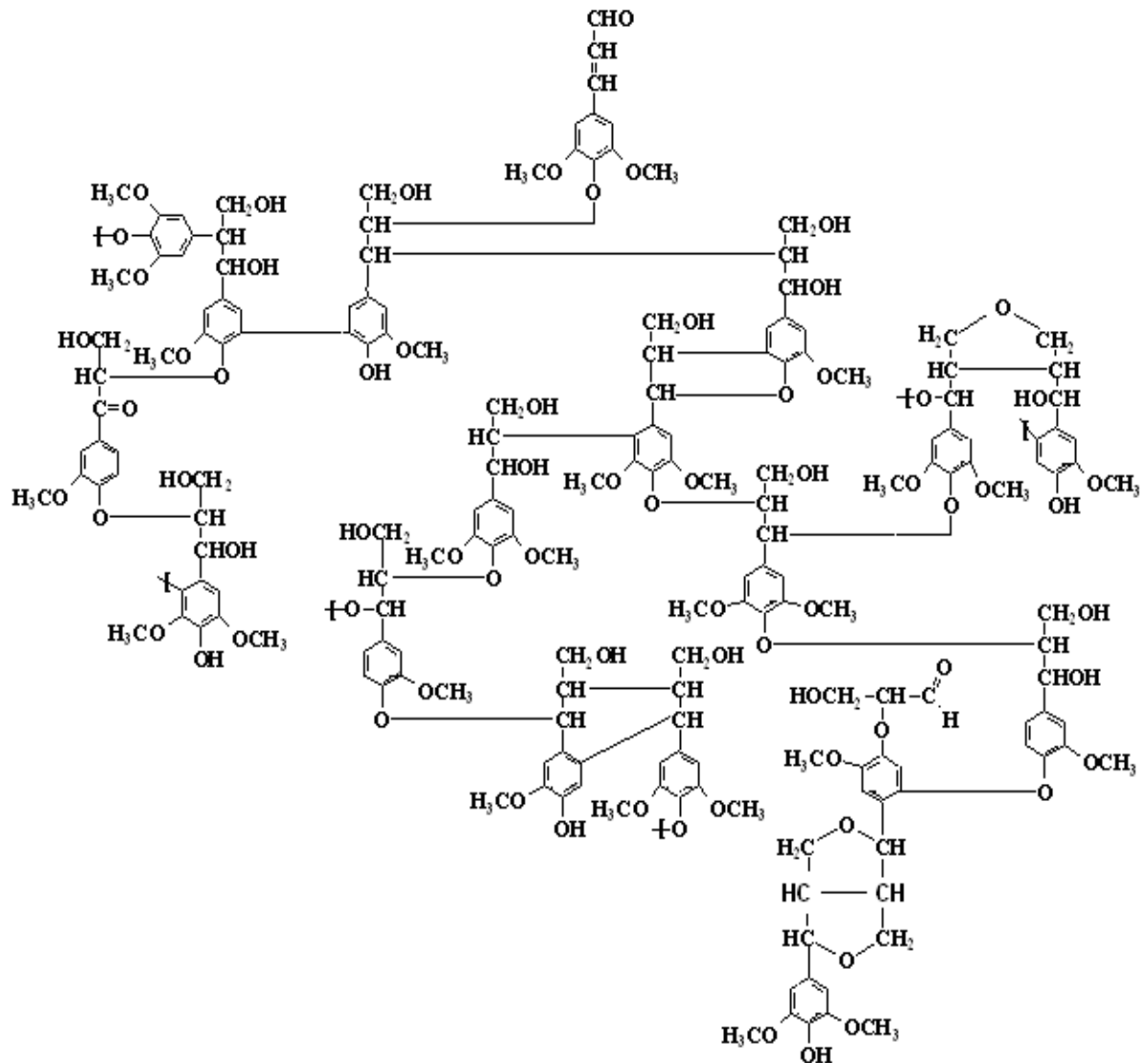


Figura 2.10 - Fração de uma molécula de lignina de *Fagus sp* segundo Fengel e Wegener (1989).

2.5.4 Extrativos e Cinzas

Os extrativos são compostos orgânicos de menor massa molecular presentes na biomassa vegetal e podem ser extraídos em solvente orgânico ou em água. São normalmente responsáveis por determinadas características das plantas como a cor, o cheiro, o sabor, resistência natural ao apodrecimento e propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1988).

Dentre os extrativos mais comuns encontram-se ácidos graxos, ceras, terpenos, óleos essenciais, compostos aromáticos (aldeídos, ácidos, alcoóis, flavanóides, quinonas, taninos) e sacarose residual. Estes compostos, embora em baixa concentração, podem agir como inibidores nos processos de conversão de biomassa (ROSSELL, 2006).

Além dos extrativos, também existe os componentes inorgânicos (cinzas) que exercem importante papel no metabolismo das plantas. São constituídos principalmente por potássio, cálcio, manganês, sulfatos, carbonatos e silicatos (CURVELO, 1992).

2.6 Conceito de Biorrefinaria

Segundo Carvalheiro; Duarte e Gírio (2008), biorrefinaria é um conceito global de um sistema integrado que consiste de uma unidade de processamento sustentável de biomassa que extrai carboidratos, óleos, lignina e outros materiais, converte-os a diversos produtos de alto valor, combustíveis e energia excedente comercializável, de modo que o produto de um processo se torne a matéria-prima do processo seguinte, aproximando ao desperdício nulo.

Para que esse conceito faça sentido, a matéria-prima empregada deve ser abundante, barata e específica, como a biomassa lignocelulósica (material orgânico mais abundante encontrado na natureza). Estima-se que anualmente a produção mundial de biomassa lignocelulósica atinja de 10-50 bilhões toneladas secas, o que representa cerca de metade da produção de biomassa global (CLAASSEN et al.,1999; GALBE; ZACCHI, 2002).

As principais tecnologias de segunda geração, utilizando o conceito de biorrefinaria, se aplicam as duas das mais promissoras plataformas emergentes em biorrefinarias. A “plataforma de açúcar” baseia-se na conversão de processos bioquímicos e

centra-se na fermentação de açúcares da biomassa. Já a “plataforma syngas” tem como base os processos de conversão termoquímica e centra-se na gaseificação de matérias-primas de biomassa e subprodutos de processos de conversão (NREL, 2009).

No Brasil, pode-se comparar o sistema de uma indústria sucroalcooleira ao sistema de produção de uma biorrefinaria, no entanto, esse setor tem capacidade para ampliar sua produção a partir de seus subprodutos, como os resíduos da cana-de-açúcar, não apenas como fonte de energia, mas para a obtenção do etanol celulósico e diversos produtos de alto valor agregado, considerando processos bioquímicos e termoquímicos integrados.

As figuras 2.11, 2.12, 2.13 mostram produtos que podem ser obtidos em uma biorrefinaria a partir da separação por pré-tratamentos das frações de celulose, hemicelulose e lignina provenientes de vários tipos de biomassa, segundo Schuchardt e Ribeiro (2001).

2.6.1 Produtos obtidos a partir da celulose

A celulose já está sendo utilizada na produção de polpas celulósicas e fibras naturais. Para produção de insumos químicos, a glicose proveniente da hidrólise é fermentada a etanol, que então fornece etileno, buteno, propileno, entre outros. A hidrólise da glicose com ácidos diluídos leva ao HMF, que pode ser clivado em ácidos de grande interesse industrial como o levulínico (SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

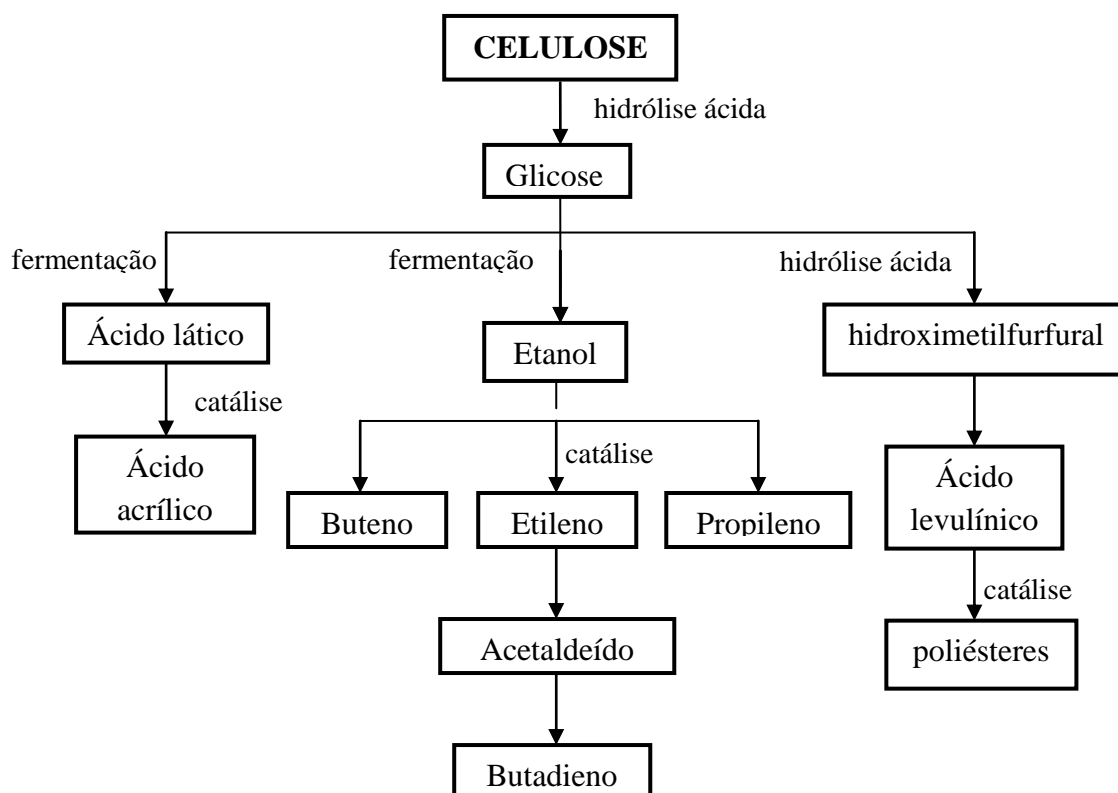


Figura 2.11 - Produtos obtidos a partir da celulose (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

2.6.2 Produtos obtidos a partir da hemicelulose

As hemiceluloses são constituídas por diversos polímeros, sendo xilana o principal deles. A presença de ramificações torna esse heteropolímero altamente susceptível à hidrólise, o que o torna solúvel em água, permitindo sua separação da celulose e lignina. A hidrólise completa de xilana gera xilose, que pode ser convertida a xilitol ou etanol. Embora xilitol tenha valor comercial, é etanol a principal aplicação visada dada a enorme quantidade de hemicelulose disponível.

Xilose, contudo, não é diretamente fermentada a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, o microrganismo comumente usado nas usinas para produção de etanol a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar. Eficientes formas de fermentação da xilose por microrganismos foram encontradas entre as bactérias naturais e recombinantes, leveduras e fungos (OLSSON; HAHN-HAGERDAL 1996), mas em todas as opções metabólicas encontradas para a fermentação da xilose, a formação do subproduto xilitol concorre com a

produção de etanol. A fermentação alcoólica anaeróbica de xilose sem formação de xilitol só é possível quando as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) têm correspondência nas especificidades da coenzima. Isto é equivalente a um passo-interconversão de xilose em xilulose pela enzima xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5) que ocorre na metabolização da xilose em bactérias e Archaea. Então, outra forma de produzir etanol a partir da xilose é, primeiramente, converter xilose em xilulose, isômero da xilose, em reação catalisada por xilose isomerase, seguido de fermentação para etanol (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996).

Uma aplicação emergente para a xilana é a produção de xilooligossacarídeos (XOS), um produto de alto valor agregado. Sua obtenção requer hidrólise parcial de xilana, suficiente para permitir sua solubilização e separação das demais frações, mas ainda na forma de oligômeros, cuja posterior hidrólise controlada irá gerar XOS.

Altas temperaturas e acidez no meio conduzem à hidrólise completa da xilana a xilose, e à subsequente transformação desta a furfural. Da xilose e manose obtidas da hemicelulose, pode-se produzir, ainda, por hidrogenação catalítica, o xilitol e o manitol.

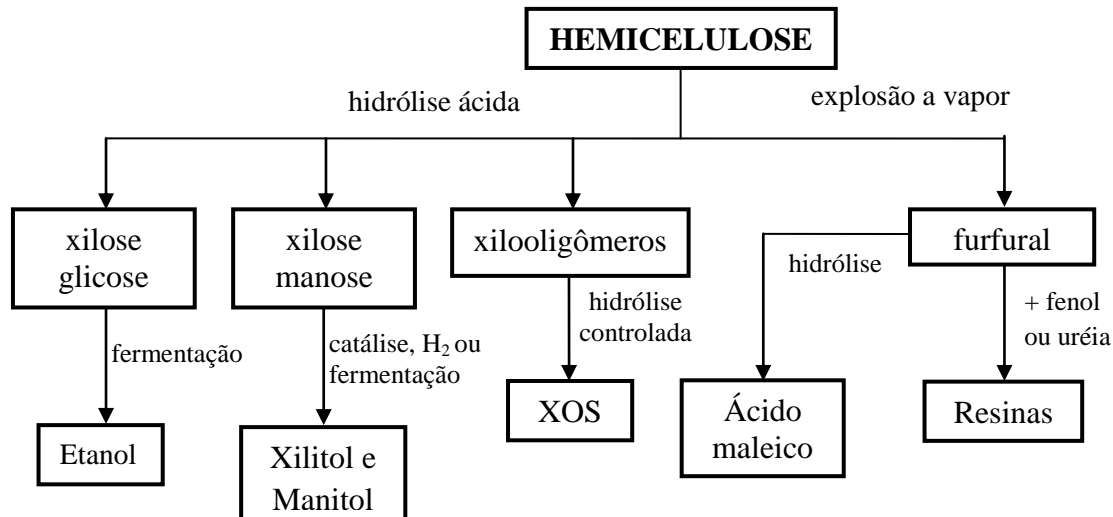


Figura 2.12 - Produtos obtidos a partir da hemicelulose (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

2.6.2.1 Xilooligossacarídeos

Os Xilooligossarídeos (XOS) são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose (2-6) e apresentam inúmeras aplicações na indústria de alimentos e de fármacos

(VÁZQUEZ et al., 2000). Os xilooligosacarídeos possuem propriedades benéficas a saúde humana, sendo considerados como prebióticos, ou seja, promovem o crescimento da microflora saudável no sistema gastrointestinal humano e inibem o crescimento de microrganismos patogênicos. Essas bactérias auxiliam na quebra dos alimentos e na absorção de nutrientes essenciais. Além disso, os XOS oferecem um leque de outros benefícios alimentares, reduzindo o colesterol, melhorando a absorção de cálcio no organismo, agindo como antioxidantes, além de apresentar atividade imunológica com efeito antitumoral (GOLDMAN, 2009).

A produção de XOS a partir de materiais lignocelulósicos (espigas de milho, madeira, palhas, bagaços, cascas, tortas de malte e farelo) torna-se possível dentro do conceito de biorrefinaria, ocorrendo a partir de um pré-tratamento prévio para separação da fração de xilana do complexo lignocelulósico (MOURE et al., 2006). A produção de XOS requer pré-tratamento que propicie a extração de xilana principalmente na forma de oligômeros. Uma vez que é conhecida a alta susceptibilidade de hemiceluloses a hidrólise ácida torna-se importante evitar tratamentos mais severos na presença de ácido. Durante os pré-tratamentos para degradação da xilana em oligômeros, deve-se evitar a formação de componentes indesejados como a xilose, que inibe a produção dos XOS (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009), de derivados de lignina, além de outros. Assim, a etapa de purificação é de grande importância para a produção de xilooligosacarídeos (NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007; VÁZQUEZ et al., 2005). XOS comercializados exigem um alto grau de pureza, que se encontra faixa 75-95% (MOURE et al., 2006).

Pré-tratamentos mais indicados para a extração de xilana de materiais lignocelulósicos para produção de XOS são: organossolve, extração alcalina, auto-hidrólise (ou hidrotermal) e ultra-som.

Após extração de xilana na forma oligomérica, a produção de XOS requer posterior etapa de hidrólise controlada para redução do peso molecular desses oligômeros entre 2-6 monômeros de xilose. Isso pode ser feito utilizando-se hidrólise enzimática catalisada por endoxilanasas, para evitar a formação de xilose. (MENEZES; DURRANT, 2008).

2.6.3 Produtos obtidos a partir da lignina

As ligninas podem ser transformadas, por processos térmicos e físico-químicos, em produtos de grande interesse para a indústria química, como os óleos, fenol, vanilina, ácido acético, resinas fenol-formaldeído, gás de síntese (essencial na produção de metanol), entre outros (SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

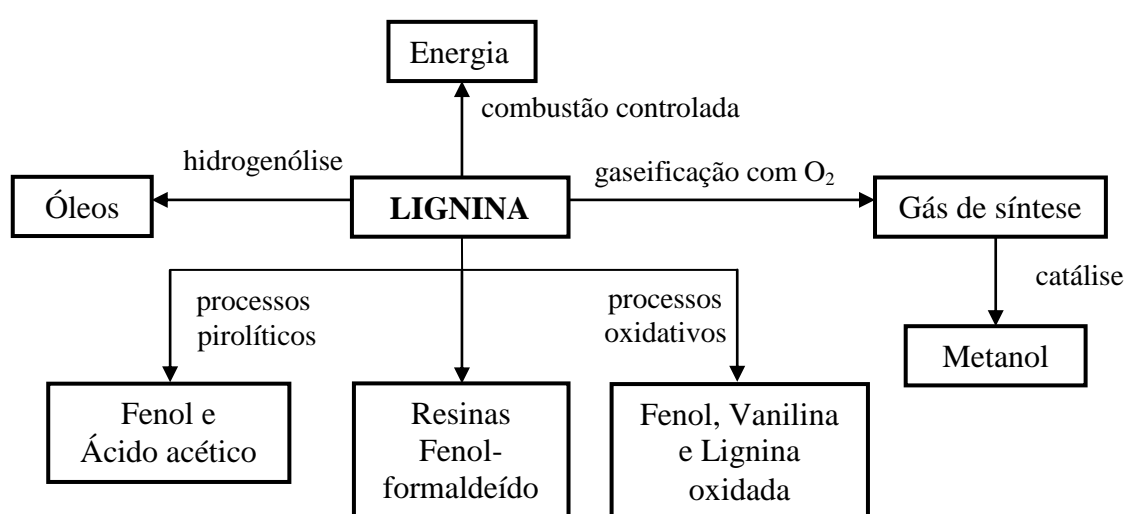


Figura 2.13 - Produtos obtidos a partir da lignina (adaptado de SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001).

2.7 Pré-Tratamento do Material Lignocelulósico

Superar efetivamente a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica e liberar os polissacarídeos é uma das mais importantes e urgentes prioridades para que a biorrefinaria atinja suas metas (ZHANG, 2008). A produção do etanol de segunda-geração a partir de resíduos agrícolas geralmente apresenta-se em quatro etapas principais: pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática e/ou ácida dos carboidratos (celulose e hemicelulose) em seus açúcares monoméricos, fermentação por microrganismos dos açúcares liberados seguida de recuperação e destilação do bioetanol (figura 2.14).

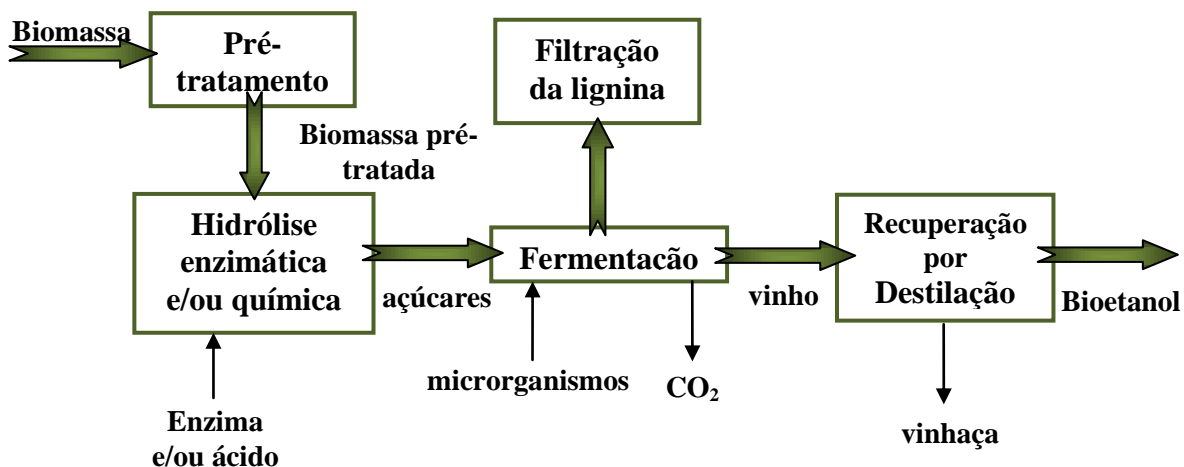


Figura 2.14 – Processo geral para produção de etanol de segunda geração.

Em uma biorrefinaria, a etapa de pré-tratamento é considerada o processo central para a conversão de biomassa lignocelulósica em combustíveis e produtos químicos, afetando todas as outras operações do processo (COSTA SOUSA et al., 2009).

Segundo Hamelinck et al. (2005), realizar a hidrólise da celulose na biomassa nativa sem a etapa de pré-tratamento significa obter um rendimento inferior a 20% no processo, devido a suas características estruturais como cristalinidade, porosidade, área superficial acessível e revestimento por lignina e hemicelulose. Em vista disso, a biomassa deve ser submetida a um processo de pré-tratamento que consiste em romper a barreira protetora de lignina e converter a estrutura recalcitrante da biomassa, tornando assim os carboidratos mais acessíveis ao ataque químico e/ou enzimático, a fim de aumentar o rendimento em açúcares fermentáveis (figura 2.15).

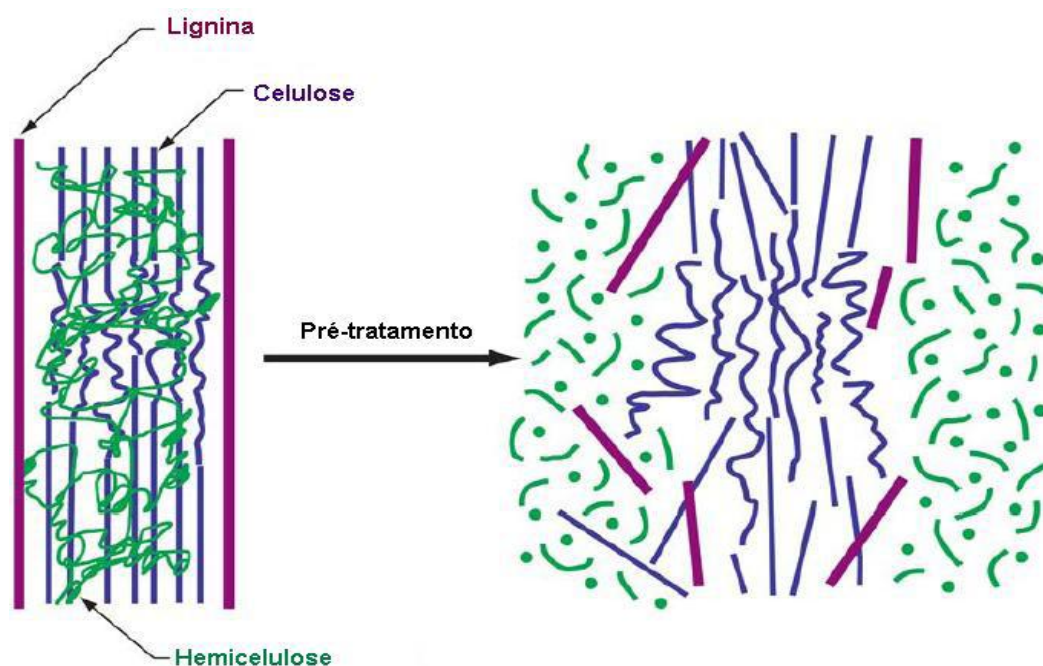


Figura 2.15 - Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de MOSIER et al., 2005).

Atualmente, encontram-se disponíveis uma variedade de tecnologias para pré-tratamento da biomassa, que abrangem uma vasta gama de processos como físicos, químicos, biológicos ou combinados. Entre estes, o pré-tratamento químico vem sendo considerado o mais promissor para o futuro das biorrefinarias. Grande parte dessas tecnologias está sob investigação intensiva em escala de laboratórios e planta-piloto (WYMAN, 2005). A tabela 2.3 apresenta um resumo dos principais tipos de pré-tratamento, suas vantagens e desvantagens e os efeitos que causam na composição da biomassa.

Tabela 2.3 - Mudanças nas características composicionais da biomassa devido a alguns tipos de pré-tratamento, além de suas vantagens e desvantagens (adaptada de ZHU, 2005).

Pré-Tratamento	Mudanças na Característica Composicional			Vantagem	Desvantagem	Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Moinho de Bolas	diminuição do grau de cristalinidade	Não houve	Não houve	Redução da cristalinidade	Alto consumo de energia	Chang; Holtzaple, 2000; Koullas et al., 1990
Explosão a Vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção maior redistribuição	Eficiente energeticamente	Degradação das xilanas como produto inibitório	Grethlein; Converse, 1991
Ácido Diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção maior redistribuição	Pode obter alto rendimento xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso	Torget, 1991; Grethlein; Converse, 1991
AFEX	Diminuição no grau de cristalinidade	> 60% de solubilização	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, sem inibidores	Recuperação de amônia	Dale; Moreira, 1982; Holtzaple et al., 1991
Hidróxido de sódio	Inchaço significativo	Considerável solubilização	solubilização > 50%	Remoção efetiva de ésteres Efetiva	Reagente caro, recuperação alcalina	Millett et al., 1976
Ozonólise	Quase nenhuma despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	deslignificação (condições suaves)	Caro, requer grande quantidade de ozônio	Vidal; Molinier, 1988
Organossolve	Considerável inchaço	Solubilização quase completa	Solubilização quase completa	Alta redução de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação do solvente pode ser cara	Chum et al., 1988
Biológico	20-30% de despolimerização	> 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise	Kirk; Farrell, 1987; Datta, 1981

De acordo com Sun e Cheng (2002) para um pré-tratamento ser considerado adequado e eficiente, deve atender aos seguintes requisitos:

- resultar em alta recuperação de todos os carboidratos;
- permitir alta digestibilidade da celulose, após subsequente hidrólise enzimática;
- evitar a formação de produtos de degradação de açúcares e lignina que são inibitórios para a hidrólise e fermentação;
- demandar pouca energia ou permitir que a energia empregada possa ser reutilizada em outras etapas do processo na forma de calor;
- resultar em elevada concentração de sólidos, bem como em altas concentrações de açúcares liberados na fração líquida;
- ter baixos custos operacionais.

O pré-tratamento tem sido visto como uma das etapas mais caras na conversão bioquímica da biomassa, tendo grande influência sobre os custos das operações subsequentes (LYND, 1996). No entanto, o pré-tratamento também tem grande potencial para melhoria da eficiência e redução dos custos através de pesquisa e desenvolvimento (MOSIER, 2005).

2.7.1 Processos Organossolve

2.7.1.1 Polpação Organossolve

Processos industriais de polpação consistem em separar componentes (celulose, hemicelulose e lignina) da matéria-prima (biomassa lenhosa e resíduos agrícolas), para obtenção, principalmente, da polpa celulósica, utilizada para produção de papel e celulose, sendo os demais constituintes considerados como subprodutos. No entanto, tem sido foco em muitos estudos o melhor aproveitamento desses constituintes como produtos de alto valor para o mercado.

Os processos de polpação convencionais (processos Soda, Kraft e Sulfito) utilizam água como solvente e elevadas concentrações de reagentes químicos associados à elevada temperatura e pressão. No entanto, devido a sérias deficiências desses processos, como o alto custo de energia e poluição do ar e da água, tecnologias alternativas surgiram,

como a polpação organossolve, despertando grande interesse desde a década de 30 (SARKANEM, 1990).

Polpação organossolve, consiste num processo de cozimento da biomassa lignocelulósica para extração de lignina, utilizando reagentes orgânicos como solventes ou suas soluções aquosas, além de catalisador (autocatalisado e/ou com catalisador externo) a elevada temperatura e pressão. Tal processo apresenta-se como uma alternativa promissora aos processos de polpação convencionais, apresentando as seguintes vantagens (AZIZ, 1988; CURVELO, 1992):

- Colabora com a diminuição da poluição ambiental (ausência de enxofre);
- Eficiente para remoção de lignina e hemicelulose menos degradadas, possibilitando o uso integral desses componentes como insumos químicos, o que contribui para a viabilidade econômica do processo;
- apresenta menor custo para construção de plantas, viabilizando a operação em escala de médio porte;
- fácil recuperação dos solventes por destilação.

O processo de polpação organossolve, também chamado processo de extração de lignina, tem sido realizado a partir da utilização de uma grande variedade de solventes e de condições experimentais. Na tabela 2.4 encontram-se alguns solventes orgânicos e catalisadores comumente utilizados nesse processo.

Tabela 2.4 - Solventes e catalisadores comumente utilizados nos processos organossolve (MUURINEN, 2000; SARKANEM, 1990).

Solventes	metanol	Acetona	Ácido Acético	Acetato de Etila
	Etanol	Butanol	Dioxano	Glicerol
	Propanol	Ácido Fórmico	Fenol	Etileno Glicol
Catalisadores	Ácido acético	NaOH	AlCl ₃	Antraquinona
	H ₂ SO ₄	CaCl ₂	Fe ₂ (SO ₄) ₃	Ácido oxálico
	HCl	NH ₃	Al ₂ (SO ₄) ₃	Ácido sulfônico

Dentre os solventes orgânicos, o mais vantajoso para promover a deslignificação tem sido o etanol, devido a sua alta razão de deslignificação, baixo custo e favoráveis condições operacionais (baixo ponto de ebulição), o que facilita sua recuperação por destilação simples (KLEINERT, 1974). Além disso, alcoóis primários como etanol e metanol apresentam melhor seletividade para deslignificação que alcoóis secundários e terciários (YAWALATA, 2001). O uso de etanol como solvente é menos tóxico, sendo que o

pré-tratamento pode ser realizado com menor concentração de solvente, se comparado com o pré-tratamento utilizando metanol. Utiliza-se geralmente para etanol, concentrações entre 40 a 60%, temperaturas de 120°C a 240°C, operação sem catalisador (a temperaturas mais elevadas) ou com uso de catalisadores. Quando o catalisador é ácido, o processo pode ser autocatalisado, ou seja, o ácido acético liberado pela hidrólise dos grupos acetila presentes na hemicelulose já atua como catalisador produzindo a acidez necessária, ou o processo ocorre pela adição de um ácido (CARASCHI, 1997), como ácidos de Lewis que são muito eficientes (SOUSA, 1984). Já nos processos organossolve alcalinos, é utilizada uma base em elevadas quantidades, que age como agente de deslignificação, sendo que, nesse tipo de processo, a dissolução da lignina é efetuada pelo solvente orgânico (AZIZ; SARKANEM, 1989).

Segundo Bianchi (1995), os primeiros estudos sobre solventes orgânicos em processos de polpação começaram na década de 30 por Kleinert e Tayenthal, além de outros trabalhos por Kleinert (1971; 1974), cozinhando cavacos em solução de etanol ou metanol 50% sem a adição de catalisadores em processos contínuos. Várias modificações do processo surgiram desde então, podendo-se destacar:

Processos Alcell: mistura etanol/água 50% (v/v) a 195°C e 400 psi de pressão (tratamento de madeiras duras);

Processos Organocell: apresenta dois estágios de processo, no primeiro é utilizada uma mistura metanol/água (1:1) a 170°C e no segundo estágio uma solução de NaOH a 30% em metanol/água (40:60) a mesma temperatura (tratamento de madeiras moles);

Processos Acetossolve: ácido acético 93% contendo 0,1 a 0,16% de ácido clorídrico como catalisador á temperatura de 110°C (tratamento de madeiras ou plantas anuais) (CURVELO, 1992).

A literatura apresenta vários trabalhos relacionados ao processo de polpação organossolve, com o interesse na obtenção da polpa celulósica na produção de papel e celulose e aproveitamento integral das frações do material lignocelulósicos (AZIZ; SARKANEN, 1989; KLEINERT, 1974; McDONOUGH, 1993).

2.7.1.2 A deslignificação nos processos organossolve

As diferentes reações que ocorrem durante cada sistema de polpação, produzem ligninas com propriedades particulares, como consequência das diferentes características do processo.

A dissolução da lignina por processos organossolve é o resultado da hidrólise de ligações do tipo éter, como as ligações α -O-4 (mais facilmente hidrolisáveis) e β -O-4 (mais freqüentes e quebradas sob certas condições) da macromolécula de lignina. Além disso, pode haver quebra de ligações éter entre os carboidratos e átomos de carbono α das cadeias laterais de lignina (McDONOUGH, 1993). Acredita-se que a ruptura do complexo lignina-carboidrato ocorra devido a catalisadores ácidos liberados na reação (DUFF; MURRAY, 1996). Ocorre também a hidrólise das ligações glicosídicas em hemiceluloses e, dependendo das condições do processo, em celulose (pequena fração).

No que se refere a limitações do processo, a redução da temperatura e/ou concentração de etanol na etapa de lavagem da polpa diminuem a solubilidade da lignina causando a sua reprecipitação na superfície das fibras. Segundo Bianchi (1995) e McDonough (1993), isso ocorre devido à formação de ligações intermoleculares entre os fragmentos da lignina, causando a condensação desses fragmentos solubilizados (figura 2.16).

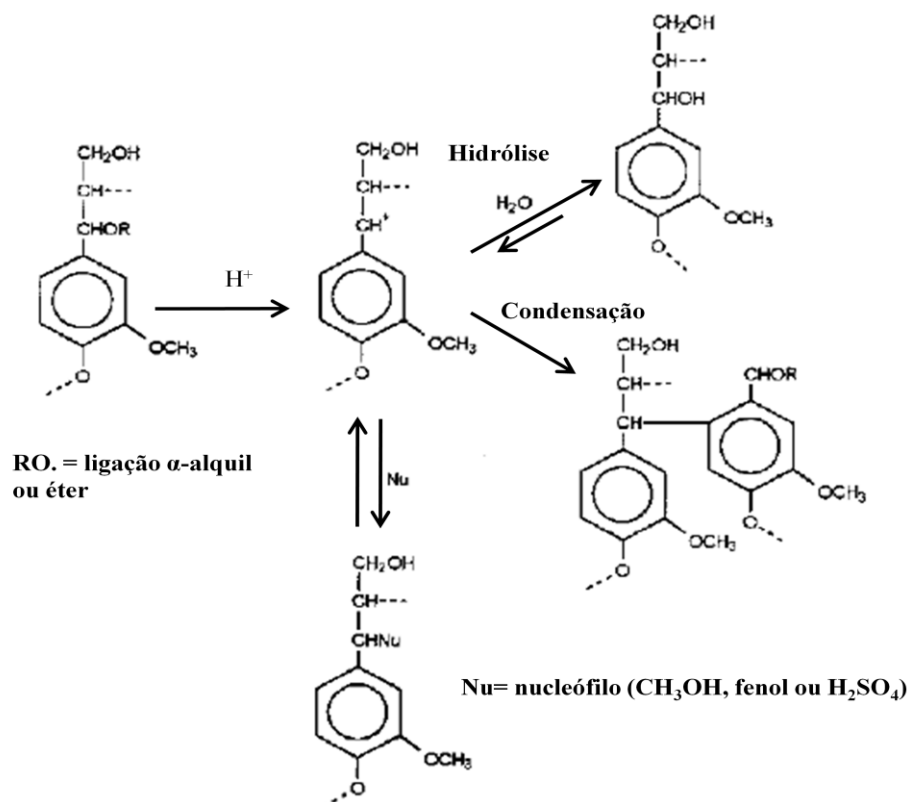


Figura 2.16 - Reação de condensação entre os fragmentos solubilizados de lignina (adaptado de BIANCHI, 1995).

A polpa, portanto, não pode ser lavada com água, uma vez que a diluição tende a reprecipitar a lignina dissolvida. Os métodos de lavagem mais comumente utilizados para remover a lignina reprecipitada são a temperaturas acima de 60°C e soluções solvente/água na mesma proporção utilizada durante o processo de deslignificação.

No entanto, essa lignina reprecipitada não é eliminada apenas por etapas de lavagem. Segundo Xu; Li e Zhang (2007), uma considerável quantidade de lignina permaneceu na superfície das fibras mesmo após quatro etapas de lavagem com solução 55% de etanol a 145°C por 30 min. A lignina, no entanto, é solúvel em soluções alcalinas. Zhang; Xu e Li (2007) após processo organossolve, submeteram as fibras contendo lignina precipitada a lavagem com solução de NaOH 1% por períodos de 1 até 60 min, obtendo uma remoção de até 60% do resíduo de lignina.

2.7.1.3 Pré-Tratamento Organossolve

O processo organossolve tem sido estudado também como um método de pré-tratamento na deslignificação de materiais lignocelulósicos, sendo este semelhante ao processo de polpação organossolve, no entanto, o grau de deslignificação de pré-tratamento não é obrigatoriamente tão alto quanto o da polpação (ZHAO, 2009).

O pré-tratamento organossolve produz três frações distintas:

- Fração de celulose relativamente pura;
- Lignina sólida, obtida após a remoção por destilação do solvente orgânico contido no licor negro;
- Uma solução aquosa de açúcares da hemicelulose. Essa solução é o filtrado do licor após o solvente ser evaporado e a fração de lignina precipitada em solução aquosa.

A remoção dos solventes após pré-tratamento é extremamente importante devido não somente à redução de custos, mas para evitar que atuem como inibidores do processo de hidrólise enzimática e fermentação.

A mais antiga pesquisa sobre pré-tratamento organossolve utilizando etanol como solvente com interesse na obtenção da fração celulósica para posterior hidrólise enzimática ocorreu quando Neilson et al. (1983) submeteu cavacos de choupo (ou álamo) à deslignificação com etanol/água, obtendo um aumento de 1,8-2,5 na hidrólise enzimática quando comparada ao material sem tratar. A melhora na eficiência enzimática após o pré-tratamento organossolve também foi constatada após hidrólise de madeira por Holtzapple e Humphrey (1984).

O fator de severidade, ou grau de severidade, vem sendo muito utilizado por vários autores para analisar resultados de pré-tratamentos de biomassa (CARVALHEIRO, 2009; CHUM et al., 1990; CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990; CULLIS; SADDLER; MANSFIELD, 2004; HAGE et al., 2010; KABEL et al., 2007; OVEREND; CHORNET, 1987;; VAN WALSUM; SHI, 2004).

De acordo com Chen et al. (2007) ele foi primeiramente descrito por Overend e Chornet (1987), de acordo com a equação 2.1:

$$\textit{Severidade} = Ro = t \times e^{(T_r - T_b / \omega)} \quad (2.1)$$

Onde T_r = temperatura da reação, T_b = temperatura base, 100°C e ω = parâmetro de ajuste, o qual nesse e em muitos outros trabalhos vem sendo usado com o valor de 14, 75.

R_0 é um parâmetro de medida da severidade do pré-tratamento empregado na biomassa. Combina os efeitos do tempo e da temperatura de reação e também do tempo em que a temperatura permanece acima de 100°C. De acordo com Chum et al. (1990), o parâmetro ω está relacionado com a energia de ativação via equação 2.2:

$$\omega = \frac{T_f^2 R}{E_a} \quad (2.2)$$

Onde T_f = temperatura escolhida, no meio das condições experimentais, R = constante universal dos gases e E_a = energia de ativação aparente da reação.

Segundo Overend e Chornet (1987), a equação que combina o efeito da temperatura e do tempo de processo surgiu de uma observação geral de que tanto na fase aquosa da pré-hidrólise do processo de polpação Kraft quanto em processos com vapor, era possível trocar duração do tratamento com temperatura deste (temperatura mais alta com tempo menor ou temperatura mais baixa com tempo maior), tal que se obtinham efeitos finais equivalentes (qualidade da polpa ou acessibilidade enzimática). Estava também implícita nesse conceito que a cinética global das reações envolvidas seguia lei de primeira ordem e que a dependência da constante de velocidade para a temperatura seguia Lei de Arrhenius, embora a energia aparente de ativação pudesse ser ela mesma uma função da temperatura. Então, tempo (t) e temperatura (T) foram combinadas em um único fator para avaliar o processo global de polpação. Um método similar e mais conhecido é o método do fator “H”, no qual a velocidade a 100°C é tomada como unitária e as velocidades em outras temperaturas são tomadas como relativas a esse padrão. Para um processo de polpação no qual “T” varia com “t”, a área abaixo da curva da velocidade relativa da reação em função do tempo é o fator “H” (SJÖSTROM¹, apud OVEREND; CHORNET, 1987).

A função severidade foi primeiramente proposta para pré-tratamento aquoso (sem adição de ácido) e implica que a cinética global segue uma dependência de primeira ordem da concentração. Para incorporar o efeito da variação de concentração de ácido, Chum et al. (1990) propôs o fator de severidade combinado (FSC), que também assume uma taxa de primeira ordem de contribuição do catalisador ácido:

¹SJÖSTROM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. New York: Academic Press, 1981.

$$\text{Fator de severidade combinado (FSC)} = \text{Log}(Ro) - pH \quad (2.3)$$

Chum et al. (1990) descobriram que a função severidade combinada forneceu um melhor ajuste para os dados organossolve ácido-catalisado, do que forneceu a função severidade independente do pH. Nesse mesmo estudo foi relatado que para a remoção organossolve de xilana e glucana de madeira aspen, um valor de $\omega = 11 \pm 1$ no cálculo do FSC forneceu um melhor ajuste aos resultados experimentais do que o valor normalmente utilizado de $\omega = 14,75$. Para a remoção de lignina, um valor de $\omega = 10 \pm 1$ foi encontrado como o que fornece o ajuste otimizado para os seus dados.

Pan et al. (2006) realizou o pré-tratamento organossolve (solução de etanol 60% e 1,25% H_2SO_4 como catalisador) em cavacos de álamo a uma temperatura de 180°C por 60 minutos, obtendo 82% de glicose na hidrólise enzimática com 20 FPU/g celulose por 24 h e 85% após 48 h. A recuperação da lignina foi de 74%.

O processo DHR (Dedini Hidrólise Rápida) se encontra em escala de demonstração. Patenteado pela Empresa Dedini S/A emprega a tecnologia Organossolve, combinando em um único estágio de reação, o pré-tratamento do bagaço de cana e a hidrólise catalisada com ácido sulfúrico diluído numa combinação de altas temperaturas ($180/200^\circ\text{C}$) e curto tempo (minutos) de reação. O pré-tratamento e sacarificação são realizados em um único reator, numa relação 100:600:0,1, entre o bagaço, a solução etanol a 75% e o ácido sulfúrico a 98%, sendo que a dissolução da lignina e hidrólise de carboidratos ocorrem simultaneamente. O licor organossolve é destilado para recuperação do etanol, a lignina é precipitada e o licor aquoso contendo os açúcares é retirado. Esse processo apresenta rendimento de sacarificação de 88% (hidrolisado contendo 80g/L de ART) e 89% na fermentação de hexoses (SOARES; ROSSELL, 2008).

Uma vantagem do pré-tratamento organossolve é a capacidade de separar as frações do material lignocelulósico com pureza relativamente alta. Portanto, para a viabilidade do pré-tratamento, o processo deve integrar a utilização dos componentes da biomassa. Após o pré-tratamento, a fração celulósica pode ser convertida a glicose para produção de etanol e outros produtos químicos. A hemicelulose dissolvida na fração aquosa pode ser hidrolisada a monômeros (principalmente xilose) que podem ser fermentados em etanol ou convertidos em furfural, xilitol, além de outros produtos. Frações oligoméricas podem ser hidrolisadas enzimaticamente com endoxilanasas em produtos de alto valor agregado, como os xilooligômeros. A lignina organossolve é de alta qualidade, com elevado grau de pureza por

apresentar-se livre de enxofre, podendo ser utilizada como resinas fenólicas em pó de poliuretano e resinas epóxicas (BENAR, 1992; ZHANG, 2008), além de outros produtos.

A figura 2.17 apresenta uma plataforma alternativa de biorrefinaria de lignocelulósicos com base em pré-tratamento organossolve.

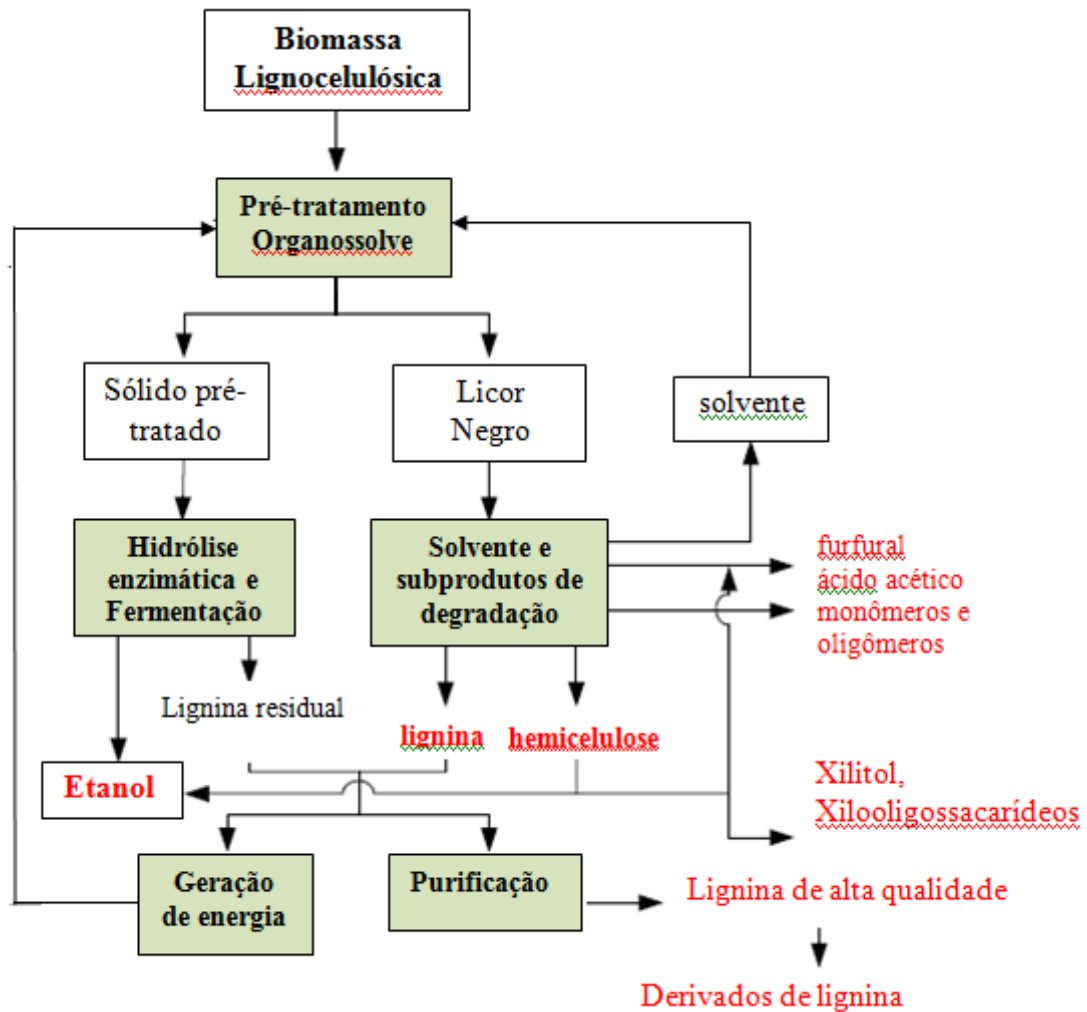


Figura 2.17 – Plataforma de biorrefinaria baseada no pré-tratamento organossolve (adaptada de ZHAO, 2009).

2.8 Hidrólise do Material Lignocelulósico

O processo de obtenção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve a etapa de hidrólise dos polissacarídeos, celulose e hemicelulose, expostos após etapa de pré-tratamento, em açúcares monoméricos fermentáveis, glicose e xilose.

A hidrólise pode ser realizada a partir de catalisadores ácidos ou enzimáticos. A hidrólise ácida é relativamente eficiente, no entanto, pode gerar produtos de degradação dos açúcares produzidos afetando o seu rendimento, além de causar problemas de inibição microbiana (KLINKE et al., 2003). Outra desvantagem desse método é a necessidade de recuperação do ácido, neutralização do hidrolisado e de utilização de equipamentos caros que sejam resistentes a corrosão (MARTÍN et al., 2007).

Na hidrólise enzimática, o catalisador além de operar a temperatura e pH biológicos (condições operacionais brandas), realiza reações específicas e, conseqüentemente, não forma produtos de degradação (BALLESTEROS et al., 2002), apresentando melhores resultados na etapa de fermentação.

O processo enzimático é bastante vantajoso, pois é possível obter altos rendimentos em condições menos críticas de pH, temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente. No entanto, o alto custo das enzimas ainda impede seu uso industrialmente (ODEGA; PETRI, 2010; WYMAN, 1999).

A hidrólise da celulose é realizada pela ação das enzimas celulolíticas também denominadas celulasas. Esse complexo enzimático secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos principais: as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002). A figura 2.18 apresenta a ação catalítica desse complexo.

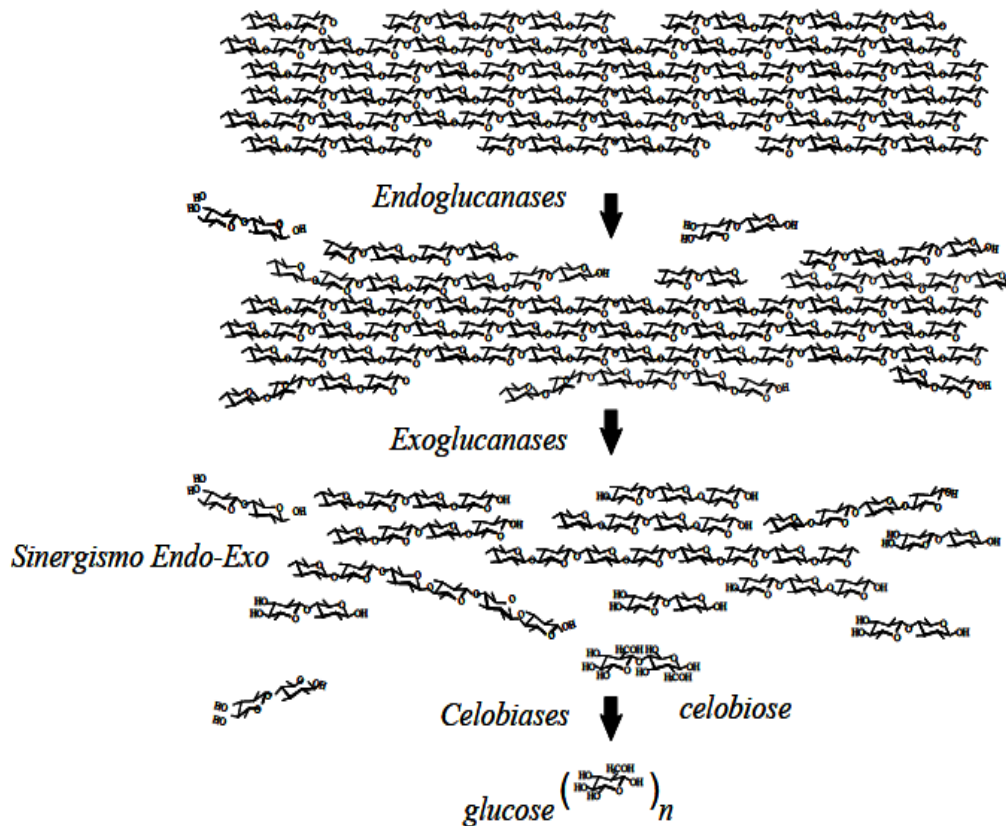


Figura 2.18 – Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose (adaptado de PITARELO, 2007).

As endoglucanases atuam aleatoriamente ao longo das cadeias de celulose e catalisam a hidrólise interna de ligações glicosídicas criando novos terminais (ODEGA; PETRI, 2010).

As exoglucanases clivam os segmentos expostos pela ação das endoglucanases, agindo sobre as extremidades da cadeia, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. A celobiose é hidrolisada em glicose pelas β -glicosidases completando, assim, o processo (BHAT; BHAT, 1997; MANI; TABIL; OPOKU, 2002).

Essas enzimas apresentam alto grau de sinergismo, ou seja, ação combinada que conduz a uma taxa de hidrólise mais elevada do que a soma de suas ações individuais. (MANSFIELD et al., 1999).

A ação das celulases, mesmo operando em condições favoráveis, pode ser limitada por vários fatores, conforme figura 2.19, destacando-se:

1. Inibição das enzimas exoglucanases e β -glicosidases pelos produtos (celobiose e glicose, respectivamente);

2. Impedimento estérico das celulases à celulose pela hemicelulose;
3. Impedimento estérico das celulases à celulose pela lignina;
4. Adsorção inespecífica das enzimas à lignina;
5. Perda da atividade enzimática devido à desnaturação térmica das enzimas em reações muito longas, ao efeito da agitação mecânica (cisalhamento) e a possíveis produtos de degradação provenientes de pré-tratamentos mais drásticos (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; MOSIER et al., 2005).

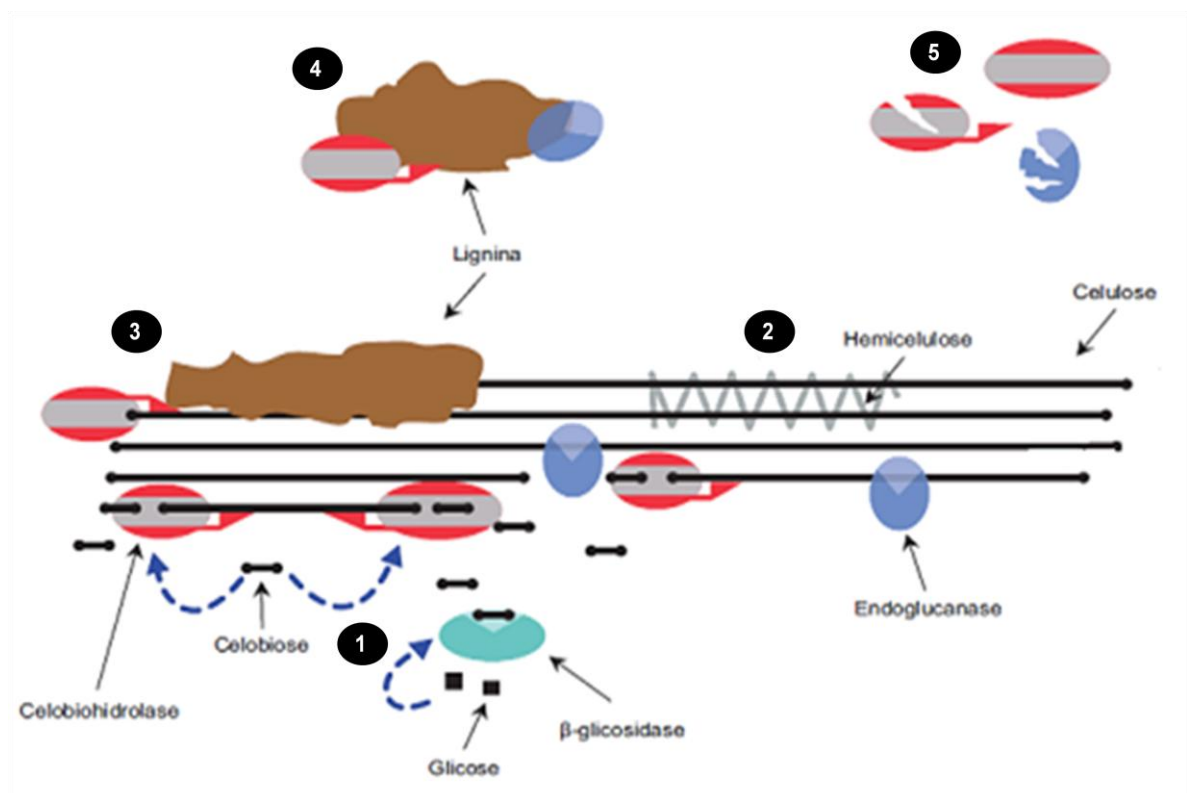


Figura 2.19 – Fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (adaptado de JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

No entanto, embora a remoção de lignina no pré-tratamento evite diminuição da velocidade de reação devido à adsorção inespecífica das celulases, estudos recentes apontam que o aumento da área superficial acessível à celulase é o mais importante efeito deste para alcançar uma alta conversão enzimática. Em suas pesquisas, Rollin et al. (2011) mostra que o pré-tratamento mais efetivo na remoção de lignina apresentou menor rendimento enzimático que outro onde o material continha alto teor residual de lignina. Segundo os autores isso pode ser explicado pela distribuição da lignina remanescente, já que no caso de teor menor a lignina estava distribuída de maneira mais homogênea na superfície da celulose,

o que deve ter impedido o acesso da celulase à celulose. Diferentemente, no material com alto teor de lignina residual, esta se encontrava aglomerada, o que deve permitir maior acessibilidade da enzima à celulose e sua maior conversão.

2.9 Fermentação alcoólica de glicose

A fermentação do licor de açúcares obtido após a hidrólise dos materiais lignocelulósicos é um processo anaeróbio em que os açúcares são convertidos em álcool por meio de microrganismos (usualmente leveduras) (ANEEL, 2005). O etanol é produzido a partir da conversão de glicose, conforme a equação:



O rendimento estequiométrico da reação é de 0,51g etanol/g glicose.

A levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*. Essas leveduras têm sido tradicionalmente utilizadas nas grandes indústrias produtoras de etanol, podendo ser leveduras de panificação, prensadas e secas ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (BELLUCO, 2001).

Em processos fermentativos, a produção do inóculo é muito importante, pois sua qualidade exerce grande influência nos processos fermentativos. Essa etapa consiste em preparar uma população de microrganismos a partir de uma cultura estoque a fim de se obter células em estado fisiológico adequado para a inoculação do fermentador na etapa de produção (HUNT; STIEBER, 1986).

No entanto, mesmo em condições ótimas de fermentação, a levedura pode ser inibida por uma série de compostos químicos, que são produtos de degradação formados em condições mais drásticas de pré-tratamento do material lignocelulósico ou nos processos de hidrólise catalisada por ácidos. Esses produtos de degradação se agrupam em três categorias (DOMINGUEZ, 2003):

- Derivados de furano: furfural formado a partir da degradação de pentoses e HMF, formado como consequência da degradação das hexoses;
- Ácidos alifáticos de baixa massa molecular;
- Derivados fenólicos originados a partir da degradação da lignina.

O furfural pode ainda se degradar a ácido fórmico ou se polimerizar. Já o HMF pode se degradar a ácido fórmico e levulínico (figura 2.20). Além destes ácidos, o ácido acético é formado devido a hidrólise dos radicais acetila da hemicelulose. Os efeitos negativos produzidos pelo furfural e HMF são: diminuição da taxa específica de crescimento, diminuição da produtividade de etanol, redução da síntese de biomassa. Os compostos aromáticos são os que têm mostrado como os mais tóxicos para os microrganismos, pois causam danos na membrana celular. (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; ROSSELL, 2006).

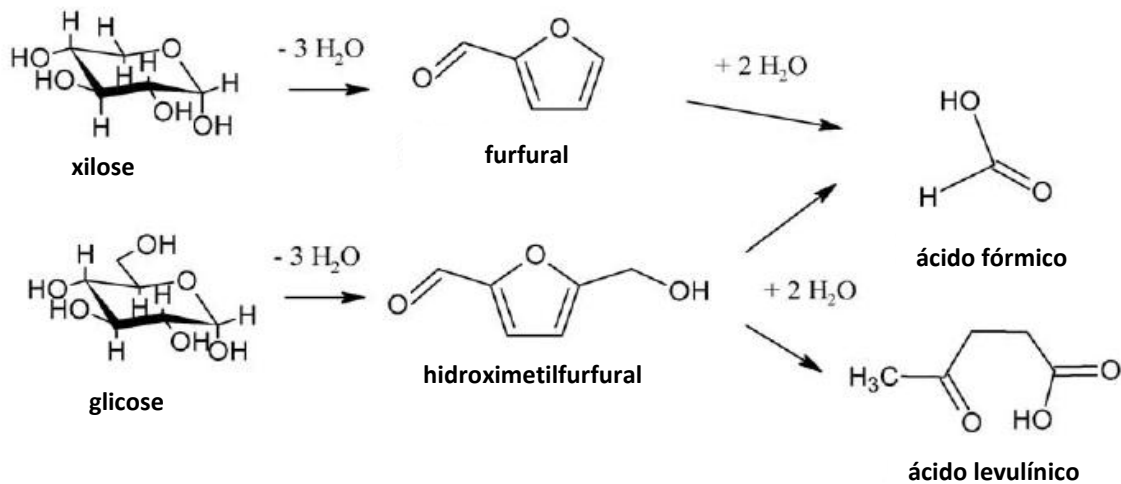


Figura 2.20 – Formação de produtos de degradação da xilose e glicose (adaptado de PEDERSEN; MEYER, 2010).

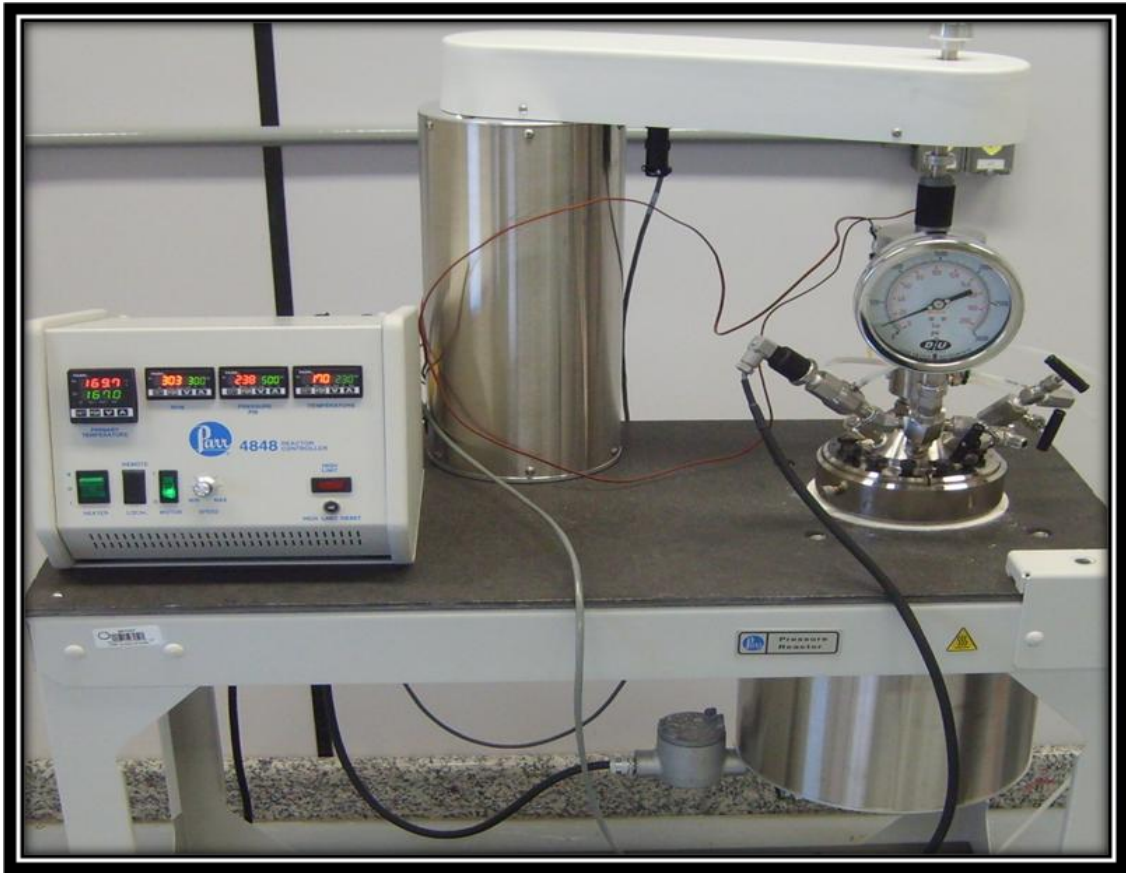
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima para estudo

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, oriundo da Usina Iracema sediada na cidade de Iracemápolis – SP, foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) – Piracicaba – SP. O bagaço, com umidade de aproximadamente 50%, foi estocado em sacos plásticos e armazenado em freezer H500 – Electrolux a temperatura de -20°C.

3.2 Pré-Tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar

O processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado no Laboratório Nacional de Tecnologia do Bioetanol – CTBE que integra o Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) – Campinas-SP. As reações de pré-tratamento organossolve foram realizadas em reator de alta pressão Parr modelo 4848 com capacidade de 2 L, constituído de uma liga altamente resistente à corrosão e à pressão (200 bar), munido de controle de agitação mecânica e aquecimento.



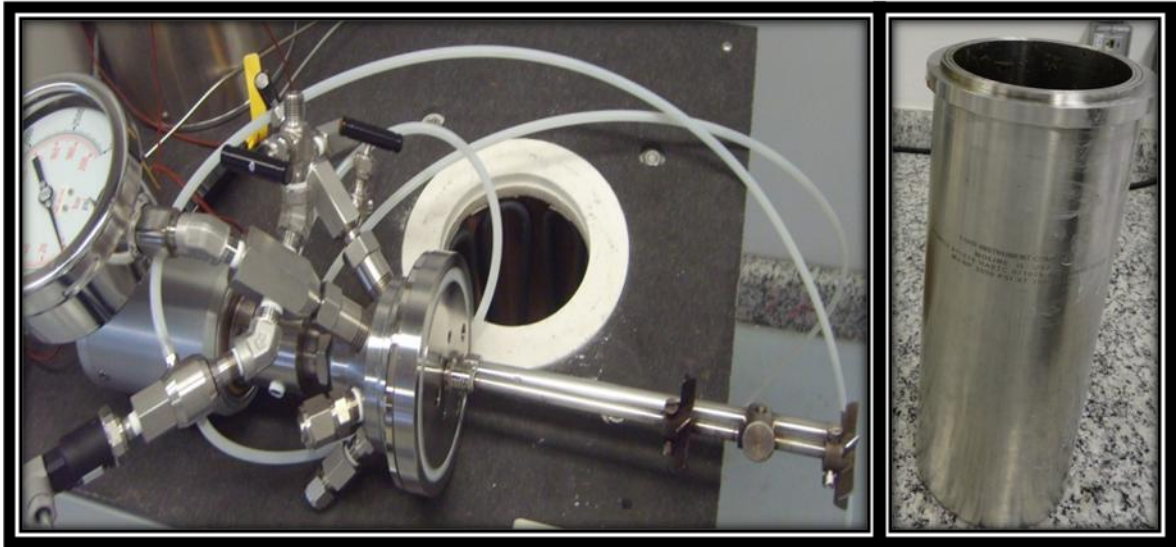
1



2



3



4

5

Figura 3.1 – Foto do Reator Parr (1); Reator sendo retirado do sistema de aquecimento e resfriado com auxílio de uma mangueira de água (2) e (3); Tampa do reator com sistema de agitação, manômetro e válvulas de pressão acoplados (4); vaso do reator contendo bagaço pré-tratado (5).

As características físicas do bagaço utilizado para os experimentos foram mantidas do modo como foi recebido da usina: não houve alterações na granulometria, a umidade foi mantida em aproximadamente 50% e não houve separação entre fibra e medula.

A figura 3.2 apresenta o fluxograma das etapas do trabalho realizado para os experimentos avaliados.

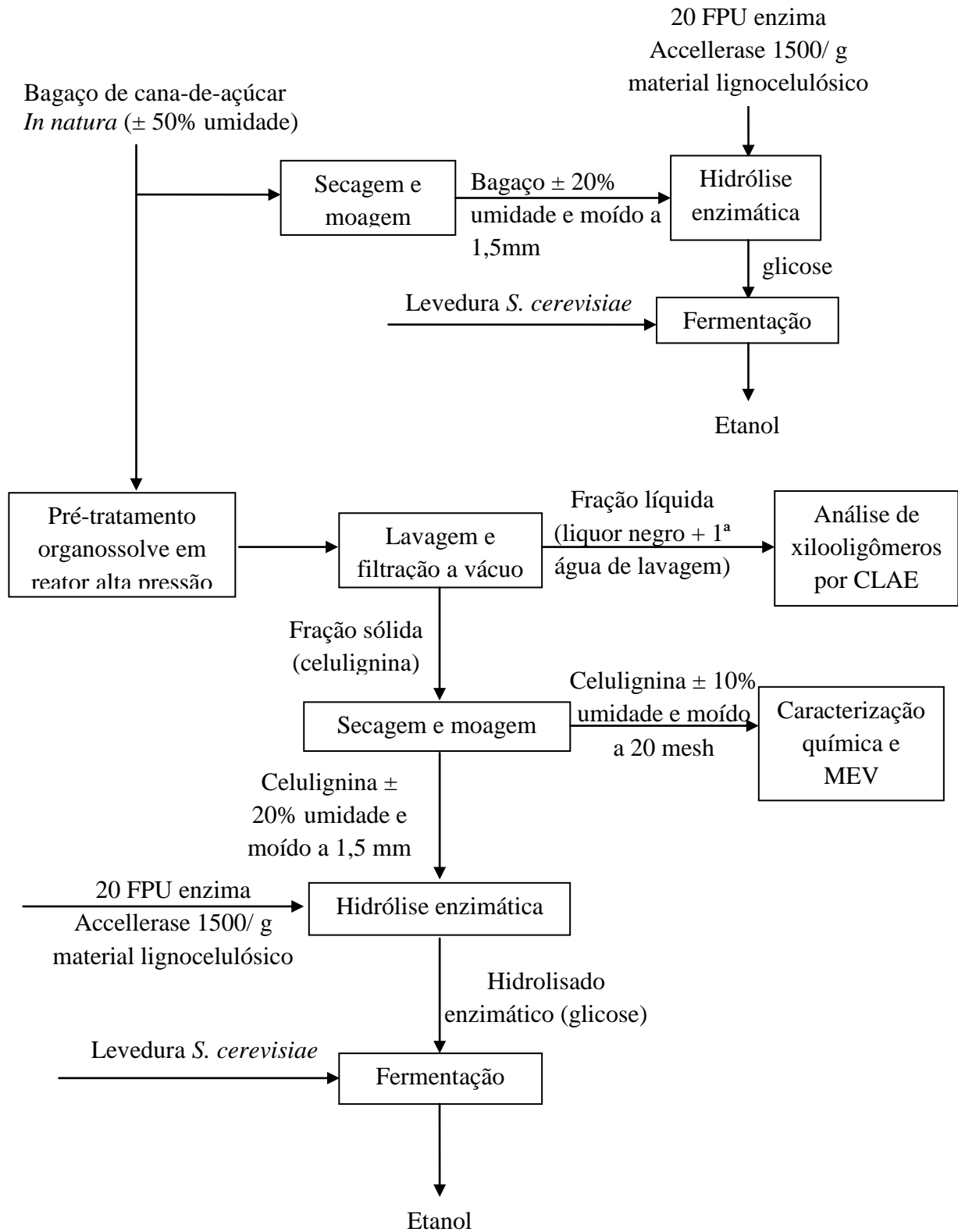


Figura 3.2 – Fluxograma da metodologia empregada para o estudo do bagaço de cana.

As condições de pré-tratamento avaliadas nesse estudo foram: temperatura (150°C, 170°C e 190°C), tempo (30min, 60min e 90min) e concentração de etanol 95% da marca Qhemis em solução (30%, 50% e 70%), variadas para os 11 experimentos realizados, conforme tabela 3.1. Manteve-se fixas a relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) e a agitação de 300 rpm. Realizou-se experimentos em triplicata para a condição de 150°C, 30min e 50% de etanol.

Tabela 3.1 – Condições de pré-tratamento organossolve avaliadas para o bagaço de cana.

Experimentos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Etanol em solução (%)
1	150	30	30
2	150	30	50
3	150	30	70
4	170	60	30
5	170	60	50
6	170	60	70
7	190	90	30
8	190	90	50
9	190	90	70
10	150	30	50
11	150	30	50

O bagaço foi retirado do freezer e deixado ao ar livre para que atingisse a temperatura ambiente, sendo sua umidade determinada por balança de umidade da marca Marte – modelo ID50. Foram adicionados ao reator 30 g de bagaço (massa seca) e 300 mL da solução etanol/água, sendo descontado o volume de água correspondente à umidade do bagaço. Após o fechamento do reator e das válvulas de pressão, este foi ligado dando início a monitoramento do tempo para que a rampa de aquecimento atingisse a temperatura programada. A partir daí, iniciou-se a contagem do tempo estabelecido para cada reação. Com os dados de tempo e temperatura da reação e da rampa de aquecimento, foi possível calcular o grau de severidade para cada pré-tratamento de acordo com a equação 3.1:

$$\log(r_o) = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{(T - T_{ref})}{14,75} \right) \right] \quad (3.1)$$

Sendo:

$\log(r_o)$ = grau de severidade

T = temperatura (°C) e $T_{ref} = 100^\circ\text{C}$

t = tempo de reação (min)

Ao final do tempo de reação, o reator foi desligado e, como o sistema de resfriamento foi desativado devido às características da matéria-prima, o reator foi rapidamente retirado da manta de aquecimento e resfriado em água corrente até total abaixamento da pressão. Em seguida, o reator foi aberto para retirada do material lignocelulósico pré-tratado (celulignina).

Ainda quente, o bagaço foi filtrado a vácuo e para evitar a precipitação da lignina solubilizada sobre o bagaço pré-tratado, este foi lavado com 300 mL de solução etanol/água a 60°C por duas vezes, mantendo a mesma relação de etanol/água utilizada para cada reação. O licor negro concentrado, juntamente com a primeira água de lavagem foram armazenados a 4°C para análise de xilooligômeros.

Em seguida, a celulignina foi lavada com mais 300 mL de uma solução de NaOH 0,2N a temperatura ambiente e, para total remoção da lignina solubilizada, foi feita a lavagem com água destilada até clarificação do líquido. Para neutralização do pH, o material lignocelulósico foi, em seguida, transferido quantitativamente, para um saco de tecido e lavado, exaustivamente, com água até pH em torno de 7.

O bagaço pré-tratado e neutralizado foi transferido para o sistema de filtração a vácuo para máxima retirada de líquido. Determinada a umidade foi possível calcular o rendimento mássico do pré-tratamento pela relação entre a massa do bagaço pré-tratado e a massa do bagaço *in natura* submetido ao pré-tratamento (equação 3.2):

$$R = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Sendo:

R = Rendimento do pré-tratamento (%)

M_f = massa seca final do bagaço pré-tratado

M_i = massa seca inicial do bagaço *in natura*

Após caracterização química do material pré-tratado foi possível calcular as solubilizações de celulose, hemicelulose e lignina utilizando-se a equação 3.3:

$$S = 1 - \frac{(M_p \cdot y_p)}{(M_i \cdot y_i)} \cdot 100 \quad (3.3)$$

Sendo:

S = solubilização do componente (%)

M_p = massa do bagaço pré-tratado

y_p = teor do componente no bagaço após pré-tratamento

M_i = massa do bagaço *in natura*

y_i = teor do componente no bagaço *in natura*

O material pré-tratado e o licor negro foram enviados ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar onde foi realizada a caracterização química, a hidrólise enzimática, a fermentação e a análise de xilooligômeros no licor negro.

3.3 Deslignificação do bagaço pré-tratado com solução alcalina diluída

A etapa de deslignificação alcalina foi realizada no mesmo reator utilizado na etapa de pré-tratamento organossolve. A figura 3.3 apresenta o fluxograma das etapas do processo.

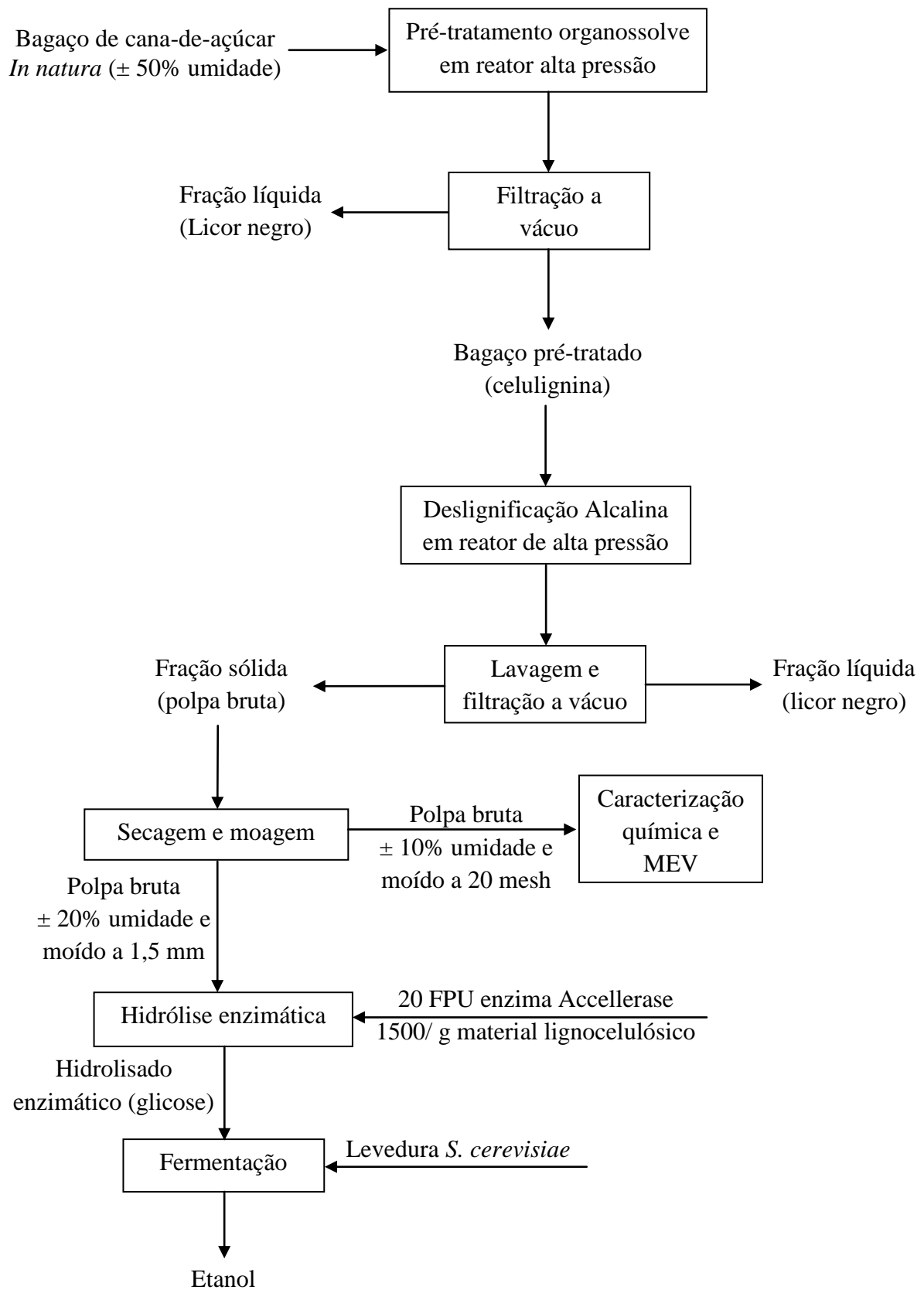


Figura 3.3 – Fluxograma da metodologia empregada para o estudo do bagaço de cana pré-tratado seguido de deslignificação alcalina.

As condições de pré-tratamento dos experimentos selecionados para que fossem submetidos à deslignificação alcalina são apresentadas na tabela 3.2, sendo a relação sólido:líquido mantida fixa em 1:10 (m/v).

Tabela 3.2 – Condições de pré-tratamento organossolve dos experimentos que seguiram a deslignificação alcalina.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Etanol em solução (%)
7	190	90	30
8	190	90	50
9	190	90	70

A preparação do bagaço para etapa de pré-tratamento foi realizada do mesmo modo como descrita no item 3.2.

O material pré-tratado de acordo com a tabela 3.2 foi deslignificado em reator Parr, utilizando-se como agente deslignificante uma solução de NaOH 1% (m/v) com temperatura de 100°C por um período de 1 h e agitação de 300 rpm, numa relação sólido:líquido 1:10 (m/v).

Terminada a reação, o licor negro foi separado da polpa celulósica por filtração a vácuo. A polpa celulósica foi lavada com 600 mL de água a 70°C para retirada da lignina solubilizada e, em seguida, foi colocada em um saco de tecido (para não haver perda de massa) e lavada exaustivamente até pH neutro. Para a máxima remoção de água, a polpa foi novamente filtrada a vácuo. Sua umidade foi determinada e o rendimento do pré-tratamento seguido da etapa de deslignificação, assim como a solubilização dos componentes puderam ser calculados a partir das equações 3.2 e 3.3, respectivamente. Parte da polpa celulósica foi seca em estufa a 40°C para a etapa de caracterização química e o restante foi seco a temperatura ambiente e depois moído para etapa de hidrólise enzimática, realizadas no Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

3.4 Estudo do efeito do tempo e do uso de catalisador ácido nas reações de pré-tratamento

Para o estudo da influência do tempo e do uso de catalisador ácido nos processos de pré-tratamento organossolve com e sem a etapa de deslignificação alcalina foram realizados experimentos mantendo-se fixas as condições de tempo (10 min), temperatura (190°C), relação sólido-líquido (1:10 m/v) e relação etanol/água (50%). O ácido utilizado foi o H₂SO₄ 1% (m/m).

Os experimentos realizados nessas condições foram:

- pré-tratamento organossolve nas condições estabelecidas;
- pré-tratamento organossolve com uso de catalisador ácido 1% (m/m);
- pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina;
- pré-tratamento organossolve com uso de catalisador ácido 1% (m/m) seguido de deslignificação alcalina.

As reações ocorreram no mesmo reator de pressão Parr e as etapas de lavagem do material lignocelulósico foram realizadas do mesmo modo como descrito para os pré-tratamentos sem a deslignificação alcalina (item 3.2) e para as amostras pré-tratadas seguidas de deslignificação alcalina (item 3.3). O material lignocelulósico e a polpa celulósica tratados foram caracterizados quimicamente e submetidos à hidrólise enzimática, seguida de fermentação.

3.5 Caracterização química do bagaço

Amostras do bagaço *in natura*, pré-tratado seguido ou não da etapa de deslignificação alcalina e pré-tratado catalisado com ácido foram caracterizadas quanto sua composição química de acordo com a metodologia analítica para bagaço de cana desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009). A figura 3.4 mostra o fluxograma das etapas de caracterização do bagaço.

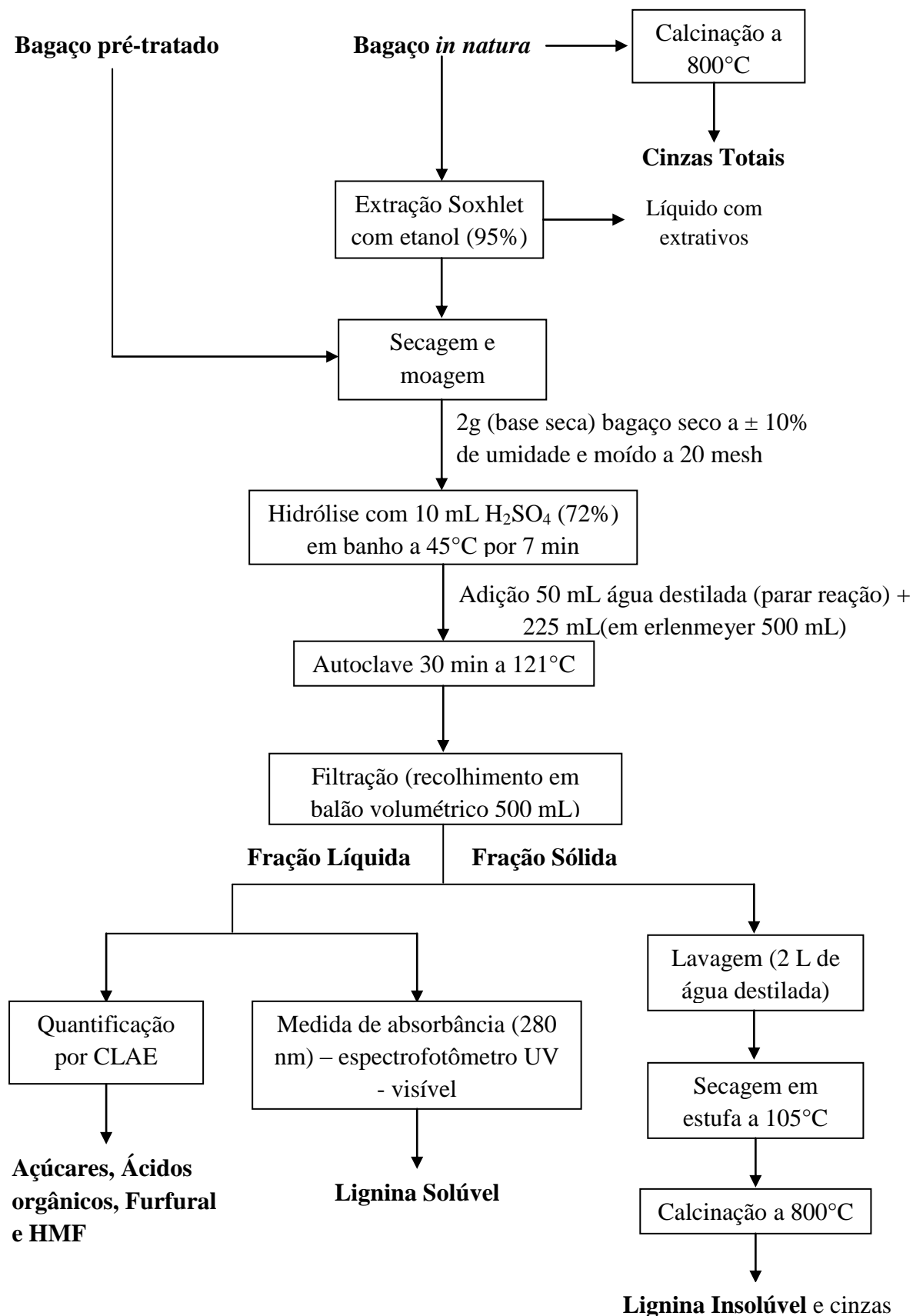


Figura 3.4 – Fluxograma das etapas de caracterização do bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado.

3.5.1 Determinação do teor de umidade

As amostras foram, primeiramente, secas em estufa da marca Nova Ética a temperatura de 40°C até atingirem umidade de aproximadamente 10%. O teor de umidade foi determinado por balança de umidade a partir de 1 g de material aquecido com fonte de calor infravermelho a 105°C. A massa seca foi calculada com base no teor de umidade.

3.5.2 Moagem

Determinada a umidade das amostras, estas foram submetidas à moagem em moinho de rotor da marca Fritsch tipo pulverisette 14 acoplado com peneira de 20 mesh.

3.5.3 Determinação do teor de extrativos

Na caracterização do bagaço *in natura* foi necessário remover os extrativos orgânicos solúveis. Já para o bagaço pré-tratado, esses extrativos são removidos durante o processo de pré-tratamento.

Para a determinação dos extrativos, uma amostra de 4 g de bagaço moído e seco foi acondicionada em cartucho de celulose para extração, sendo este inserido num extrator Soxhlet. A extração foi realizada por um período de 8 h, utilizando 400 mL de etanol 95% como solvente para remover os extrativos constituídos por uma grande variedade de compostos orgânicos.

Após extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo a 60°C e o resíduo contendo os extrativos foi seco em balão volumétrico previamente tarado. A amostra foi deixada em temperatura ambiente para secagem. O teor de extrativos foi determinado pela relação entre a massa seca de extrativos (diferença entre a massa inicial do bagaço e a massa final após extração) e a massa inicial da amostra de bagaço *in natura* (base seca).

3.5.4 Hidrólise Ácida

Amostras de 2 g (massa seca) de bagaço moído (20 mesh) com aproximadamente 10% de umidade, contidas em béquer de 100 mL, foram submetidas à hidrólise ácida com a adição de 10 mL de H₂SO₄ 72% (previamente titulado) em banho termostaticado da marca Nova Ética a 45 °C por 7 min sob vigorosa agitação utilizando bastão de vidro. A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo o conteúdo do béquer transferido quantitativamente para um erlenmeyer de 500 mL com a ajuda do bastão de vidro. O béquer e o bastão foram lavados com 225 mL de água destilada, esta foi adicionada ao erlenmeyer totalizando 275 mL.

O erlenmeyer foi tampado com papel alumínio e autoclavado por 30min a 121°C para hidrólise completa dos oligômeros restantes. Após autoclavagem, as amostras hidrolisadas foram resfriadas e filtradas em um funil com papel de filtro qualitativo previamente seco em estufa a 105°C e pesado. A fração líquida foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL, esse volume foi completado com águas de lavagem do erlenmeyer e do papel de filtro. Esta fração foi, então, armazenada para análises de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel. A determinação de lignina insolúvel e cinzas foi feita a partir da fração sólida que ficou retida no papel de filtro.

3.5.5 Determinação de lignina insolúvel

O papel de filtro contendo o resíduo sólido (lignina insolúvel e cinzas) foi lavado com 2 L de água destilada para retirada total do H₂SO₄, evitando sua queima e conseqüente perda de massa ao ser seco em estufa a 105°C até peso constante.

Para a determinação da lignina insolúvel a fração sólida foi calcinada em mufla da marca Quimis empregando cadinho com tampa, previamente calcinado e tarado, até atingir temperatura de 800°C. Em seguida, a mufla foi desligada e quando atingiu a temperatura de 400°C, a tampa foi retirada, reiniciando a calcinação a 800°C por 2 h. Após esse período, o cadinho contendo as cinzas foi armazenado em dessecador até atingir temperatura ambiente e em seguida pesado.

A massa de lignina insolúvel foi determinada pela diferença entre a massa da fração sólida contendo lignina e cinzas e a massa de cinzas obtida por calcinação.

3.5.6 Determinação de cinzas totais

Do mesmo modo como foi determinada a lignina insolúvel, uma amostra de 2 g de bagaço *in natura* (massa seca) foi colocada em cadinho com tampa previamente calcinado e tarado. Inicialmente a amostra foi calcinada em mufla até atingir temperatura de 800°C, desligando-se a mufla logo em seguida. Após a temperatura atingir 400°C, os cadinhos foram destampados e a temperatura foi elevada, permanecendo a 800°C por 2h. Posteriormente, o cadinho contendo as cinzas foi armazenado em dessecador e foi pesado após atingir temperatura ambiente. O teor de cinzas totais foi determinado pela relação entre a massa de cinzas após calcinação e a massa seca da amostra de bagaço.

3.5.7 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

Os açúcares e ácidos orgânicos contidos na fração líquida proveniente das hidrólises com ácido sulfúrico 72% foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Shimadzu SCL-10A com detecção por índice de refração Shimadzu RID-10A. A coluna de separação utilizada foi a Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) Bio-Rad com H₂SO₄ 0,005mol.L⁻¹ como fase móvel à vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno a 45 °C. Para o cálculo dos teores de açúcares e ácidos carboxílicos foram obtidas curvas de calibração a partir de padrões de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e ácido fórmico. Uma amostra da fração líquida foi filtrada em cartucho de extração em fase sólida Sep-Pak[®] C-18 Waters antes de ser injetada, para que lignina solúvel e produtos de degradação fossem retidos. Os cromatogramas foram analisados e quantificados com base nas curvas de calibração determinadas para cada composto.

3.5.8 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

Uma amostra da fração líquida foi inicialmente filtrada em membrana 0,45 µm da marca Sartorius Stedim para remoção dos resíduos sólidos. Os compostos furfural e HMF foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), em uma coluna C-18 Beckman com detector UV-visível Waters – 486 a 274 nm, utilizando uma solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e temperatura de 25°C. Foram construídas curvas de calibração preparadas com padrões de grau analítico para determinar a concentração de furfural e hidroximetilfurfural nas amostras.

3.5.9 Determinação da lignina solúvel

Uma alíquota de 5 mL da fração líquida dos materiais hidrolisados com H₂SO₄ 72% foi transferida para uma balão volumétrico de 100 mL com a adição de 2 mL de NaOH 6,5N, resultando em pH próximo a 12. O volume foi completado com água destilada e após homogeneização, a lignina solúvel foi quantificada por espectroscopia na região do ultravioleta em espectrofotômetro UV-visível Ultrospec-2000, através da medida de absorbância a 280 nm utilizando cubeta de quartzo.

A concentração de lignina solúvel foi calculada utilizando-se a equação 3.4, a qual subtrai-se os produtos de degradação dos açúcares (pd) determinados previamente por CLAE.

$$C_{lignina} = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_t - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (3.4)$$

Sendo:

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

A_t : absorbância, em 280 nm, da solução de lignina com os produtos de degradação;

A_{pd} : absorbância, em 280 nm, de furfural e HMF;

A_{pd} : $(C_1 \cdot \epsilon_1) + (C_2 \cdot \epsilon_2)$;

C_1 : concentração de furfural no hidrolisado, determinada por CLAE, em g/L;

C_2 : concentração de HMF no hidrolisado, determinada por CLAE, em g/L;
 ε_1 e ε_2 : absorvidades do furfural e HMF determinadas experimentalmente, que valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L.g⁻¹.cm⁻¹.

3.6 Análise do bagaço de cana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de bagaço *in natura* e bagaço pré-tratado foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura no Departamento de Engenharia de Materiais (EEL – USP). Primeiramente, as amostras foram fixadas com fita carbono dupla face na base de um suporte de alumínio e submetidas ao recobrimento metálico com 17 nm de ouro em uma metalizadora BAL-TEC MED 020 – Coating System e mantidas em dessecador até o momento de análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO 440 com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kv.

Para as amostras de bagaço pré-tratado seguido de deslignificação alcalina e bagaço pré-tratado com uso de catalisador ácido, as fotomicrografias foram obtidas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), sendo realizado o mesmo procedimento das amostras analisadas na EEL-USP, utilizando equipamentos de mesma marca e modelo.

3.7 Hidrólise Enzimática

Os experimentos submetidos à hidrólise enzimática foram realizados utilizando a enzima comercial Accellerase 1500 cedida pela Genencor.

A atividade celulósica total das enzimas foi determinada como recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987). Em tubo de Folin Wu foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 4,8), 0,5 mL de extrato enzimático previamente diluído e uma tira de papel de filtro Whatman No. 1 de filtro (1,0 x 6,0 cm) como substrato. Os tubos foram colocados em uma incubadora da marca Marconi – modelo MA 832 a 50°C por 60 min. A quantidade de glicose liberada foi determinada em seguida, empregando-se o método

do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Para isso, a reação foi interrompida adicionando-se 3,0 mL do reagente DNS e, em seguida, os tubos foram colocados em banho fervente por 5 min sendo posteriormente resfriados. Após homogeneização da solução procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro Biospectro - SP-22 a 540 nm.

A partir do resultado obtido de atividade enzimática foi possível calcular o volume de enzima necessário para os ensaios de hidrólise.

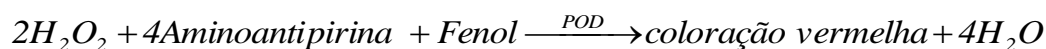
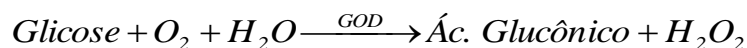
As amostras pré-tratadas foram submetidas a duas diferentes condições de hidrólise enzimática. Na primeira condição testada, a celulignina, após pré-tratamento organossolve teve sua umidade mantida em aproximadamente 75% e não houve alteração na sua granulometria. A carga enzimática de 20 FPU/g de celulose foi adicionada em 30 mL de tampão (descontando-se a umidade) e manteve-se a relação sólido (celulose):líquido (tampão citrato) de 1:10 (m/v). O tempo de hidrólise foi de 42 h.

A segunda condição de hidrólise foi testada para amostras do bagaço pré-tratado e *in natura*. Nesse caso, o bagaço foi seco a temperatura ambiente até aproximadamente 20% de umidade e moído a 1,5 mm em moinho da marca Fritsch tipo Pulverisette 19 para melhor homogeneização do sólido. A carga enzimática utilizada foi de 20 FPU/g de material lignocelulósico, adicionada em 30 mL de tampão citrato (descontando-se a umidade) e a relação sólido (material lignocelulósico):líquido (tampão citrato) de 1:10 (m/v) foi mantida. O tempo de hidrólise foi de 72 h.

A hidrólise do bagaço *in natura*, pré-tratado com e sem uso de catalisador e seguido ou não de deslignificação alcalina foi realizada em erlenmeyer de 250 mL adicionando 30 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH 4,8) na massa de bagaço pré-tratado e *in natura* e uma carga enzimática de 20 FPU/g de celulose e 20 FPU/g de material lignocelulósico nas duas condições analisadas.

A reação de hidrólise ocorreu em incubadora refrigerada com agitação de 200 rpm e 50°C. Alíquotas de aproximadamente 300µL foram retiradas nos tempos de: 0,5, 10, 24, 34, 42, 57, 65 e 72 h e recolhidas em microtubos tipo Eppendorf contendo 200 µL de uma solução NaOH 0,2N, previamente pesados, para interromper a atividade enzimática. Após o período determinado (42 e 72 h para cada condição de hidrólise estudada), o hidrolisado foi centrifugado em centrífuga da marca Eppendorf – modelo 5810R a 10000 rpm por 15 min e o sobrenadante contendo a glicose foi avaliado quanto a sua fermentabilidade.

A concentração de glicose (g/L) foi acompanhada ao longo do tempo pela metodologia enzimática colorimétrica (GOD PAP) descrita por Henry; Cannon e Winkelman, (1974), que consiste nas seguintes reações:



O método baseia-se na oxidação da glicose pela enzima Glicose-oxidase (GOD), formando peróxido de hidrogênio que, em presença de Peroxidase (POD), reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um composto de coloração vermelho cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose.

Para a quantificação da glicose, uma alíquota de 10 µL da amostra foi adicionada em um microtubo contendo 1 mL do reativo (Kit Glicose GOD PAP – Laborlab). As reações, realizadas em duplicata, ocorreram em um banho termostaticado a 37°C por um período de 5 min e a leitura da absorbância foi efetuada em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração de glicose foi determinada com base em sua curva de calibração: concentração de glicose (g/L) em função da absorbância medida no comprimento de onda de 505 nm.

A conversão enzimática da celulose foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$C = \frac{M_g \cdot f_h}{M_i \cdot y_i} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Sendo:

C: conversão enzimática da celulose (%);

M_g: massa de glicose presente no hidrolisado;

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

y_i: teor de celulose no material lignocelulósico;

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

3.8 Fermentação do hidrolisado enzimático

O líquido contendo glicose resultante da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos foi utilizado com o intuito de se avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático.

O inóculo foi preparado em um erlenmeyer de 500 mL contendo extrato de levedura (2g/L); Na₂SO₄ (1g/L); MgSO₄.7H₂O (0,25g/L); uréia (2g/L); CaCl₂.2H₂O (0,5g/L); K₂HPO₄ (0,5g/L); kamuran (4g/L), além de 10g/L da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de panificação produzido pela Fleischmann) em base seca e 200 mL de solução de glicose (20g/L) em pH 4,8 (NARCISO et al., 2009). Este inóculo foi mantido em incubadora refrigerada com agitação de 250 rpm e 30°C por um período de 16 h. Em seguida, o inóculo contendo as células de levedura foi filtrado a vácuo e a massa retida no papel de filtro foi utilizada para fermentar o hidrolisado enzimático.

Alíquotas com aproximadamente 15 mL, referentes à hidrólise enzimática de cada amostra pré-tratada e de uma amostra *in natura* foram fermentadas a partir de uma massa do inóculo (levedura *Saccharomyces cerevisiae*). Foram adicionados os mesmos componentes utilizados para preparação do inóculo, mantendo o pH em 4,8. A fermentação foi realizada em um erlenmeyer de 250 mL agitado em incubadora refrigerada a 250 rpm e temperatura de 30°C por um tempo de 135 min. Também foi feita a fermentação de um experimento-controle contendo glicose (20 g/L) e todos os componentes citados anteriormente. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas a cada meia hora sendo imediatamente filtradas em membrana 45 µm e armazenadas para posterior quantificação de glicose e etanol por CLAE.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando um método simples de tingimento com azul de metileno. A contagem das células foi feita em uma Câmara de Neubauer Dupla Melhorada (“Improved”) – HBG com 0,1 mm de profundidade e com o auxílio de um microscópio ótico, binocular da marca Olympus – modelo BX50.

O rendimento da fermentação (R_f) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido e a quantidade de glicose presente inicialmente em g/L (equação 3.6). Já a eficiência da fermentação (E_f) foi determinada pela relação entre o rendimento real e o rendimento teórico de 0,51 (equação 3.7) (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

$$R_f = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{glicose inicial}} \quad (3.6)$$

$$E_f = \frac{\text{rendimento real}}{\text{rendimento teórico (0,51)}} \quad (3.7)$$

3.9 Estudo da fração hemicelulósica solubilizada no licor negro

Os licores utilizados para a análise da fração de xilana foram provenientes das seguintes condições de pré-tratamento organossolve mostradas na tabela 3.3:

Tabela 3.3 – Condições dos experimentos utilizados para análise do licor negro contendo a fração de xilana solubilizada.

Experimentos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Etanol em solução (%)
1	150	30	30
2	150	30	50
3	150	30	70
5	170	60	50
8	190	90	50

A figura 3.5 apresenta o fluxograma das etapas realizadas para obtenção dos xilooligômeros a partir do licor negro proveniente dos experimentos avaliados.

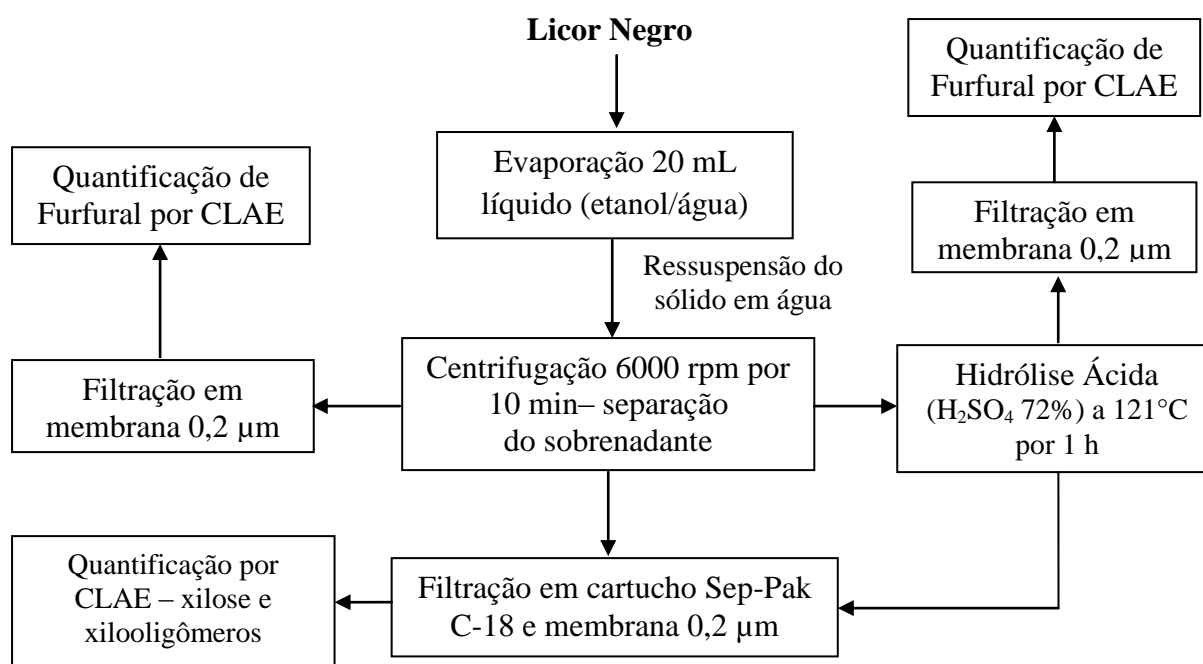


Figura 3.5 – Fluxograma das etapas de trabalho para obtenção dos xilooligômeros a partir do licor negro.

Para análise da xilana solubilizada no licor negro foi necessário evaporar todo o líquido contendo frações solubilizadas de lignina e carboidratos (principalmente a fração hemicelulósica) na forma monomérica, oligomérica e/ou degradados pelo processo de pré-tratamento organossolve. Para isso, amostras de 20 mL do licor de cada pré-tratamento com etanol/água foram totalmente evaporadas a temperatura ambiente em uma capela a vácuo. A lignina sólida foi ressuspensa em um volume de água mili-Q equivalente ao volume evaporado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min, sendo parte do sobrenadante filtrado em membrana 0,2 µm da marca Millipore para análises de furfural por CLAE em coluna µBondepak C18 (3,9 x 300 mm) – Waters.

Para quantificação de xilose, o restante do sobrenadante foi filtrado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak[®] C-18 e em membrana 0,2 µm para remoção dos resíduos sólidos. Os compostos foram identificados em detector por índice de refração Waters – 410. A coluna de separação utilizada foi a Supelcogel C-610H (30 cm x 7,8 mm) – Sigma, com H₃PO₄ 0,1% como fase móvel, vazão de 0,8 mL/min e temperatura de 30°C. As frações de xilana foram quantificadas com base na curva de calibração da xilose.

Para quantificação total dos xilooligômeros presentes no licor, amostras de 20 mL foram submetidas ao mesmo procedimento de evaporação, ressuspensão do sólido e centrifugação descrito acima. Um volume de 5 mL do sobrenadante de cada amostra foi submetido à hidrólise ácida para a conversão dos oligômeros a monômeros a partir da reação com 174 µL de H₂SO₄ 72% em tubos de ensaio com tampa, colocados em banho seco da marca Nova Ética a 121°C por um período de 1 h. Após hidrólise ácida, as amostras foram resfriadas e, em seguida, uma alíquota de cada amostra foi filtrada em membrana 0,2 µm para análises de furfural por CLAE em coluna µBondepak[™] C18 (3,9 x 300 mm) – Waters e o restante foi filtrado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak[®] C-18 e membrana 0,2 µm para quantificação dos xilooligômeros que foi feita por CLAE do mesmo modo como descrito para as amostras sem a etapa de hidrólise ácida.

O cálculo para determinar a quantidade total de xilooligômeros presentes no licor negro foi feito pela diferença entre a massa de xilose total obtida após quebra dos oligômeros em monômeros na hidrólise ácida e a massa de xilose obtida no licor analisado sem a hidrólise ácida. O rendimento de extração de xilooligômeros foi determinado pela relação entre a massa total de xilooligômeros encontrada no licor negro (referente à massa de xilose obtida) e a massa de xilose teórica contida no licor negro (equação 3.8).

$$R_{xo} = \frac{(M_{xH} - M_x)}{M_{xT}} \cdot 100 \quad (3.8)$$

O rendimento de extração da fração hemicelulósica na forma de monômeros (xilose) foi calculado para as diferentes condições de pré-tratamento avaliadas de acordo com a equação 3.9:

$$R_x = \frac{M_x}{M_{xT}} \cdot 100 \quad (3.9)$$

Sendo, para as equações (3.8) e (3.9):

R_{xo} : rendimento de extração de xilooligômeros (%);

R_x : rendimento de extração de xilose (%);

M_{xH} : massa de xilose total obtida após hidrólise ácida;

M_x : massa de xilose obtida no licor após pré-tratamento;

M_{xT} : massa de xilose teórica presente no licor negro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi caracterizado quimicamente, em triplicata, como descrito no item 3.5. A composição química da amostra de bagaço de cana *in natura* em estudo e os desvios padrão de cada componente são apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (%).

Celulose	38,8 ± 1,4
Hemicelulose	29,4 ± 1,7
Lignina Total	21,7 ± 0,7
Cinzas	5,1 ± 0,4
Extrativos	4,9 ± 1,1
Total	99,9 ± 1,5

Durante a hidrólise ácida, os carboidratos poliméricos (celulose e hemicelulose) são convertidos em oligômeros e seus açúcares constituintes. Para o cálculo dos teores de celulose e de hemicelulose foram utilizadas as massas de cada fração detectada, multiplicadas pelo respectivo fator de conversão e divididas pela massa de bagaço submetido à caracterização, sendo:

$$\text{Celulose} = (0,90 \times \text{massa de glicose}) + (0,95 \times \text{massa de celobiose}) + (1,20 \times \text{massa de HMF}) + (3,09 \times \text{massa de ácido fórmico}) / \text{massa de bagaço inicial e}$$

$$\text{Hemicelulose} = ((0,88 \times \text{massa de xilose}) + (0,88 \times \text{massa de arabinose}) + (0,72 \times \text{massa de ácido acético}) + (1,37 \times \text{massa de furfural})) / \text{massa de bagaço inicial, de acordo com Gouveia et al. (2009).}$$

Os resultados obtidos na caracterização química do bagaço mostraram a presença dos seguintes carboidratos: hemicelulose, com teor de 29,4%, valor similar ao encontrado na literatura (29% -29,7%) por Nassar; Ashour e Wahid (1996) e Teixeira; Linden e Schroeder (2000), respectivamente e celulose, teor de 38,8%, valor próximo aos encontrados por Garzón Fuentes (2009) e Rabelo (2007): 37,3% e 39,6%, respectivamente.

A hidrólise de hemicelulose, um heteropolímero, mostrou presença dos seguintes compostos: xilose, arabinose, ácido acético e furfural, na proporção de 67,8%,

11,0%, 19,1% e 3,05%, respectivamente, os quais, após conversão a hemicelulose, através dos respectivos fatores, resultaram numa composição de 20,4%, 3,2%, 4,4% e 1,4%, totalizando os 29,4 % de hemicelulose no bagaço.

Esses resultados mostraram uma alta proporção de celulose e xilana no bagaço, o que evidencia que essa biomassa apresenta um grande potencial para a produção de etanol de segunda geração a partir da celulose, bem como de xilooligossacarídeos da hemicelulose hidrolisada.

A lignina total reportada na tabela 4.1 refere-se à lignina insolúvel (19,3%) e lignina solúvel (2,4%) em meio ácido, apresentando valor de 21,7%. Esse valor corrobora resultados de Triana et al. (1990) e Rocha et al. (2011).

A porcentagem de compostos extraíveis com etanol 95% foi de 4,9% da massa total, valor bastante próximo ao encontrado por Rocha et al. (2011) de 4,6% .

O valor obtido para cinzas totais de 5,1% está de acordo com os valores reportados na literatura para uma faixa de 1,5-5% (BANERJEE; PANDEY, 2002).

4.2 Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana

4.2.1 Caracterização do bagaço de cana pré-tratado

As reações de pré-tratamento organossolve ocorreram em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de etanol em solução.

A tabela 4.2 apresenta os valores de caracterização para cada componente realizada em duplicata e a tabela 4.3 apresenta as caracterizações corrigidas pelo rendimento do pré-tratamento. O cálculo para essa correção foi feito multiplicando-se o valor de cada componente obtido na caracterização química pelo rendimento de cada pré-tratamento. Desse modo, foi possível comparar na mesma base mássica as alterações na composição química, após pré-tratamento, em relação ao bagaço *in natura*. Na condição de 150°C/30min/50% etanol foi feita uma triplicata de reação visando verificar a reprodutibilidade do pré-tratamento e observou-se que o desvio padrão foi de 0,5, evidenciando que os pré-tratamentos foram bastante reprodutivos.

Tabela 4.2 – Valores percentuais do rendimento mássico e da massa de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas, obtidas na caracterização química e gravimétrica da fração sólida obtida após pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de etanol.

Componentes (%)	Condições de pré-tratamento organossolve do bagaço de cana								
	150°C/30min			170°C/60min			190°C/90min		
	% etanol em solução (v/v)			% de etanol em solução (v/v)			% de etanol em solução (v/v)		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Celulose	48,1 ± 0,5	49,1 ± 1,2	47,2 ± 0,2	73,9 ± 0,8	65,1 ± 0,3	53,0 ± 0,1	79,3 ± 0,7	82,0 ± 0,1	70,8 ± 0,3
Hemicelulose	24,8 ± 0,6	26,4 ± 0,7	26,9 ± 0,1	10,5 ± 0,3	17,9 ± 0,6	22,6 ± 0,1	3,0 ± 0,5	6,7 ± 0,2	14,3 ± 1,2
Lignina Total	21,6 ± 1,1	21,2 ± 0,3	21,0 ± 0,5	14,8 ± 1,5	12,0 ± 1,1	17,7 ± 0,9	11,8 ± 1,3	5,5 ± 0,6	8,8 ± 0,5
Cinzas	2,1 ± 1,0	3,1 ± 0,1	4,1 ± 1,1	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,4	5,3 ± 0,4	5,5 ± 0,1	5,0 ± 0,5	5,9 ± 0,1
Total	96,6 ± 3,2	99,8 ± 2,3	99,7 ± 1,9	101,1 ± 2,7	97,1 ± 2,4	98,6 ± 1,5	99,6 ± 2,6	99,2 ± 1,4	99,8 ± 2,1
Rendimento (%)	80,7	76,8±0,5	82,2	50,7	59,3	72,5	45,9	46,8	54,1

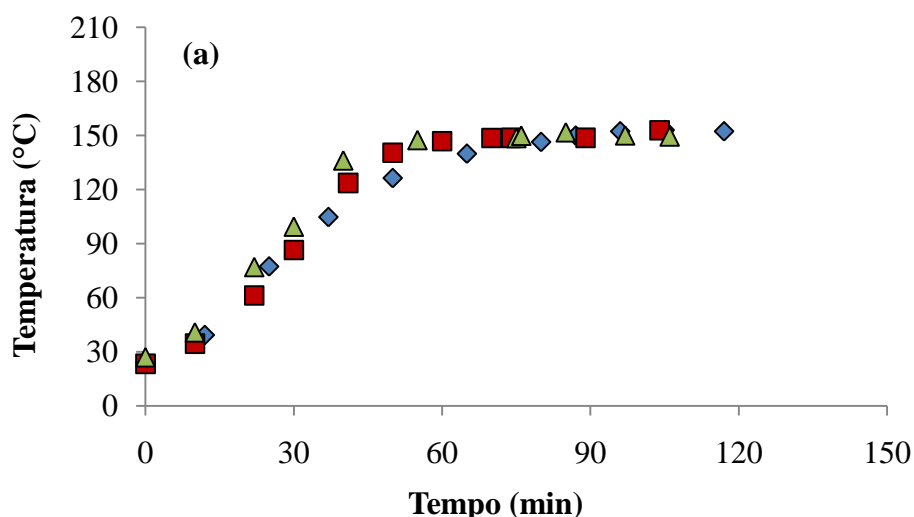
Tabela 4.3 – Valores da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e bagaço pré-tratado corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento.

Componentes (%)	Bagaço de cana <i>in natura</i>	Condições de pré-tratamento organossolve do bagaço de cana								
		150°C/30min			170°C/60min			190°C/90min		
		% etanol em solução (v/v)			% etanol em solução (v/v)			% etanol em solução (v/v)		
		30%	50%	70%	30%	50%	70%	30%	50%	70%
Celulose	38,4 ± 1,4	38,8	37,7	38,8	37,5	38,6	38,4	36,4	38,4	38,3
Hemicelulose	29,4 ± 1,7	20,0	20,3	22,1	5,3	10,6	16,4	1,4	3,1	7,7
Lignina Total	21,7 ± 0,7	17,5	16,2	17,3	7,5	7,1	12,8	5,4	2,6	4,8
Cinzas	5,1 ± 0,4	1,7	2,4	3,4	1,0	1,2	3,8	2,5	2,3	3,2

Um pré-tratamento que pretende separar a celulose das duas outras frações eficientemente deve conduzir à máxima solubilização das duas outras frações, com mínima perda de celulose. Experimentos realizados em condições de tempo e temperatura diferentes, mas com a mesma concentração de etanol (30%, 50% ou 70%) apresentaram rendimentos de pré-tratamento decrescentes em relação ao aumento da severidade, ou seja, condições mais drásticas de temperatura e tempo contribuíram para uma maior solubilização dos sólidos.

Para determinar o grau de severidade de cada pré-tratamento (tabela 4.4), levou-se em consideração não só o tempo estabelecido para cada reação após atingir a temperatura desejada, mas também monitorou-se o tempo das rampas de aquecimento, que variou em média de 80 a 108 min. A figura 4.1 apresenta as rampas de aquecimento para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve, sendo em (a) as reações a 150°C/30min, (b) as reações em 170°C/60min, (c) reações a 190°C/90min, nas concentrações de 30, 50 e 70% de etanol e (d) reação a 190°C/10min/50% de etanol. As rampas de aquecimento para as reações em replicata foram muito reprodutivas, apresentando um desvio padrão ± 7 min. Em relação à pressão atingida durante o pré-tratamento nas diferentes condições de severidade, houve uma variação de 7,5 a 20 bar.

As rampas de aquecimento do reator para os diversos experimentos são mostradas na figura 4.1.



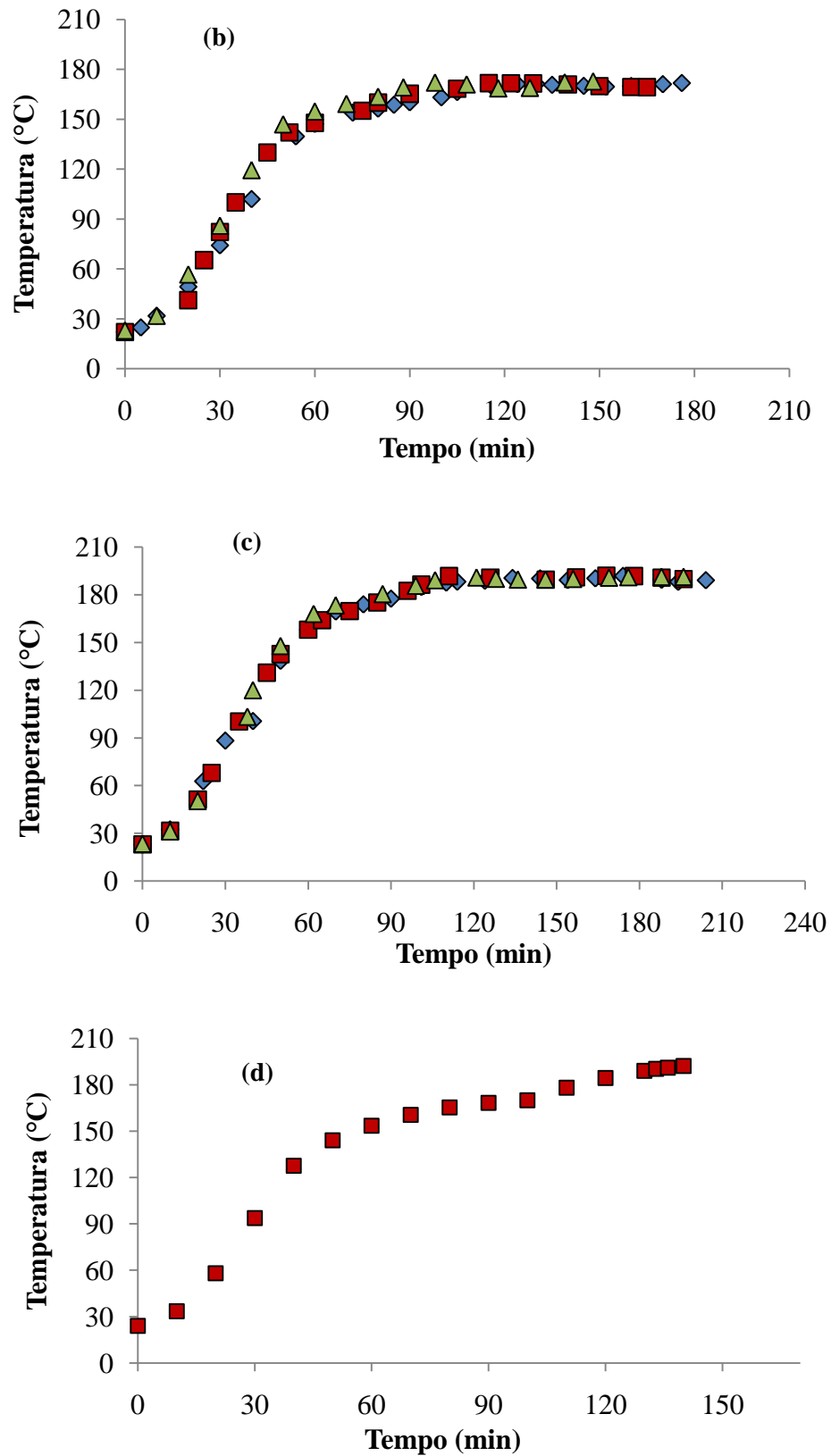


Figura 4.1 – Rampas de aquecimento das reações de pré-tratamento: (a) 150°C/30min; (b) 170°C/60min; (c) 190°C/90min e (d) 190°C/10min, sendo ▲70% de etanol; ■ 50% de etanol e ◆30% de etanol em solução.

A partir das rampas de aquecimento para os diversos experimentos foram calculados os respectivos graus de severidade de acordo com a equação 3.1, os quais são mostrados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Grau de severidade para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

Condições do pré-tratamento	Grau de Severidade
150°C/30min – etanol 30, 50 e 70%	4,2
170°C/60min – etanol 30, 50 e 70%	5,2
190°C/10min – etanol 50%	5,5
190°C/90min – etanol 30, 50 e 70%	5,9

Os graus de severidade calculados por Heitz et al. (1991) no pré-tratamento a vapor para temperaturas de 180°C, variaram de 2,7 a 3,0, sendo portanto menores que os obtidos aqui para temperaturas menores. Isso se deve aos muito menores tempos de reação utilizado por esses autores, de 0,7 a 4 min. Vários outros pesquisadores utilizam o fator de severidade para relacionar o efeito combinado de tempo, temperatura e pH na eficiência dos pré-tratamentos organossolve com uso de catalisador ácido (BROSSE; SANNIGRAHI; RAGAUSKAS, 2009; CHUM; JOHNSON; BLACK, 1990; HAGE et al., 2010).

As fotos apresentadas na figura 4.2 ilustram a aparência do bagaço *in natura* e após as diferentes condições de pré-tratamento em que foi submetido. É possível observar que o bagaço fica mais escuro após pré-tratamento. Isso ocorre devido aos grupos cromóforos formados a partir da lignina residual contida na celulignina.

Além disso, com o aumento da severidade do processo, a estrutura da biomassa mudou drasticamente, com uma maior solubilização dos componentes amorfos, o que pode ser confirmado pelos baixos valores de rendimento mássicos atingidos.

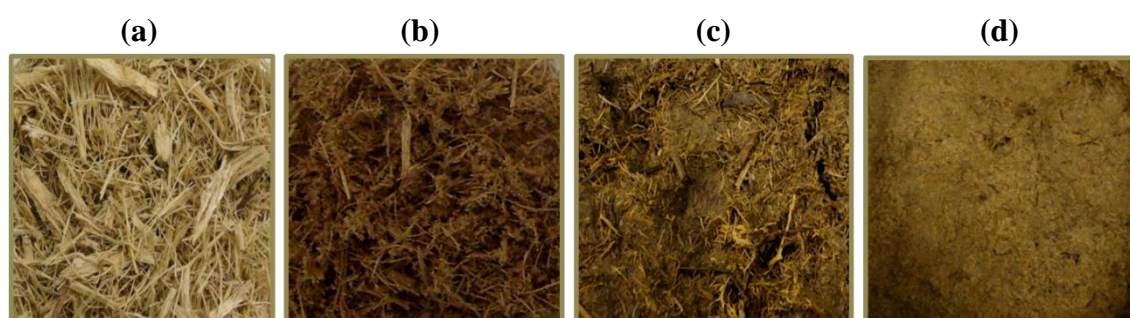
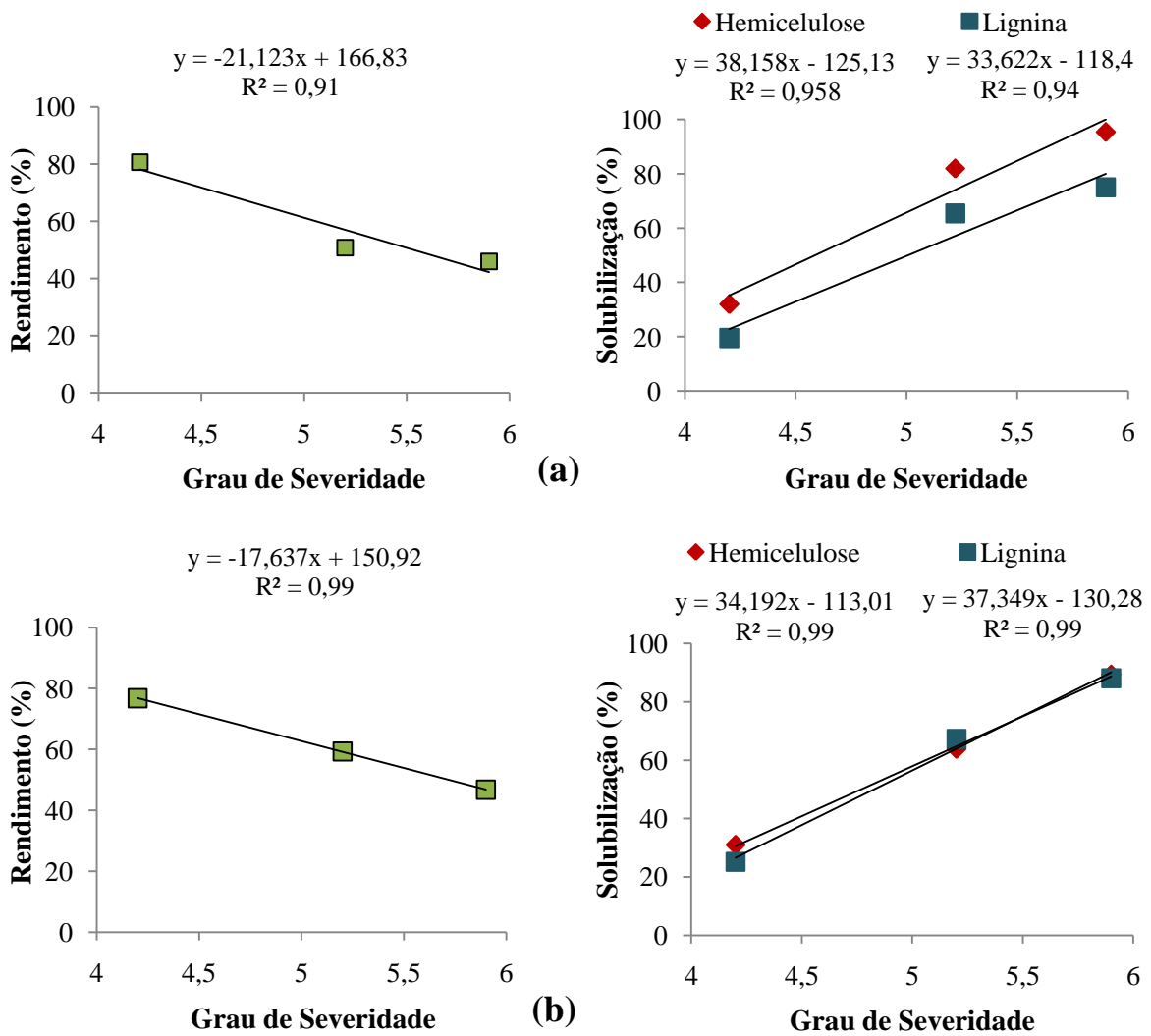


Figura 4.2 – Foto do bagaço de cana *in natura* (a) e pré-tratado nas seguintes condições: 150°C/30min (b), 170°C/60min (c) e 190°C/90min (d).

A figura 4.3 estabelece uma relação linear decrescente entre o rendimento do pré-tratamento e o grau de severidade. Concordantemente, conforme esperado, solubilização de lignina e hemicelulose (as frações mais solúveis no meio utilizado) apresentam uma relação linear crescente. Na condição de 30% de etanol, a concentração de água é mais alta que nas duas outras condições, o que deve explicar a maior solubilização de hemicelulose, que ocorre por hidrólise catalisada pelo ácido formado, e menor de lignina, mais solúvel quanto maior a concentração de etanol no meio. Para as concentrações mais altas de etanol, lignina e hemicelulose mostram solubilidade similares com o aumento do tempo/temperatura do pré-tratamento (cujos efeitos estão combinados e expressados como grau de severidade).



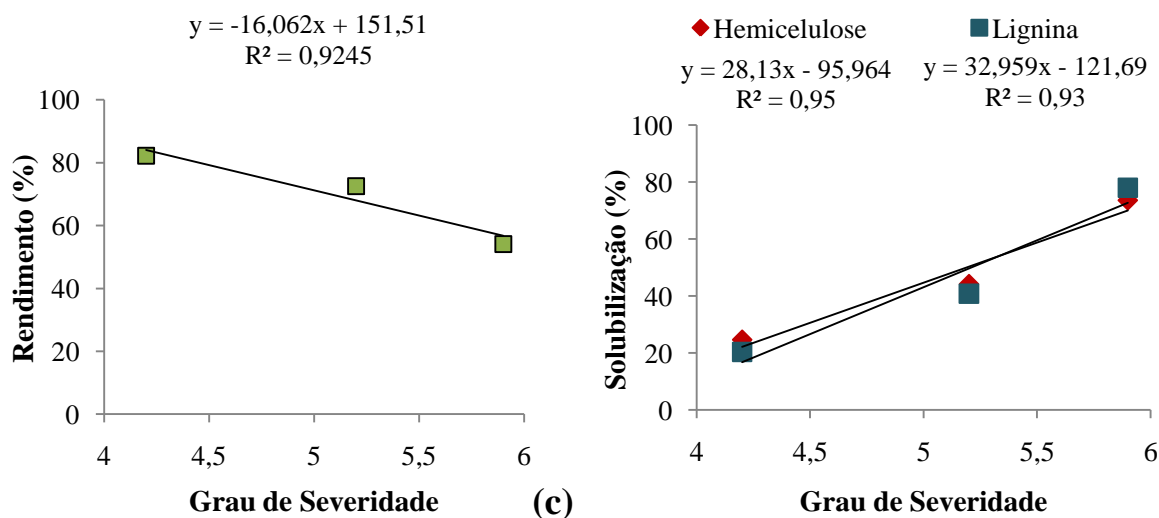


Figura 4.3 – Correlação linear do rendimento e da solubilização de lignina e hemicelulose em função da severidade de pré-tratamento para soluções com 30% (a), 50% (b), e 70% (c), de etanol.

O rendimento das reações de pré-tratamento variou ao longo de um amplo intervalo (45,9% - 82,2%). Isso indica que as condições experimentais selecionadas para as reações de pré-tratamento têm uma influência significativa sobre a solubilização dos componentes do bagaço. As figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentam os valores de solubilização da celulose, hemicelulose e lignina para experimentos com 30%, 50% e 70% de etanol, respectivamente. As solubilizações relativas aos componentes do bagaço foram calculadas de acordo com a equação 3.3.

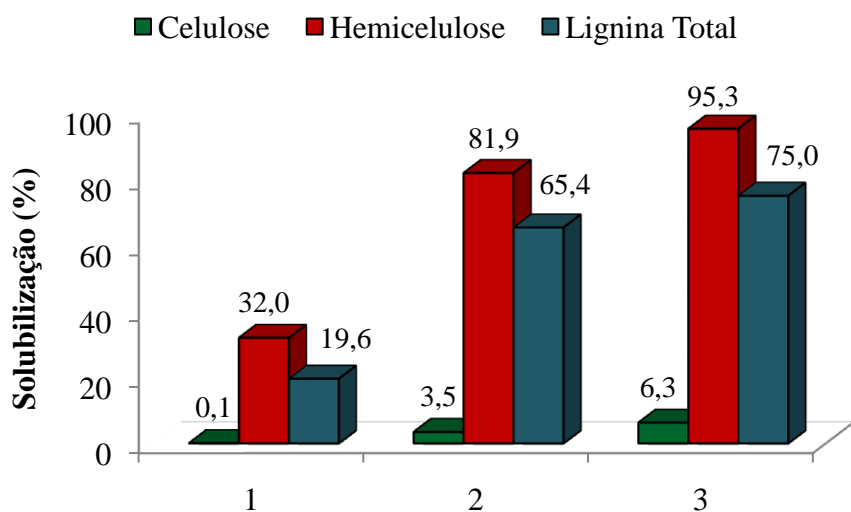


Figura 4.4 – Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 30% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.

Analisando a figura 4.4, nota-se o aumento na solubilização das três frações (celulose, hemicelulose e lignina) com o aumento na severidade do pré-tratamento. Na condição de 190°C por 90 min houve a maior solubilização de carboidratos sendo 95,3% para a hemicelulose e 6,3% para a celulose.

O aumento na solubilização da hemicelulose e da lignina com o aumento da severidade também é observado nas figuras 4.5 e 4.6.

No que se refere à concentração de etanol em solução, é possível correlacionar as figuras 4.4, 4.5 e 4.6 para um mesmo grau de severidade. Observa-se que, com o aumento da concentração de etanol ocorre uma menor solubilização das frações de hemicelulose e celulose, com exceção para a condição de 150°C/30min em que o teor de celulose praticamente manteve-se constante. O pH do licor após pré-tratamento aumentou com o aumento da concentração de etanol (4,2 a 5,2) para reações a 150°C/30min; (3,8 a 4,8) para reações a 170°C/60min e (3,4 a 4,5) para reações a 190°C/90min, constatando que numa menor concentração de etanol houve maior liberação de ácido acético pela desacetilação da hemicelulose. A hipótese mais provável é que devido a altas temperaturas e pressões e com a maior concentração de etanol, ambos devem sofrer maior dissociação iônica, diminuindo os pK_{as} e conseqüentemente o pH da solução, provocando maior solubilização desses componentes. De acordo com Pan et al. (2006) em maiores concentrações de etanol ocorre uma menor atividade química da água suprimindo, provavelmente, a hidrólise de carboidratos.

Já para a fração de lignina, em um mesmo grau de severidade, a maior solubilização ocorreu com 50% de etanol atingindo 25,2% de solubilização a condição de 150°C por 30min; 67,3% para 170°C por 60min e 88,1% para 190°C por 90min. Para Pan et al. (2006), a deslignificação foi máxima com 65% de etanol em solução. Após essa concentração, há uma diminuição na solubilização da lignina, como pôde ser observado nos experimentos realizados com 70% de etanol (figura 4.6).

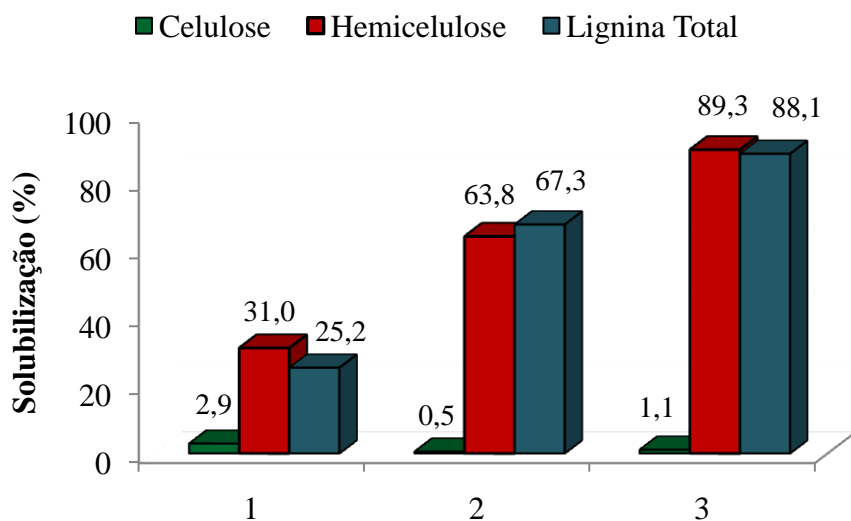


Figura 4.5 – Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 50% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.

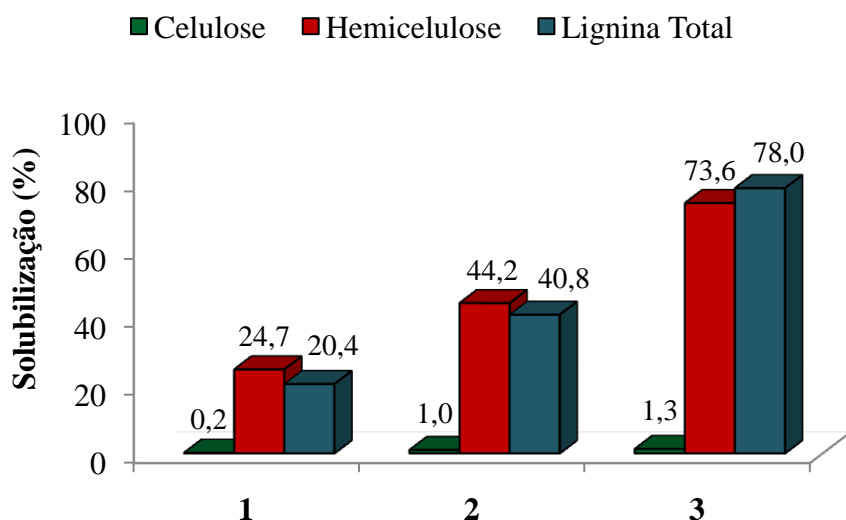


Figura 4.6 – Percentual de celulose, hemicelulose e lignina solubilizadas durante o pré-tratamento organossolve com 70% de etanol a: (1) 150°C/30 min; (2) 170°C/60 min e (3) 190°C/90 min.

O controle de degradação da fração celulósica é um fator muito importante no processo de hidrólise enzimática para produção de etanol. Nessas condições de pré-tratamento organossolve foi possível observar a preservação da fração celulósica, mantendo uma média de solubilização inferior a 2% nas condições de menor grau de severidade (4,2 e 5,2) e uma média de aproximadamente 3% em condições mais severas (5,9).

4.2.2 Efeito do tempo de reação na solubilização dos componentes do bagaço de cana para o pré-tratamento organossolve.

O efeito do tempo na solubilização dos componentes do bagaço também foi investigado (figura 4.7). Para isso foi selecionada a condição de 190°C/50% de etanol que, em 90 min de reação apresentou uma maior solubilização de lignina (88,1%) com menor degradação de celulose (1,1%) e uma solubilização de hemicelulose de 89,3%. Essa condição de pré-tratamento foi realizada por um período de 10 min, apresentando grau de severidade 5,5.

O rendimento mássico do pré-tratamento organossolve para 10 min de reação foi de 47,8%, valor muito próximo ao rendimento obtido quando o tempo de reação foi de 90 min (46,8%). A fração de celulose manteve-se inalterada e a fração de hemicelulose teve uma solubilização 2,4% menor em 10 min de reação, já a fração de lignina teve uma queda de 9,6% na solubilização para essas condições. Com o intuito de otimizar as condições do processo, um aumento de aproximadamente 10% na solubilização de lignina não é um valor significativo, visto que foi preciso 80 min a mais de reação. Tempos longos de pré-tratamento ocasionam em maiores custos no processo e podem levar a um aumento na concentração de produtos de degradação que interferem na hidrólise, inviabilizando o processo (CANETTIERI et al., 2007).

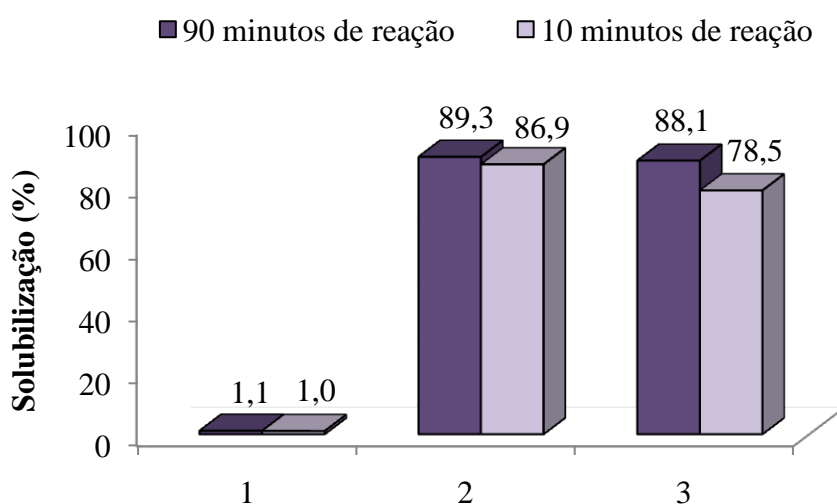


Figura 4.7 – Comparação dos diferentes tempos de reação na solubilização da fração celulósica (1), da fração hemicelulósica (2) e da fração de lignina (3) para a condição de 50% de etanol em solução e temperatura de 190°C.

4.2.3 Efeito do uso de catalisador ácido no pré-tratamento organossolve

Na condição de pré-tratamento a 190°C/10 min/50% etanol foi avaliado o efeito do H₂SO₄ (1% m/m) como catalisador. O rendimento mássico para essa condição foi de 40,4%, valor inferior ao encontrado quando não foi utilizado catalisador (47,8%). O meio ácido levou a uma maior degradação dos polissacarídeos, visto que a hemicelulose teve solubilização quase total, atingindo 99,6%, um aumento de 12% na solubilização se comparada ao pré-tratamento sem uso de catalisador ácido. A lignina teve uma solubilização de 81,8%, o que representa um aumento de 3,3%. A fração celulósica teve solubilização de 12,6%, indicando que o uso de ácido sulfúrico no pré-tratamento degrada parte da celulose, como constatado por Brosse; Sannigrahi e Ragauskas (2009) e Hodge et al. (2008). Segundo Canettieri et al. (2007) a celulose é atacada devido à sua natureza parcialmente cristalina, contendo regiões amorfas mais susceptíveis a hidrólise.

4.2.4 Deslignificação alcalina da celulignina obtida no pré-tratamento organossolve

As condições de maior grau de severidade e, portanto, maior solubilização dos componentes, foram submetidas a uma deslignificação alcalina, visando avaliar a remoção e/ou redistribuição de lignina que poderia estar depositada sobre as fibras de celulose e com isso aumentar a acessibilidade das enzimas na etapa de hidrólise enzimática. Para isso, o bagaço *in natura* foi submetido a um pré-tratamento organossolve nas seguintes condições: temperatura de 190°C por um período de 90 min e uma solução com 30%, 50% e 70% de etanol. Após filtração do licor negro, a fração sólida obtida foi deslignificada com solução de NaOH 1% (m/v) a 100°C por um período de 1 h. A polpa celulósica foi lavada com água destilada até pH neutro. O rendimento da reação foi calculado a partir da massa do bagaço *in natura* e da massa da polpa celulósica após deslignificação alcalina.

Observa-se, na figura 4.8, que o rendimento das reações com 30%, 50% e 70% de etanol foi menor após a etapa de deslignificação alcalina, indicando maior solubilização dos componentes.

A tabela 4.5 apresenta os valores da caracterização química dos componentes após pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina e os valores da caracterização corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento.

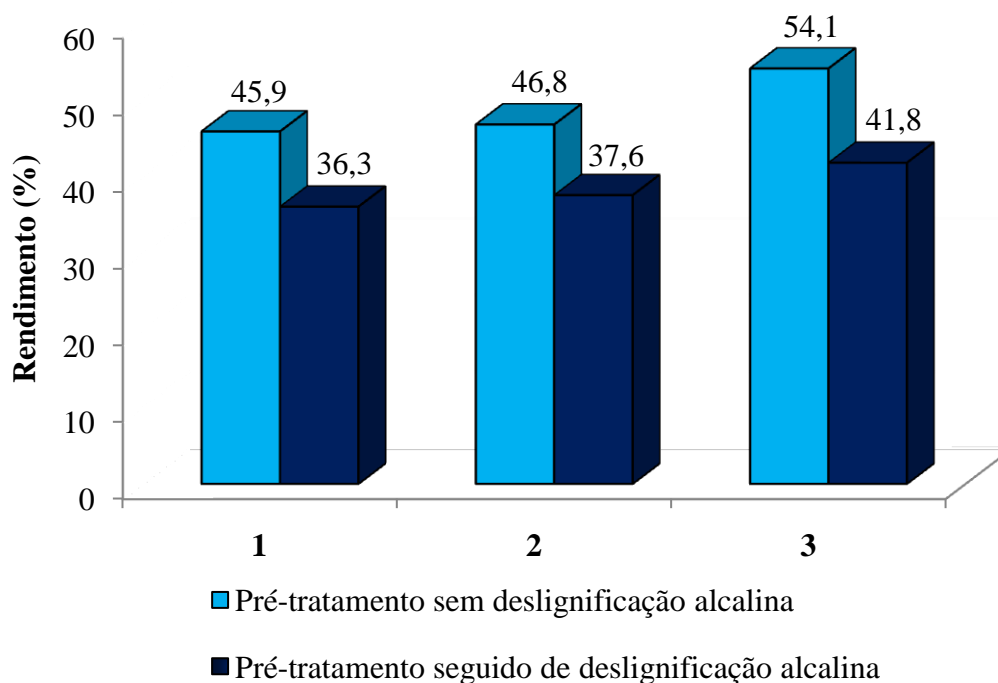


Figura 4.8 – Rendimento do pré-tratamento a 190°C/90min com solução de etanol a 30% (1); 50% (2) e 70% (3) seguidos ou não de deslignificação alcalina.

Tabela 4.5 – Valores da caracterização química do bagaço de cana e corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina.

Pré-tratamento organossolve a 190°C/90min seguido de deslignificação alcalina								
Condições experimentais	Componentes após pré-tratamento							
	Celulose	R*	Hemicelulose	R*	Lignina Total	R*	Cinzas	R*
30% etanol	85,6±0,5	31,1	0,3±0,2	0,1	8,1±1,1	2,9	5,7±0,6	2,1
50% etanol	89,4±1	33,6	0,7±0,4	0,3	2,6±0,6	0,9	7,0±0,9	2,6
70% etanol	83,5±0,7	34,9	5,9±0,3	2,4	4,2±0,5	1,7	6,0±0,5	2,5

R*= valores corrigidos pelo rendimento do pré-tratamento.

Após esta etapa de deslignificação alcalina observa-se que o maior teor de celulose foi obtido com o material pré-tratado com 70% de etanol e o menor teor de

hemicelulose e lignina no sólido foram obtidos para o pré-tratamento com 30% e 50% de etanol, respectivamente.

As perdas no sólido referentes à solubilização dos componentes do bagaço, em relação à concentração de etanol, tiveram comportamento semelhante quando comparadas com pré-tratamento sem a etapa de deslignificação alcalina, ou seja, os carboidratos tiveram maior solubilização em soluções com a menor concentração de etanol e a lignina apresentou máxima solubilização em soluções com 50% de etanol como pode ser observado na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Solubilização dos componentes do bagaço de cana antes e após deslignificação com NaOH nas condições de 190°C/90min a 30, 50 e 70% de etanol.

Componentes	Pré-tratamento Organossolve a 190°C por 90 min					
	30% etanol		50% etanol		70% etanol	
	Pré-tratado	Pré-tratado + deslig.	Pré-tratado	Pré-tratado + deslig.	Pré-tratado	Pré-tratado + deslig.
Celulose	6,3	19,9	1,1	13,4	1,3	10,1
Hemicelulose	95,3	99,6	89,3	99,1	73,6	91,7
Lignina Total	75,0	86,4	88,1	95,5	78,0	91,9

Pré-tratado + deslig = pré-tratado organossolve seguido do processo de deslignificação alcalina

A solubilização máxima de lignina e hemicelulose após etapa de deslignificação alcalina foi de 95,5% e 99,6%, respectivamente. A fração de celulose apresentou um aumento significativo na solubilização quando comparada a etapa sem pré-tratamento. A solubilização foi de 20%, 13,4% e 10% para pré-tratamentos utilizando 30%, 50% e 70% de etanol, respectivamente. Mesa et al. (2010) utilizando NaOH como catalisador no pré-tratamento organossolve de bagaço de cana também encontrou perdas de glicose superiores a 10% (11 a 29%).

Segundo Gierer (1985) a lignina é despolimerizada e solubilizada, no licor alcalino de extração, pelo ataque nucleofílico (OH^- do álcali) às ligações α e β aril éter. No entanto, os carboidratos (hemicelulose e celulose) também são atacados e dissolvidos em alguma extensão (KLOCK, 2010).

Além da hidrólise alcalina, os polissacarídeos, incluindo a celulose, são susceptíveis a reações de “peeling”. Essas reações têm início no terminal redutor do carboidrato, assim, diminuem o grau de polimerização dos polissacarídeos e solubilizam compostos no licor de cozimento. Esses carboidratos removidos são convertidos em diversos

ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali no licor de cozimento. (FENGEL; WEGENER, 1989; KNILL; KENNEDY, 2003).

A figura 4.9 mostra um clareamento na coloração do bagaço submetido à deslignificação com solução de NaOH, evidenciando o efeito dessa etapa na solubilização de lignina e/ou de compostos cromóforos (quinonas, ácidos carboxílicos, grupos carbonila, entre outros) provenientes dos fragmentos de baixa massa molar da própria lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).



Figura 4.9 – Fotos do bagaço de cana após pré-tratamento organossolve a 190°C/90min variando a concentração de etanol em solução: (a) 30%; (b) 50% e (c) 70% e bagaço de cana pré-tratado seguido de deslignificação com NaOH (1% m/v) 100°C/1h.

Em relação ao tempo de reação, o bagaço pré-tratado nas condições de 190°C/10min/50%, também foi submetido a uma deslignificação alcalina. A solubilização dos componentes para a biomassa pré-tratada a 90 min e 10 min de reação seguidos de deslignificação alcalina foi bastante próxima a obtida quando comparou-se esses tempos de pré-tratamento sem a etapa de deslignificação alcalina, ou seja, houve uma solubilização 2% menor para hemicelulose e aproximadamente 10% menor para a lignina quando o tempo foi

de 10 min, sendo que a fração de celulose manteve-se praticamente inalterada nos dois tempos estudados (figura 4.10). A partir desses valores, observa-se que a variável tempo não influencia na solubilização dos componentes tanto quanto a temperatura, como concluído anteriormente.

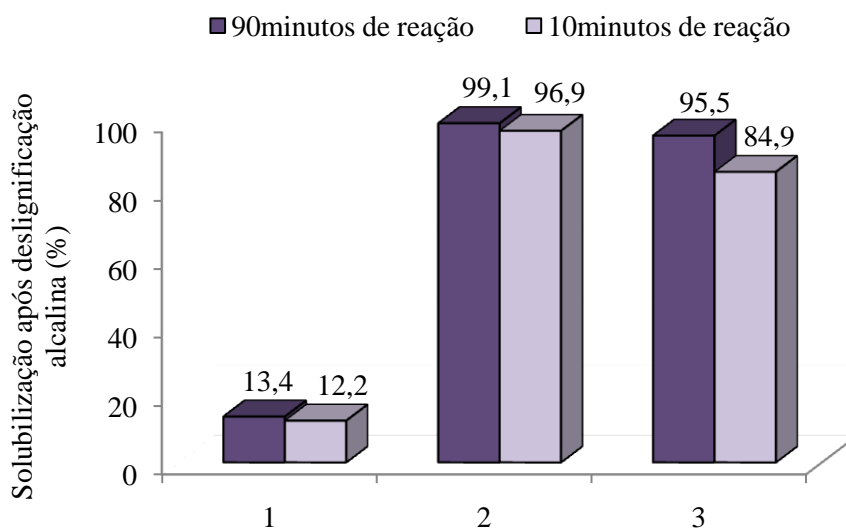


Figura 4.10 – Comparação dos diferentes tempos de reação na solubilização da fração celulósica (1), da fração hemicelulósica (2) e da fração de lignina (3) para a condição de pré-tratamento organossolve de 50% de etanol em solução e temperatura de 190°C seguido de deslignificação alcalina.

Para estudo comparativo entre os processos de pré-tratamento organossolve (190°C/10min/50% etanol), pré-tratamento organossolve com uso de catalisador ácido e pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina, analisou-se também o bagaço pré-tratado catalisado com ácido e seguido de deslignificação alcalina.

Visando uma melhor comparação entre os resultados estudados para os pré-tratamentos realizados a 190°C/10min/50% etanol, a tabela 4.7 mostra a composição das frações após caracterização do material pré-tratado e seus respectivos rendimentos e a figura 4.11 mostra a solubilização durante os pré-tratamentos para cada componente.

Tabela 4.7 – Rendimento mássico e composição (% \pm desvio padrão) do material pré-tratado sob diferentes condições.

Experimentos	Rendimento	Caracterização após pré-tratamento		
		Celulose	Hemicelulose	Lignina
Pré-tratado	47,8	80,5 \pm 0,4	8,1 \pm 0,2	9,75 \pm 1,3
Pré-tratado e catalisado com H ₂ SO ₄ 1% (m/m)	40,4	84,0 \pm 0,7	0,3 \pm 0,1	9,75 \pm 0,5
Pré-tratado e deslignificado com NaOH 1% (m/v)	42,8	79,7 \pm 1,1	2,2 \pm 0,3	7,6 \pm 0,3
Pré-tratado; catalisado com H ₂ SO ₄ 1% (m/m) e deslignificado com NaOH 1% (m/v)	30,4	84,2 \pm 0,2	0,15 \pm 0,1	6,2 \pm 1,5

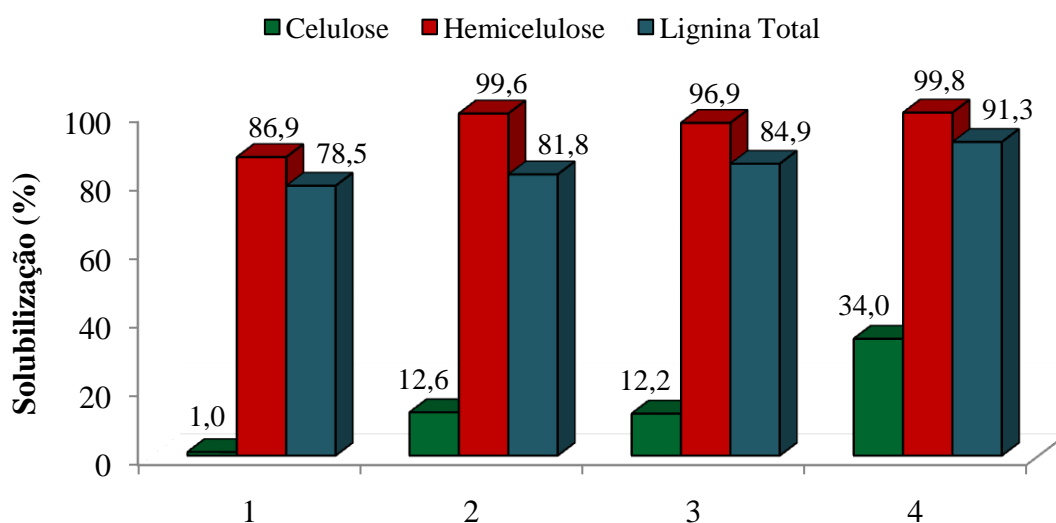


Figura 4.11 - Solubilização dos componentes do bagaço pré-tratado a 190°C/10min/50% etanol (1), pré-tratado com uso de catalisador ácido (2), pré-tratado e deslignificado com NaOH (3) e pré-tratado com catalisador ácido e deslignificado com NaOH (4).

A celulose foi preservada apenas durante o pré-tratamento organossolve (1). Com uso do catalisador durante o pré-tratamento (2) e com o pré-tratamento seguido de deslignificação (3), houve uma perda de 12% dessa fração indicando que tratamentos ácidos e básicos não são seletivos para solubilização apenas de hemicelulose e lignina, respectivamente. Quando se aplicou a deslignificação alcalina ao bagaço pré-tratado com uso de catalisador ácido, foi observada uma perda de 34% da celulose.

A hemicelulose foi a fração mais solubilizada nas condições de pré-tratamento estudadas (figura 4.11). De acordo com Hamelinck; Van Hooijdonk e Faaij (2005), a hemicelulose consiste em uma cadeia curta altamente ramificada e, devido a sua ramificação e natureza amorfa é relativamente fácil de hidrolisar. Na figura 4.11, observa-se que com o uso do catalisador ácido no pré-tratamento (2) foi possível um aumento de aproximadamente 13% na sua solubilização, mesmo valor obtido quando foi utilizado catalisador durante o pré-tratamento seguido de deslignificação alcalina (4), solubilizando quase completamente a hemicelulose. Com a deslignificação alcalina após pré-tratamento (3), sua solubilização aumentou em 10%.

No caso da lignina, sua solubilização foi crescente desde o pré-tratamento sem catalisador (1), do uso de catalisador ácido (2), da deslignificação alcalina após pré-tratamento (3) e do uso combinado dessas condições (4) com uma solubilização máxima de 91,3% para as condições avaliadas.

4.3 Hidrólise Enzimática do bagaço de cana

As frações sólidas provenientes do pré-tratamento organossolve em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de etanol na solução, do pré-tratamento com uso de catalisador ácido e do pré-tratamento seguido de deslignificação alcalina foram submetidas à hidrólise enzimática e analisadas quanto à sua conversão de celulose em glicose. A atividade celulósica total da enzima utilizada para a realização das hidrólises (Accellerase 1500) foi de 108 FPU/mL.

4.3.1 Hidrólise Enzimática do bagaço submetido a diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

A celulignina, após pré-tratamento organossolve, foi submetida à primeira condição testada de hidrólise enzimática monitorada por 42 h, conforme descrito no item 3.7, (20 FPU/g celulose da enzima Accellerase 1500, relação sólido (celulose):líquido 1:10 (m/v),

a 200 rpm e 50°C). A conversão enzimática em 42 h apresentou-se baixa para todas as amostras de bagaço pré-tratado (tabela 4.8), tendo rendimento máximo de 37% para a amostra de bagaço pré-tratado na condição de 190°C por 90min e concentração de 50% de etanol em solução.

Tabela 4.8 – Concentração de glicose (g/L) e conversão enzimática de celulose em glicose (%) em 42 h da primeira condição de hidrólise da fração sólida avaliada para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

Condições de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão enzimática (%) em 42h
150°C/30min/etanol 30%	15,6	14,1
150°C/30min/etanol 50%	19,9 ± 3,3	18,0
150°C/30min/etanol 70%	15,4	13,9
170°C/60min/etanol30%	21,6	19,4
170°C/60min/etanol50%	13,5	12,2
170°C/60min/etanol70%	10,5	9,5
190°C/90min/etanol30%	28,1	25,3
190°C/90min/etanol50%	40,6	36,6
190°C/90min/etanol70%	18,4	16,5

Nessa primeira condição de hidrólise avaliada, o material lignocelulósico não foi completamente homogeneizado durante a hidrólise devido à alta carga de sólido (14% a 26%). Além disso, não foi possível uma comparação entre as amostras, já que estas tinham diferentes cargas de sólidos para manter fixa a relação sólido (celulose):líquido de 1:10 (m/v). A maior conversão enzimática (36,6%) ocorreu com a menor carga de sólido (14%), indicando a necessidade de diminuir a quantidade de bagaço no meio. O perfil de hidrólise enzimática mostrava-se ainda crescente em 42 h para todas as condições testadas, evidenciando necessidade de um maior tempo de hidrólise. A figura 4.12 mostra o perfil da hidrólise em função do tempo para a amostra que obteve máxima concentração de glicose no hidrolisado. Os perfis de hidrólise enzimática (concentração de glicose no hidrolisado em função do tempo) para essa primeira condição de hidrólise avaliada nas diferentes condições de pré-tratamento encontram-se no apêndice B.

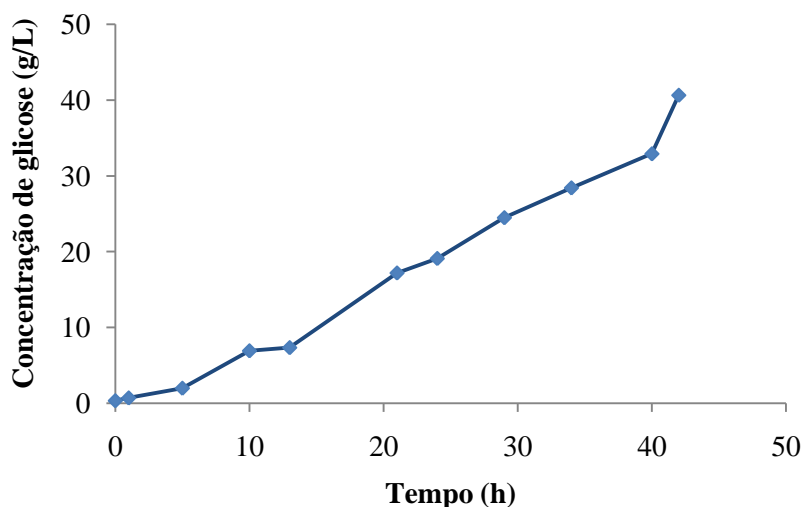


Figura 4.12 – Concentração de glicose no hidrolisado (g/L) em função do tempo de hidrólise para bagaço pré-tratado nas condições de 190°C por 90 min a 50% de etanol.

Uma segunda etapa de hidrólise enzimática foi realizada para as amostras de bagaço pré-tratado e *in natura*, com carga enzimática de 20 FPU/g de material lignocelulósico, relação sólido (material lignocelulósico):líquido 1:10 (m/v) e um volume de 30 mL de tampão. O material foi seco em temperatura ambiente até aproximadamente 20% de umidade e em seguida foi moído a 1,5 mm. Dados ainda não publicados (Oliveira B., 2010) indicam que a diminuição por moagem do tamanho da polpa para baixo de 0,5 mm conduz a um aumento na taxa de hidrólise devido a um aumento na área superficial disponível ao ataque enzimático, enquanto que para fibras com granulometria acima de 0,5 mm não se observou mudanças na conversão enzimática para o mesmo tempo de hidrólise estudado. Neste trabalho, a moagem realizada visou apenas facilitar a homogeneização do tampão contendo a enzima sobre o material pré-tratado, sem a intenção de modificar a estrutura da fibra para uma maior acessibilidade aos sítios disponíveis à adsorção das enzimas, já que o intuito era avaliar o efeito das diferentes condições de pré-tratamento na conversão enzimática.

A hidrólise enzimática foi monitorada por 72 h. A conversão enzimática aumentou consideravelmente como pode ser observado na tabela 4.8, atingindo um máximo de 58,5% na mesma condição de 190°C por 90 min com 50% de etanol.

Comparando o mesmo tempo de 42 h para as duas condições de hidrólise realizadas, é possível observar um aumento de até, 29% na conversão enzimática.

Tabela 4.9 – Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado em 72h e conversão enzimática (%) em 42 h e 72 h da segunda condição de hidrólise da fração sólida avaliada para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

Bagaço de cana-de-açúcar	Condições do pré-tratamento	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão enzimática (%) em 42h	Conversão enzimática (%) em 72h
<i>In natura</i>		7,5	17,5	17,5
	150°C/30min/etanol 30%	14,5	29,6	29,8
	150°C/30min/etanol 50%	12,6 ± 0,6	25,8	27,3
	150°C/30min/etanol 70%	11,5	24,9	25,5
Pré-tratado	170°C/60min/etanol 30%	30,9	36,7	41,0
	170°C/60min/etanol 50%	27,0	36,5	43,6
	170°C/60min/etanol 70%	18,7	36,2	35,5
	190°C/90min/etanol 30%	40,2	40,6	51,7
	190°C/90min/etanol 50%	49,1	52,0	58,5
	190°C/90min/etanol 70%	38,5	45,7	54,0

Correlacionando as solubilizações de lignina e hemicelulose em cada condição de pré-tratamento a que foi submetida à hidrólise, observa-se na figura 4.13 que a conversão enzimática foi limitada pela lignina e hemicelulose residuais.

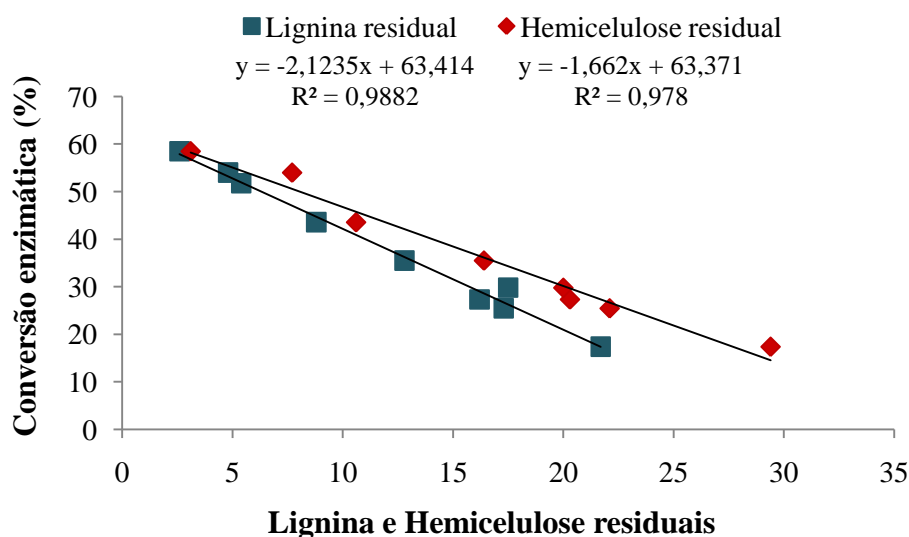


Figura 4.13 – Comportamento da hidrólise enzimática em relação às diferentes quantidades de lignina e hemicelulose presentes no bagaço de cana sob diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

Vários fatores podem influenciar a hidrólise enzimática de lignocelulósicos. A presença de lignina no material lignocelulósico é um dos principais obstáculos, pois forma uma barreira que impede as celulases de acessar a celulose (impedimento estérico), além de interações hidrofóbicas não específicas (adsorção) entre a lignina e o domínio de ligação da enzima à celulose (JØRGENSES; KRISTENSEN; FELBY, 2007). Essa barreira física ao redor do material celulósico, que diminui a afinidade da enzima pela celulose, deve-se também às hemiceluloses residuais, ligadas ou não à lignina (SHEVCHENKO; BEATSON; SADDLER, 1999).

As figuras 4.14, 4.15 e 4.16 mostram os perfis de hidrólise para amostras com grau de severidade 4,2; 5,2 e 5,9, respectivamente. Observou-se que, a partir de 24 h de hidrólise, a conversão enzimática é praticamente estabilizada para amostras cujos pré-tratamentos foram realizados sob condições mais brandas (figura 4.14), resultando em um maior teor de lignina e hemicelulose residuais (tabela 4.3) e uma menor conversão enzimática (aproximadamente 25%).

Esse efeito deve-se, possivelmente, ao impedimento estérico durante a hidrólise enzimática devido à lignina e hemicelulose residuais.

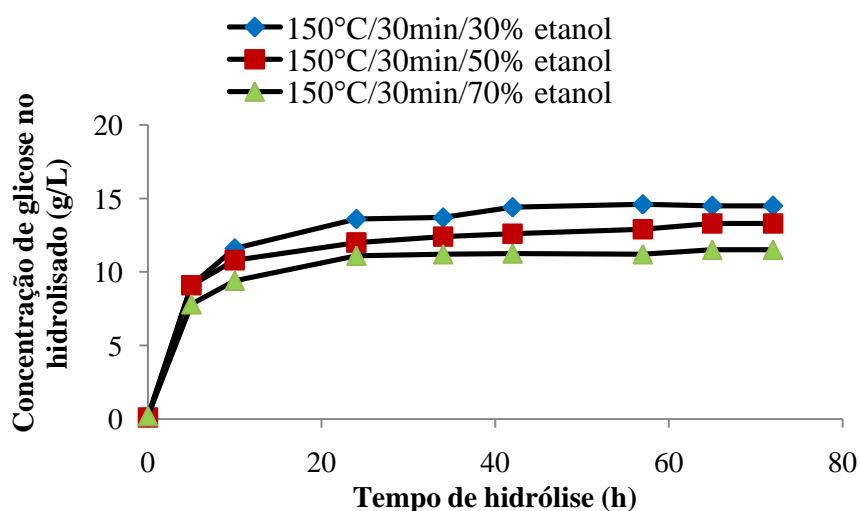


Figura 4.14 – Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 4,2.

Para amostras com grau de severidade 5,2, é possível observar, a partir de 24 h de conversão, um aumento na concentração de glicose de até 6g/L atingindo uma conversão enzimática em torno de 40%. A percentagem de lignina e hemicelulose residuais chegam a atingir até 12,8% e 16,4%, respectivamente.

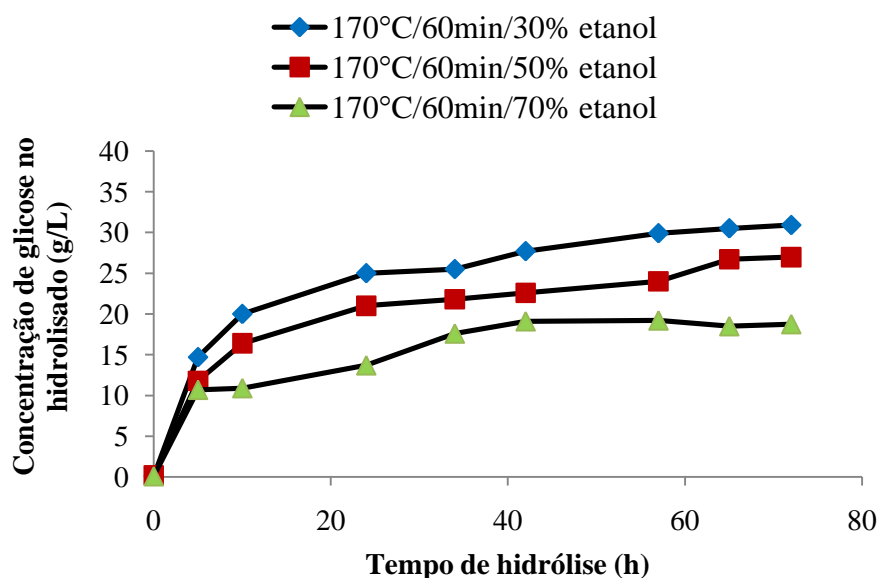


Figura 4.15 – Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 5,2.

No entanto, amostras com maior grau de severidade (5,9) apresentaram um acréscimo de até 15g/L de glicose após 24 h de hidrólise, atingindo uma média de 55% na conversão enzimática em 72 h. Essas amostras apresentaram menor teor de lignina e hemicelulose residuais e, portanto, menor efeito estérico, apresentando um perfil ainda crescente para o tempo de hidrólise estudado, como pode ser observado na figura 4.16.

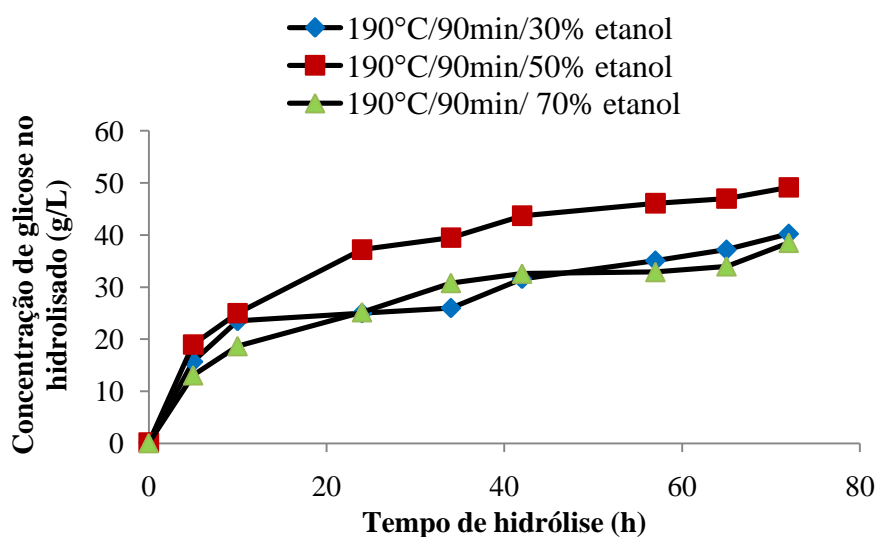


Figura 4.16 – Concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para pré-tratados com grau de severidade 5,9.

As maiores conversões de celulose em glicose foram obtidas em condições mais severas de pré-tratamento e, conseqüentemente, menor teor de lignina residual, ou seja, a maior conversão enzimática (58,5%) ocorreu na amostra com um teor de 2,6% de lignina residual e 3% de hemicelulose. Comparando a conversão enzimática e teor de lignina residual com outros trabalhos, os resultados parecem ser contraditórios, visto que Silva (2009), com o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana, obteve uma conversão de 69% com um teor de lignina residual de 14% e mesmo teor de hemicelulose, se comparado a este trabalho.

No entanto, estudos recentes indicam que mais importante do que remover lignina é o aumento da acessibilidade à celulose, sugerindo que mesmo uma menor quantidade de lignina residual pode causar um grande efeito negativo caso esteja distribuída de forma homogênea sob a superfície da celulose. Já amostras com maior quantidade de lignina podem apresentar melhores resultados de hidrólise caso a lignina esteja de forma aglomerada, permitindo maior acesso da enzima à celulose (ROLLIN et al., 2011).

4.3.2 Hidrólise Enzimática do bagaço pré-tratado em diferentes condições seguido de deslignificação alcalina.

Os bagaços pré-tratados com maior grau de severidade, apesar de apresentarem teor de lignina e hemicelulose relativamente baixos, foram submetidos a mais uma etapa de deslignificação, agora com solução alcalina diluída, com o intuito não apenas de remover esses resíduos, visto que é um parâmetro importante, mas de obter uma reorganização destes, de forma que melhore a área superficial acessível à celulose. Para avaliar o efeito da deslignificação alcalina na conversão enzimática da celulose, as amostras foram submetidas à hidrólise enzimática nas mesmas condições da segunda etapa (tabela 4.10).

Tabela 4.10 – Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado e conversão enzimática (%) em 72 h de hidrólise para as condições de maior grau de severidade do pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina.

Bagaço de cana-de-açúcar	Condições do pré-tratamento	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão enzimática (%) em 72h
<i>in natura</i>	-	7,5	17,5
Pré-tratado organossolve	190°C/90min/etanol 30%	51,8	62,1
+ deslignificação alcalina	190°C/90min/etanol 50%	61,6	73,3
	190°C/90min/etanol 70%	60,3	77,6

As amostras hidrolisadas atingiram conversão enzimática acima de 60%. A amostra pré-tratada a 190°C por 90 min com 70% de etanol e deslignificada com solução alcalina obteve a maior conversão enzimática (77,6%) com uma concentração de glicose de 60,3 g/L no hidrolisado. Se comparado a hidrólise do bagaço sem nenhum pré-tratamento, o aumento na concentração de glicose no hidrolisado foi de 87,6%.

Como pode ser observado na figura 4.17, em relação ao bagaço pré-tratado com 70% de etanol em solução e sem a etapa de deslignificação, houve um aumento de 36% na concentração de glicose. Para o bagaço pré-tratado com 50% de solução de etanol e pré-tratado com 30% de solução de etanol, o aumento na concentração de glicose foi de 20% e 22%, respectivamente. Esses dados mostram que a etapa de deslignificação alcalina aumentou consideravelmente a eficiência da hidrólise enzimática. Essa eficiência após deslignificação alcalina também foi obtida por Silva (2009) e Oliveira F. (2010).

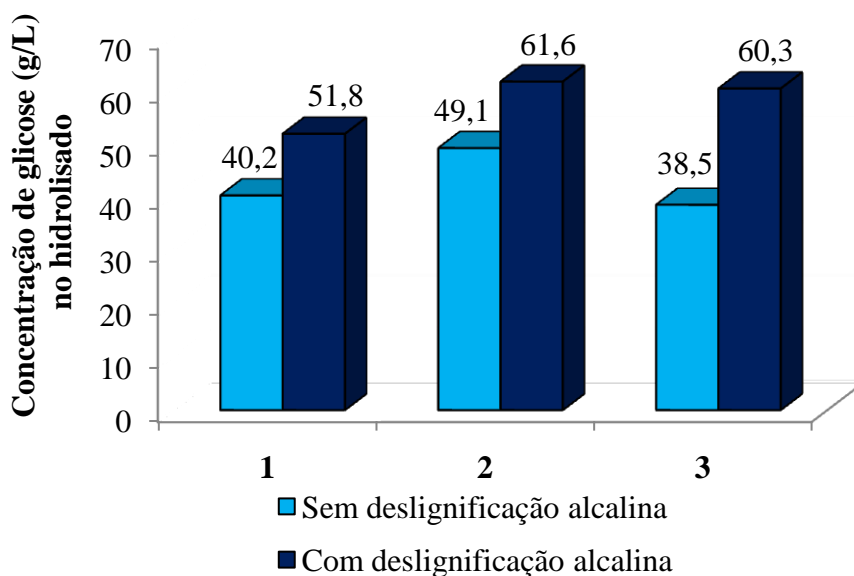
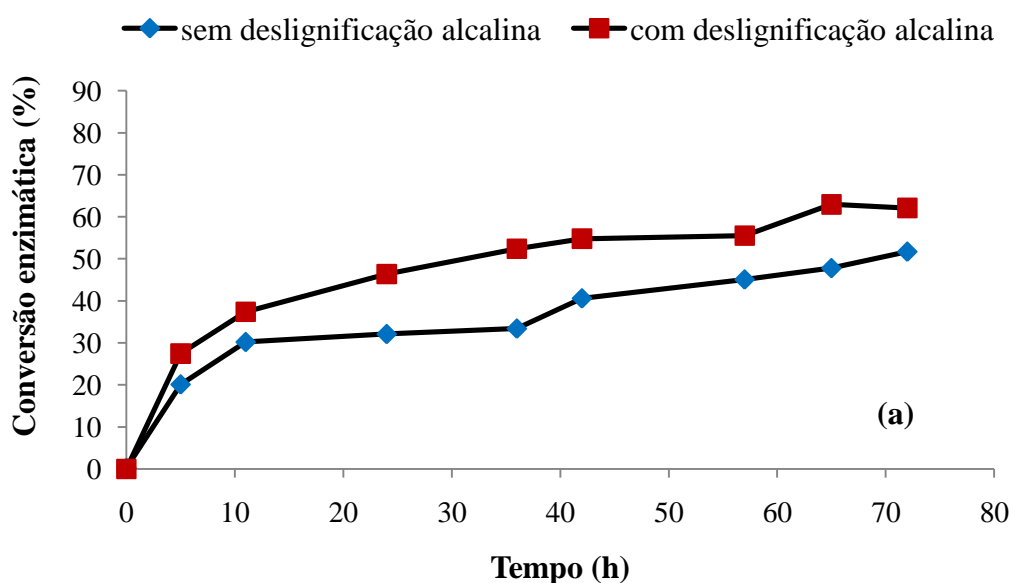


Figura 4.17 – Comparação entre os pré-tratamentos com e sem deslignificação alcalina em relação à concentração de glicose (g/L) obtida no hidrolisado nas seguintes condições de pré-tratamento: 190°C/90min e concentração de etanol 30% (1); 50% (2), 70% (3).

O perfil cinético das hidrólises até 72 h para as amostras pré-tratadas a 190°C por 90 min em diferentes concentrações de etanol e pré-tratadas seguidas de deslignificação alcalina é mostrado na figura 4.18, sendo possível observar que o aumento na taxa de conversão enzimática ocorreu desde os primeiros tempos de hidrólise.



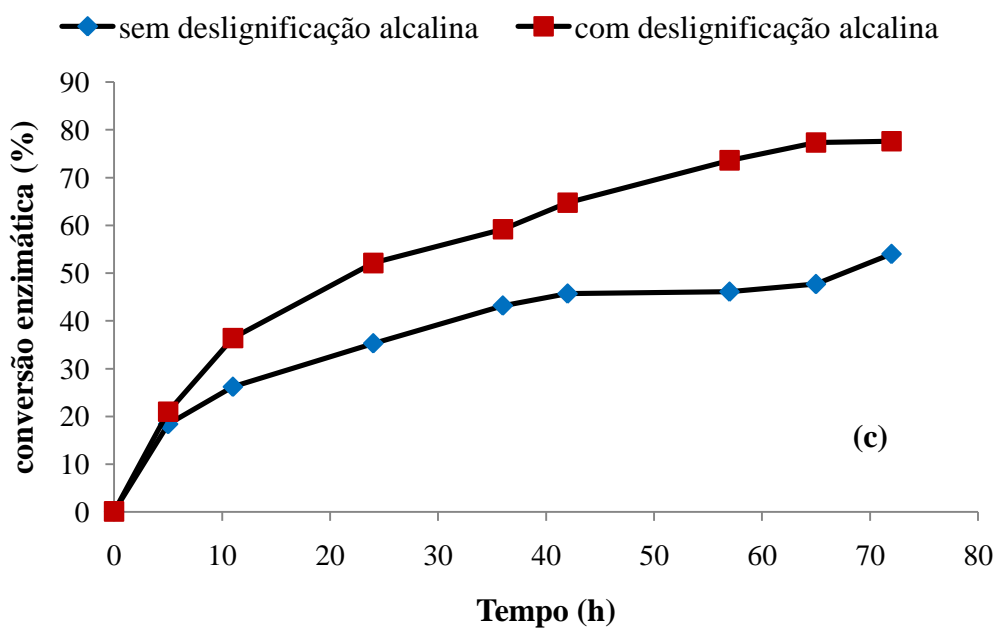
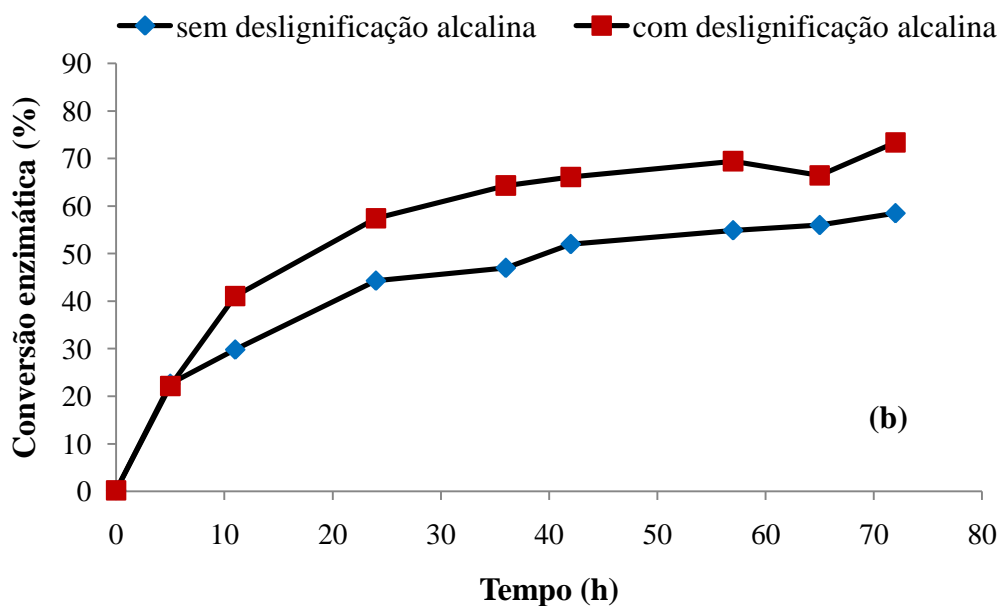


Figura 4.18 – Perfis da conversão enzimática (%) em relação ao tempo de hidrólise para amostras pré-tratadas com e sem a etapa de deslignificação nas condições de 190°C por 90 min e 30% de etanol (a), 50% de etanol (b) e 70% de etanol (c).

Não foi possível estabelecer uma correlação linear entre a solubilização de lignina e hemicelulose e a conversão enzimática na etapa em que ocorreu deslignificação alcalina.

Amostras pré-tratadas a 190°C/10min/50% etanol, com e sem uso de catalisador ácido, também foram deslignificadas com solução alcalina para analisar os efeitos

na hidrólise enzimática em relação ao catalisador ácido e a deslignificação alcalina, sendo os resultados apresentados na tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado e conversão enzimática (%) após 72 h para bagaço pré-tratado a 190°C/10min/50% etanol com e sem deslignificação alcalina e catalisador.

Condições do pré-tratamento organossolve: 190°C/10min/50% etanol		
Bagaço de cana-de-açúcar	Concentração de glicose (g/L) no hidrolisado	Conversão enzimática (%) em 72 h
<i>In natura</i>	7,5	17,4
Pré-tratado	43,6	61,2
Pré-tratado e catalisado com H ₂ SO ₄ 1% (m/m)	52,2	62,7
Pré-tratado e deslignificado com NaOH 1% (m/v)	62,2	88,2
Pré-tratado; catalisado com H ₂ SO ₄ 1% (m/m) e deslignificado com NaOH 1% (m/v)	66,4	79,0

A amostra submetida apenas ao pré-tratamento organossolve obteve, após 72h, uma conversão enzimática de 61,2%, sendo que ao ser submetida à deslignificação alcalina, atingiu 88,2% de conversão, ou seja, um aumento de 27% na hidrólise enzimática. A conversão enzimática da celulose para o bagaço pré-tratado por 10 min sem a etapa de deslignificação alcalina foi ligeiramente superior ao encontrado quando o bagaço foi pré-tratado por 90 min (58,5%). No entanto, quando a amostra pré-tratada por 10 min foi deslignificada com NaOH, obteve-se valor bem superior ao encontrado quando amostras pré-tratadas por 90 min foram deslignificadas (73,3%). Nota-se, portanto, que em todos os casos a deslignificação contribuiu com a maior conversão enzimática da celulose.

O catalisador ácido foi utilizado com a finalidade de tentar redistribuir a lignina na biomassa pelo efeito de condensação, tornando mais acessível a celulose ao ataque enzimático, no entanto, o pré-tratamento não teve efeito significativo na hidrólise enzimática, quando comparado a amostra pré-tratada sem catalisador, apresentando uma conversão de 62,7%. A amostra que foi pré-tratada com uso de catalisador e seguiu deslignificação alcalina obteve 79% de conversão enzimática, valor inferior ao obtido quando a amostra pré-tratada sem uso de catalisador ácido foi deslignificada com NaOH (88,2%). Esse resultado pode ser explicado devido, provavelmente, ao resíduo de ácido sulfúrico retido na lignina e liberado gradualmente na solução hidrolítica.

Nesses experimentos realizados em 10 min de reação a 190°C e 50% de etanol, com e sem uso de catalisador e seguidos ou não de deslignificação alcalina, também não foi possível obter uma correlação linear entre a conversão enzimática da celulose e lignina residual, como pode ser visto na tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Comparação entre a conversão enzimática (%) e o teor de lignina residual (%) nas amostras pré-tratadas em diferentes condições.

Pré-tratamento organossolve a 190°C e 50% de etanol	Conversão enzimática (%)	Lignina residual (%)
Pré-tratamento (90min)	58,5	2,6
Pré-trat (90min) + Deslignificação alcalina	73,3	0,97
Pré-tratamento (10min)	61,2	4,7
Pré-trat (10min) + Catalisador	62,7	3,9
Pré-trat (10min) + Deslignificação alcalina	88,2	3,3
Pré-trat (10min)+Catalisador+deslignificação alcalina	79,0	1,9

Grande parte dos resultados reportados na literatura mostra que a conversão enzimática aumenta com a remoção desses resíduos, sendo lignina a mais citada (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; LIU; WYMAN, 2003; OHGREN et al., 2007). No entanto, outros trabalhos têm mostrado que a conversão enzimática da celulose não é diretamente proporcional a remoção de lignina, obtendo resultados de hidrólise muito diferentes em amostras que possuem valores similares de lignina residual ou a mesma conversão enzimática em amostras com teor de lignina diferentes, ou ainda, trabalhos que fazem essa comparação entre pré-tratamentos diferentes (PAN et al., 2005; PAN et al.; 2007; HALLAC et al., 2010; ROLLIN et al., 2011).

4.4 Análises morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura do bagaço *in natura* e pré-tratado em diferentes condições.

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas em todas as amostras de bagaço submetidas ao pré-tratamento organossolve com o intuito de evidenciar modificações na morfologia do bagaço submetido a diferentes condições de pré-tratamento.

Amostras de bagaço *in natura*, bagaço pré-tratado com e sem o uso de catalisador, bagaço pré-tratado seguido ou não de deslignificação alcalina foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a fim de avaliar a diferença entre suas morfologias.

As micrografias do bagaço *in natura* (figura 4.19) mostram uma estrutura bastante fibrosa, recoberta por flocos de medula (células de parênquima).

Após etapa de pré-tratamento, observa-se que com o aumento da severidade (figura 4.20 A, B, C) as fibras ficaram mais limpas e lisas. Em (A), o pré-tratamento removeu grande quantidade de substâncias e flocos de medula, porém manteve as fibras agrupadas sem desempacotá-las. Em (B), o pré-tratamento promoveu uma fragmentação na estrutura, com fibras mais lisas. Já em (C), o pré-tratamento permitiu uma maior abertura dos tecidos vegetais, tornando as fibras de celulose mais expostas à ação das enzimas.

As micrografias do pré-tratamento organossolve sem (D) e com (E) a etapa de deslignificação alcalina (figura 4.21) não permitiram observar as alterações na estrutura fibrilar após deslignificação alcalina, apresentando-se praticamente inalterada.

Com o uso de catalisador ácido (figura 4.22 F, G) aparentemente houve um maior ataque às fibras de celulose, apresentando fibras fragmentadas com partículas de menor tamanho.

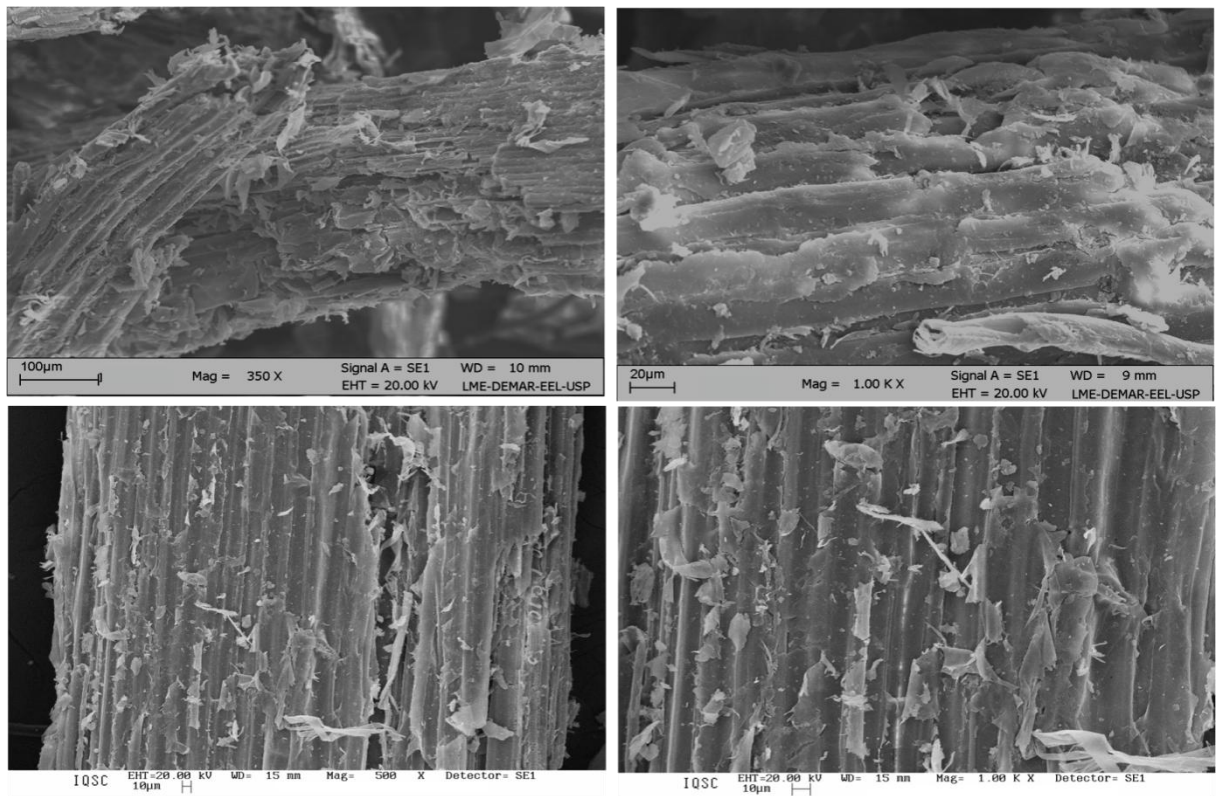


Figura 4.19 – Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Ampliação de 350x, 500x e 1000x

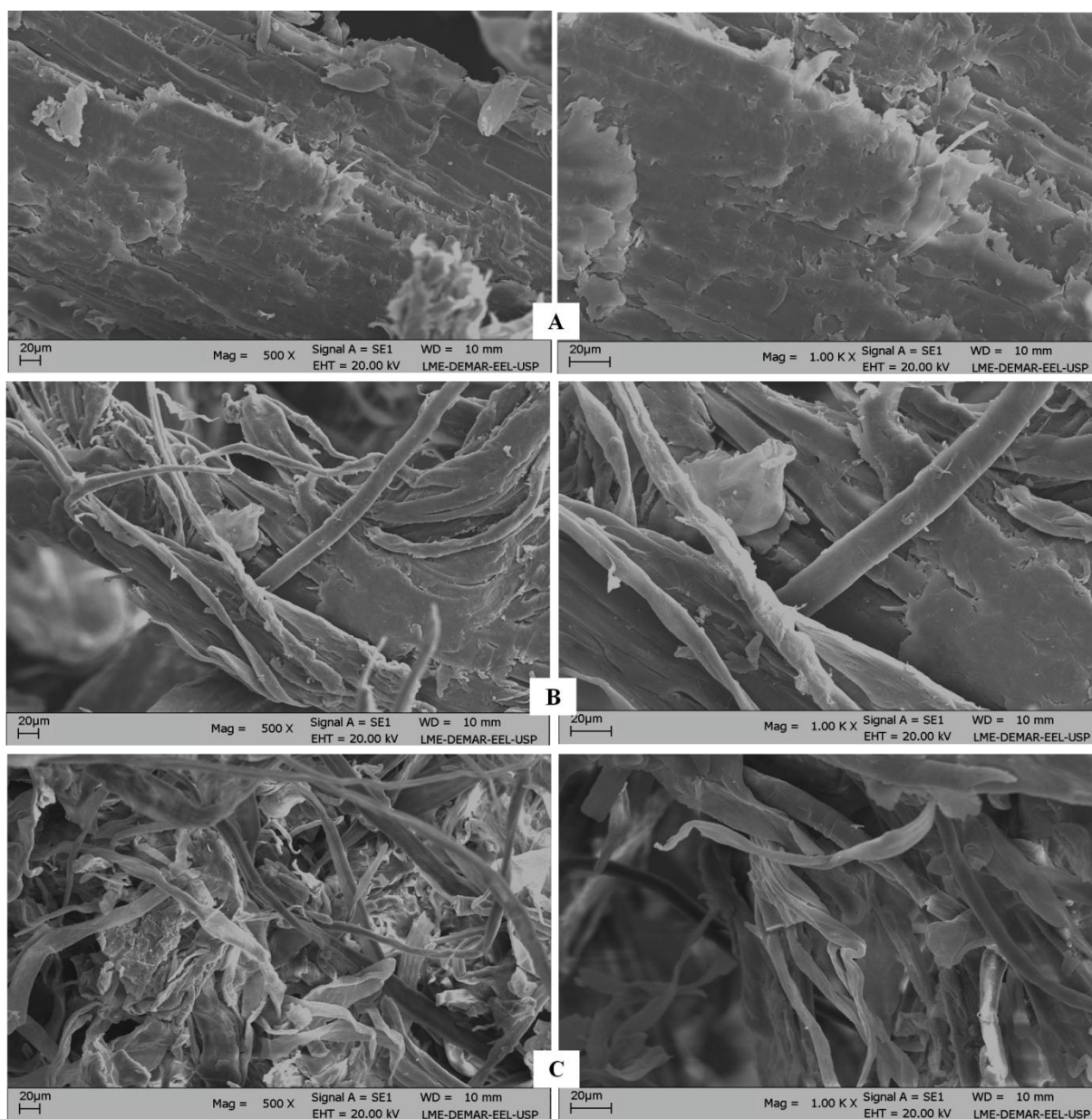


Figura 4.20 – Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 150°C/30min/50% etanol (A), 170°C/60min/50%etanol (B) e 190°C/90min/50%etanol (C). Ampliação de 500x e 1000x.

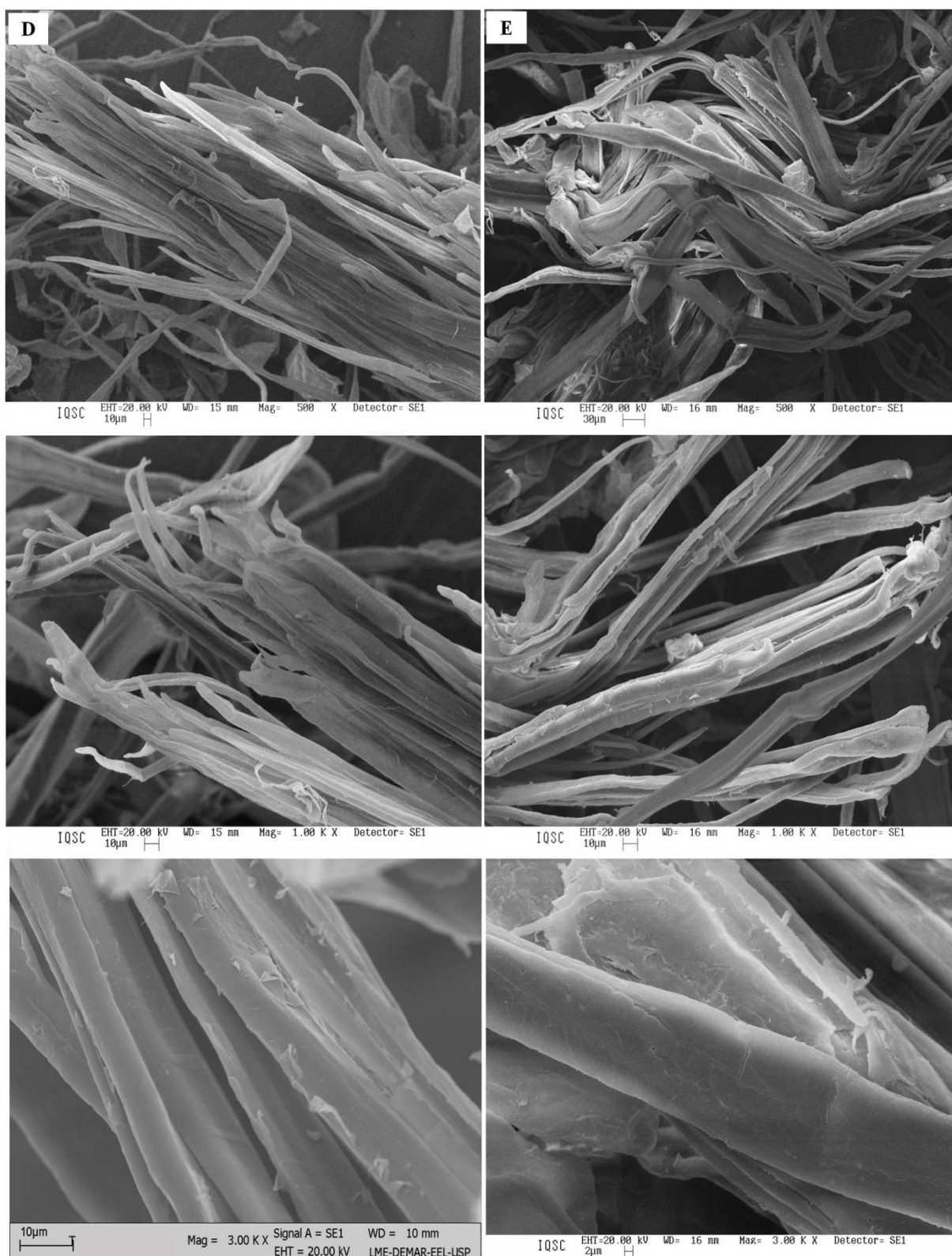


Figura 4.21 – Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 190°C/10min/50% etanol (**D**) e 190°C/10min/50% etanol seguido da etapa de deslignificação alcalina (**E**). Ampliação de 500x, 1000x e 3000x.

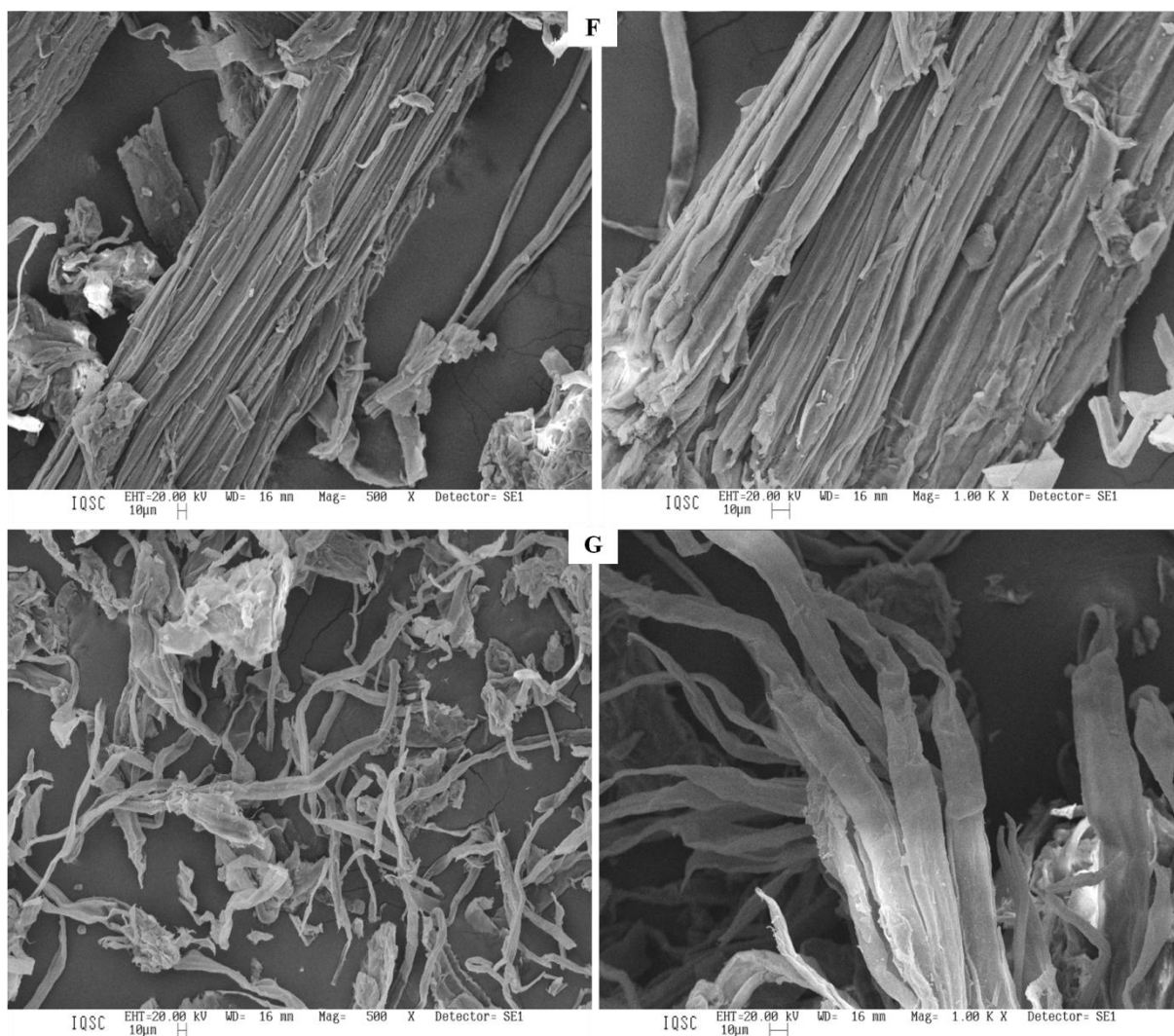


Figura 4.22 – Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve. Condições do pré-tratamento: 190°C/10min/50% etanol com catalisador ácido (F) e 190°C/10min/50%etanol com catalisador ácido seguido da etapa de deslignificação alcalina (G). Ampliação de 500x e 1000x.

Não foi possível observar diferenças significativas nas amostras variando a concentração de etanol em solução para o mesmo grau de severidade. As micrografias do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento organossolve nas condições e 150°C/30min/30% e 70% etanol, 170°C/60min/30% e 70% etanol, assim como as amostras a 190°C/90min/ 30%, 50% e 70% etanol com e sem a etapa de deslignificação alcalina encontram-se no apêndice A deste trabalho.

4.5 Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos

Os hidrolisados enzimáticos obtidos a partir da etapa de hidrólise dos materiais lignocelulósicos pré-tratados sob diferentes condições foram submetidos à etapa de fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O rendimento e eficiência das fermentações dos hidrolisados provenientes das diferentes condições de pré-tratamento organossolve encontram-se na tabela 4.13 e os perfis de fermentação para esses hidrolisados encontram-se na figura 4.23.

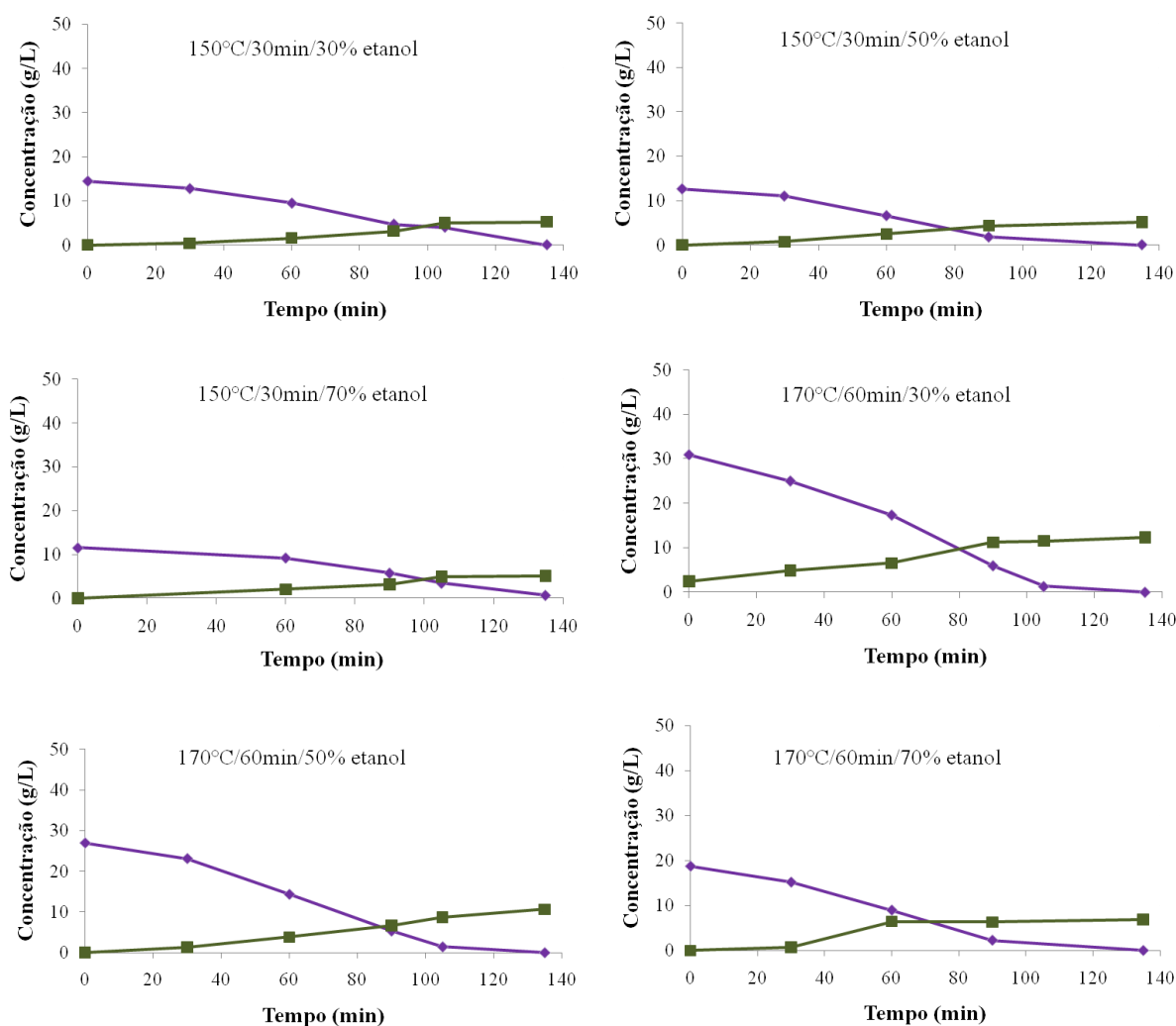
Tabela 4.13 – Concentração em g/L de glicose inicial e etanol produzido pela levedura, além de rendimento e eficiência de fermentação dos diferentes hidrolisados submetidos à fermentação.

Hidrolisado	Glicose	Etanol	Rend. (%)	Eficiência (%)
	inicial (g/L)	produzido (g/L)		
150°C/30min/etanol 30%	14,5	5,2	36	70,3
150°C/30min/etanol 50%	12,6	4,7	37	73,1
150°C/30min/etanol 70%	11,5	4,3	37	73,3
170°C/60min/etanol 30%	30,9	12,3	40	78,0
170°C/60min/etanol 50%	27,3	10,6	39	76,1
170°C/60min/etanol 70%	18,7	6,9	37	72,3
190°C/90min/etanol 30%	40,0	17,6	44	86,3
190°C/90min/etanol 50%	49,0	21,9	45	87,6
190°C/90min/etanol 70%	38,0	16,5	43	85,1

As fermentações tiveram eficiência de 70% a 88% com uma concentração máxima de 21,9 g/L de etanol produzido. As menores concentrações de etanol produzido devem-se, provavelmente a determinados compostos que podem atuar como inibidores potenciais da fermentação.

Compostos originados da degradação de açúcares (furfural e HMF) não foram encontrados em quantidades significativas para nenhuma amostra avaliada devido às exaustivas lavagens do material pré-tratado descritas anteriormente. No entanto, durante o pré-tratamento, uma parte da lignina também é degradada originando compostos fenólicos

que podem agir como inibidores da levedura (ROSSELL, 2006). Possivelmente as menores eficiências encontradas se devem a essa inibição, visto que essas amostras fermentadas apresentaram maior concentração relativa de lignina residual após o pré-tratamento. A figura 4.23 apresenta os perfis de fermentação (consumo de glicose e produção de etanol em função do tempo) dos hidrolisados apresentados na tabela 4.13.



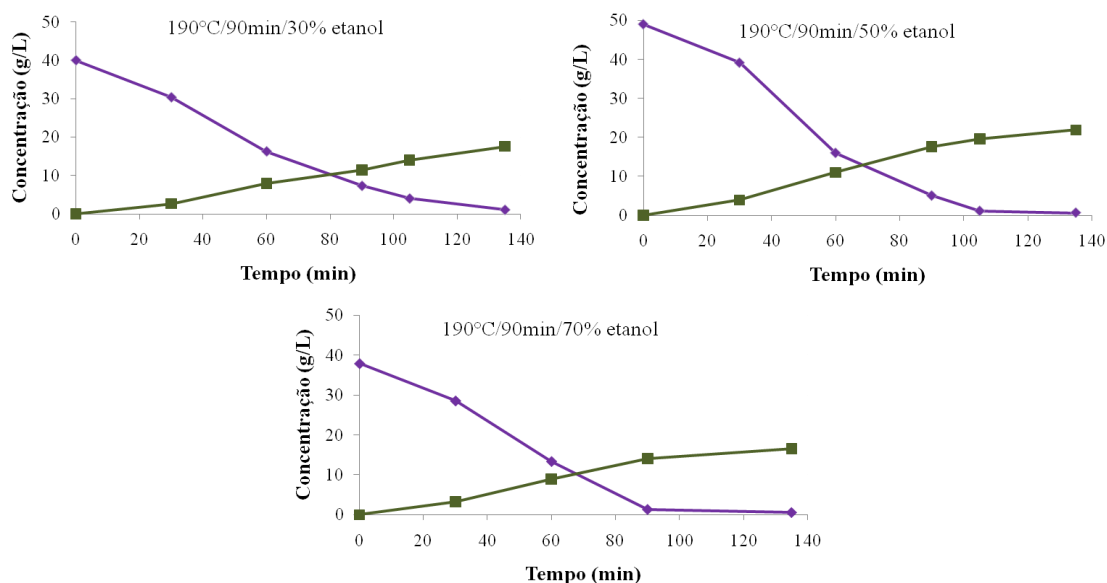


Figura 4.23 – Perfis de hidrólise das amostras submetidas a diferentes condições de pré-tratamento organossolve, sendo \blacklozenge concentração de glicose e \blacksquare concentração de etanol em g/L.

O bagaço *in natura* também foi submetido à etapa de fermentação, no entanto, a eficiência de fermentação foi baixa (31,4%), produzindo apenas 1,2 g/L de etanol. Um experimento controle com 20 g/L de glicose foi fermentado nas mesmas condições das amostras pré-tratadas, obtendo-se 9,5 g/L de etanol, uma eficiência de 93,1%.

As amostras hidrolisadas de bagaço pré-tratado (pré-tratamento organossolve) submetido a diferentes condições, pré-tratado seguido de deslignificação alcalina, bem como amostras hidrolisadas de bagaço pré-tratado com uso de catalisador ácido, seguiram a etapa de fermentação pela levedura *S. Cerevisiae*.

Em todas as amostras hidrolisadas foi observada uma eficiência do processo fermentativo acima de 85%, exceto para o bagaço *in natura*. A máxima concentração de etanol obtida foi de 30,5 g/L para a amostra de bagaço pré-tratado com catalisador ácido seguido de deslignificação, este porém, foi a amostra com maior concentração de glicose inicial (66,4g/L), se comparado aos outros hidrolisados.

Tabela 4.14 – Concentração em g/L de glicose inicial e etanol produzido pela levedura, além de rendimento e eficiência de fermentação dos diferentes hidrolisados submetidos à fermentação.

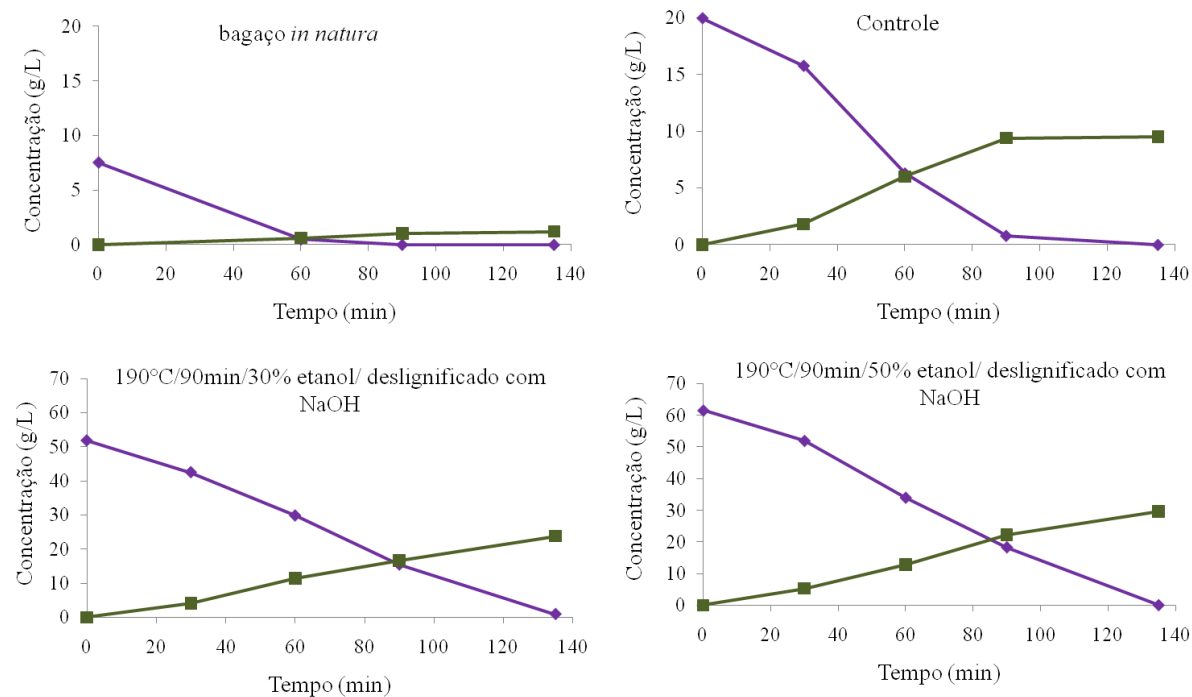
Hidrolisados	Glicose inicial (g/L)	Etanol produzido (g/L)	Rend. (%)	Eficiência (%)
Controle	20,0	9,5	47	93,1
<i>In natura</i>	7,5	1,2	16	31,4
Pré-tratamento organossolve a 190°C/90min e deslignificados com NaOH				
(1') Pré-tratado com 30% etanol	51,8	23,8	46	90,1
(2') Pré-tratado com 50% etanol	61,6	29,6	48	94,2
(3') Pré-tratado com 70% etanol	60,3	27,7	46	90,1
Pré-tratamento organossolve a 190°C/10min/50%etanol				
(4') Pré-tratado	43,6	19,8	45	89,0
(5') Pré-tratado +catalisador ácido	52,2	23,2	44	87,1
(6') Pré-tratado + deslig. (NaOH)	62,4	27,4	44	86,1
(7') Pré-tratado + deslig. (NaOH) + catalisador ácido	66,4	30,5	46	90,1

Em relação ao número de células durante a fermentação dos hidrolisados apresentados na tabela 4.14, pode-se observar na tabela 4.15 que a quantidade de células praticamente não se altera, apresentando um aumento mínimo na concentração celular (cel/mL).

Tabela 4.15 – Contagem de células por Câmara de Neubauer (cel/mL)

Hidrolisados	Número de células/mL		
	T = 0min	T = 90min	T =135min
Controle	$1,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
Pré-tratado (1')	$4,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
Pré-tratado (2')	$4,5 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
Pré-tratado (3')	$9,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
Pré-tratado (4')	$1,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
Pré-tratado (5')	$4,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$
Pré-tratado (6')	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Pré-tratado (7')	$4,1 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$

Os perfis da etapa de fermentação para os hidrolisados contidos na tabela 4.14 estão apresentados na figura 4.24.



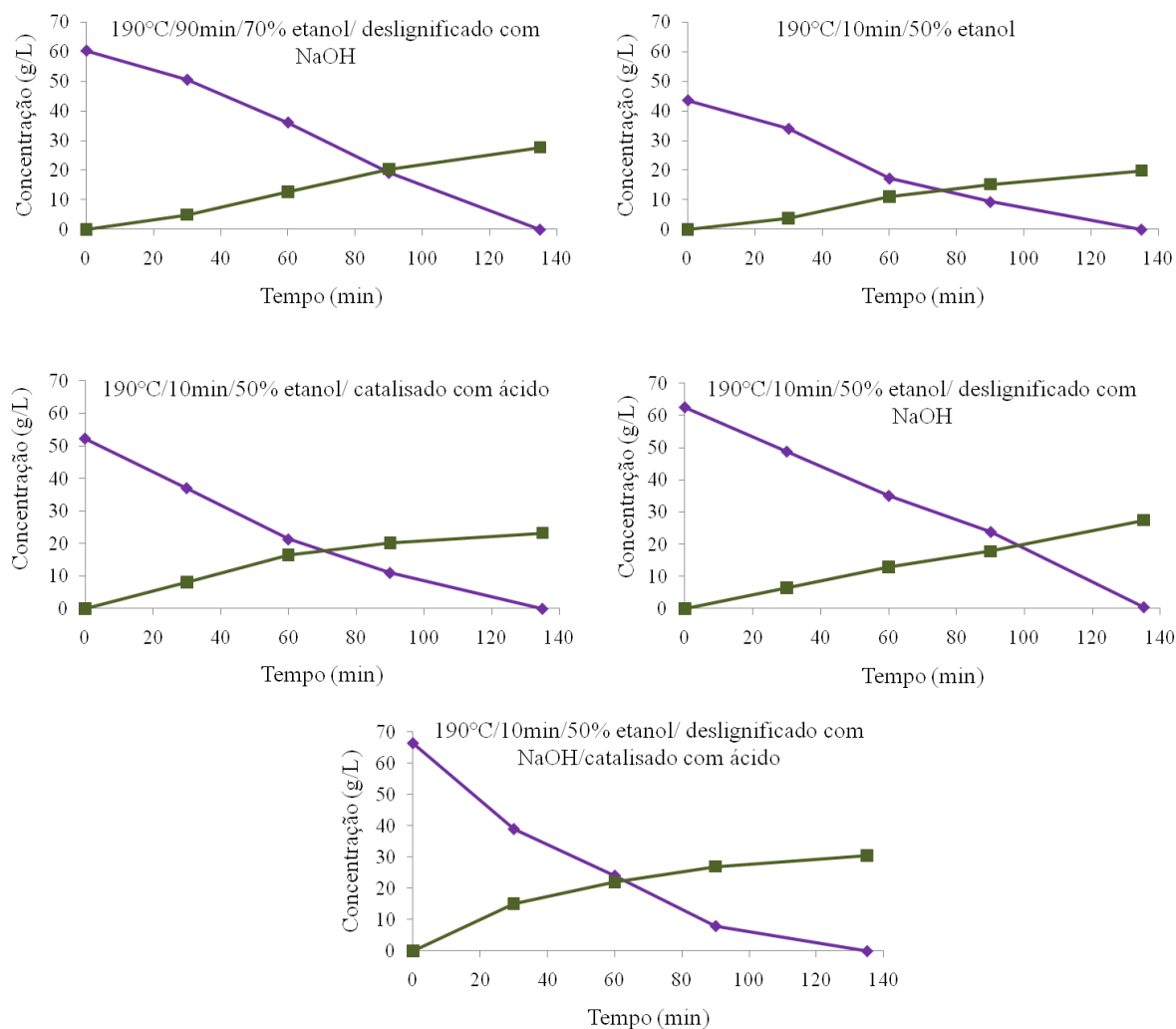


Figura 4.24 – Perfis de hidrólise das amostras *in natura*, controle e amostras submetidas ao pré-tratamento organossolve seguido de deslignificação alcalina e pré-tratamento organossolve com uso de catalisador ácido, sendo \blacklozenge concentração de glicose e \blacksquare concentração de etanol, em g/L.

4.6 Estudo da fração hemicelulósica solubilizada no licor negro derivado do pré-tratamento organossolve

O licor negro obtido a partir das diferentes condições de pré-tratamento organossolve foi avaliado quanto a sua fração hemicelulósica solubilizada. As diferentes condições de pré-tratamento organossolve testadas variaram de 4,2 a 5,9 no grau de severidade. Condições mais brandas (150°C/30min) foram selecionadas com o intuito de obter hidrólise mínima de xilana na sua forma monomérica. Além disso, os pré-tratamentos

foram realizados sem o uso de catalisador ácido para permitir maior aproveitamento da fração hemicelulósica, evitando a sua degradação e assim, gerar um substrato adequado para a produção de xilooligossacarídeos.

A tabela 4.16 apresenta as condições de pré-tratamento testadas e os respectivos rendimentos de extração de xilana na sua forma oligomérica (xilooligômeros) e xilana na sua forma monomérica (xilose).

Tabela 4.16 – Rendimento de xilooligômeros e xilose em relação à xilana solubilizada (calculada pela perda de xilana na fração sólida) para as diferentes condições de pré-tratamento organossolve.

Condições pré-tratamento organossolve	Total de xilose desaparecida da fração sólida (g)	Rendimento de extração (%) xilooligômeros	Rendimento de extração (%) xilose	Recuperação total (fração sólida + líquida) (%)
150°C/30min/30% etanol	1,7	23,6	3,9	82,1
150°C/30min/50% etanol	2,0	16,6	2,0	77,4
150°C/30min/70% etanol	1,4	6,1	1,4	82,0
170°C/60min/50% etanol	4,1	50,5	2,2	72,6
190°C/90min/50% etanol	6,3	14,4	6,5	31,1

Para as condições de menor severidade no processo (150°C/30min) foi possível obter rendimentos de extração na forma de xilooligômeros de 23,6%, 16,6% e 6,1% para as diferentes concentrações de etanol presente: 30%, 50% e 70 %, respectivamente. A solubilização de xilana na forma de xilose também foi decrescente em relação ao aumento da concentração de etanol, indicando, como já observado neste trabalho, que maiores concentrações de etanol inibem a atividade da água, suprimindo a hidrólise de carboidratos. Para essas condições, foi possível recuperar (na fração sólida e líquida) aproximadamente 80% da xilana inicialmente contida no bagaço *in natura*.

Na condição de 170°C/60min/50% etanol em solução foi possível obter um rendimento máximo de 50,5% da xilana solubilizada na forma de xilooligômeros. O resultado obtido encontra-se entre os valores de 50% e 58% alcançados, respectivamente, por Manrich et al. (2010) nas condições de pré-tratamento organossolve de 180°C/60min/50% etanol em solução para madeira de faia e Pan et al. (2006) nas condições de 180°C/60min/50% etanol e 1,25% H₂SO₄ como catalisador para choupos.

Foi encontrado, ainda, para essa condição, um valor de apenas 2,2% de xilana solubilizada em xilose, indicando ser esta uma condição bastante atrativa para produção de xilooligossacarídeos, já que a xilose inibe a sua produção (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009). No entanto, a recuperação total (fração sólida e líquida) foi de 72,6% da xilana presente no bagaço antes do pré-tratamento, valor próximo ao encontrado por Pan et al. (2006) de 72%. Possíveis destinos dos 27,4% não detectados são:

- degradação de xilose a furfural e derivados, devido à severidade do pré-tratamento e durante hidrólise ácida (H_2SO_4 72% a 121°C por 1 h), realizada para quantificação dos oligômeros, que favorecem a formação desses compostos de degradação. Parte do furfural gerado pode ter volatilizado durante a evaporação do etanol, feita para ocorrer precipitação da lignina e assim facilitar análise por CLAE.
- arraste pela lignina solubilizada nas condições do pré-tratamento ao ser precipitada por evaporação do etanol para análise de xilose e oligômeros de xilana.

A condição de maior grau de severidade ($190^\circ\text{C}/90\text{min}/50\%$ etanol) apresentou 14,4% da xilana na forma de xilooligômeros, correspondendo a 12,4% em relação à quantidade de xilana contida na matéria-prima inicial, valor próximo ao encontrado por Caparrós et al. (2007) de 11,3% para processo de auto hidrólise da madeira a 190°C .

A condição estudada apresentou, ainda, maior teor de xilana extraída na forma monomérica (6,5%). Era de se esperar uma maior extração desses compostos já que esses valores, juntamente com a xilana presente na fração sólida, representam apenas 31,1% da xilana total presente no bagaço *in natura*. Por ser a condição mais drástica estudada, a fração de xilana, que requer condições brandas de pré-tratamento para ser hidrolisada, pode ter sido significativamente degradada.

5 CONCLUSÕES

Quanto à biomassa:

- Os resultados obtidos na caracterização química para os componentes do bagaço de cana estão de acordo com os valores reportados na literatura. A composição obtida de celulose e hemicelulose torna o uso dessa biomassa interessante para produção de etanol e xilooligossacarídeos.

Quanto ao pré-tratamento organossolve:

- Reações que apresentaram maior grau de severidade foram as que tiveram menor rendimento de pré-tratamento, ou seja, houve maior solubilização dos componentes do bagaço.
- Foi possível estabelecer uma correlação linear crescente entre a severidade do pré-tratamento e a solubilização de lignina e hemicelulose.
- A menor concentração de etanol estudada (30%) para um mesmo grau de severidade proporcionou maior solubilização dos carboidratos. Já a maior solubilização de lignina ocorreu em condições de pré-tratamento com 50% de etanol em solução.
- Menores tempos de reação foram mais vantajosos, pois foi preciso 80 min a mais de reação para obter um aumento de apenas 10% na solubilização de lignina. Esse valor não é significativo, visto que implica em maiores gastos energéticos, além de contribuir para formação de produtos de degradação considerados inibitórios para a hidrólise enzimática.
- A maior temperatura estudada (190°C) contribuiu para maior solubilização dos componentes, apresentando uma solubilização de 95,3% de hemicelulose e 88% de lignina.
- A fração celulósica foi preservada em todas as condições de pré-tratamento organossolve, apresentando uma perda média inferior a 2%.
- O uso de catalisador ácido contribuiu para um aumento de 12% na solubilização da hemicelulose, levando a uma solubilização quase total desse polissacarídeos (99,6%) e um acréscimo de apenas 3,3% na solubilização de lignina, porém degradou 12,6% da fração celulósica.

Quanto à deslignificação alcalina:

- Pré-tratamentos seguidos de deslignificação alcalina atingiram solubilização máxima de 99,6% de hemicelulose e 95,5% de lignina, enquanto que a celulose apresentou uma degradação de até 20%.
- Pré-tratamento utilizando catalisador ácido seguido de deslignificação alcalina apresentou uma perda de 34% de celulose.

Quanto à hidrólise enzimática:

- A condição de pré-tratamento a 190°C/10min/50% de etanol apresentou-se como a mais viável condição de pré-tratamento estudada neste trabalho, atingindo uma maior conversão enzimática da fração celulósica (61,2%), com perda de apenas 1% de celulose em um menor tempo de reação.
- A conversão enzimática da celulose para amostras submetidas ao pré-tratamento organossolve foi limitada pela lignina e hemicelulose residuais, sendo possível estabelecer uma correlação linear entre ambos.
- A etapa de deslignificação alcalina apresentou aumento considerável na eficiência de hidrólise enzimática, com rendimento de até 88,2%, no entanto, houve degradação de 12,2% da fração celulósica.
- Pré-tratamento com uso de catalisador ácido seguido de deslignificação alcalina apresentou conversão enzimática de 79%, no entanto, houve perda de 34% de celulose.
- Não foi possível estabelecer uma correlação linear entre os resíduos de lignina e hemicelulose e a conversão enzimática para as amostras pré-tratadas seguidas de deslignificação alcalina e pré-tratadas com uso de catalisador ácido.
- O uso de catalisador ácido durante o pré-tratamento não teve efeito significativo na hidrólise enzimática devido, provavelmente, ao resíduo de ácido sulfúrico retido na lignina residual e liberado gradualmente na solução hidrolítica.
- O processo de deslignificação alcalina proposto para obter uma maior acessibilidade da fração celulósica pela enzima com uma maior reorganização e/ ou remoção dos resíduos de lignina influenciou significativamente na hidrólise enzimática, no entanto, houve degradação de até 34% da fração celulósica, ao passo que o pré-tratamento organossolve preservou essa fração mesmo nas condições mais drásticas estudadas. O uso de uma operação unitária a mais é desvantajoso economicamente, pois resulta em

maiores gastos energéticos, além de haver grande consumo de água para neutralização da polpa celulósica.

Quanto á análise por Microscopia Eletrônica de Varredura:

- As análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura para as amostras de bagaço com diferentes condições de pré-tratamento organossolve comprovam as alterações na estrutura morfológica das fibras que influenciaram na conversão enzimática, no entanto, essa técnica não foi sensível o suficiente para visualizar modificações na estrutura após a deslignificação alcalina.

Quanto à fermentabilidade:

- As fermentações dos hidrolisados enzimáticos foram satisfatórias para todas as condições de pré-tratamento avaliadas, apresentando uma eficiência média acima de 80%.

Quanto à obtenção de xilooligômeros no licor negro:

- O maior rendimento (50,5%) foi obtido na condição de pré-tratamento de 170°C/60min/50%etanol com um valor de apenas 2,2% de xilana solubilizada em xilose, indicando que o pré-tratamento organossolve nessa condição é um método viável para produção de xilooligossacarídeos a partir de bagaço de cana, embora seja necessária etapa de purificação posterior para remoção de produtos de degradação da xilose, fragmentos de lignina solúvel de baixa massa molar e compostos provenientes dos extrativos.

REFERÊNCIAS

AKPINAR, O. et al. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544-5551, 2007.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 145-151, 2009.

ALFONSO, G. et al. **Manual de los derivados de La Canã de Azucar**. 2ed., México, Geplacea, 447 p. 1990.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MULTICIÊNCIA**, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/intro_07.htm>. Acesso em: 04 de janeiro de 2011.

ANEEL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Atlas de energia elétrica no Brasil**. 2. ed. 2005. Disponível em: <[http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa\(2\).pdf](http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/pdf/05-Biomassa(2).pdf)>. Acesso em: 01 de outubro de 2010.

AZIZ, S. et al. Solvent pulping – promise and programs. **Tappi Journal**, v. 71, n. 2, p. 251-256, 1988.

AZIZ, S.; SARKANEN, K. Organosolv pulping – a review. **Tappi Journal**, v. 72, n. 38, p. 169-175, 1989.

BALLESTEROS, I. et al. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 187-192, 2002.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **International Sugar Journal**, v. 104, n. 1238, p. 64-67, 2002.

BARREIRA dos EUA ao etanol pode criar guerra comercial. 2010. Disponível em: <<http://www.sindicatroruralbebedouro.com.br/upload/1293129756.pdf>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2010.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias**. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, março, 2007. n. 25, p. 5–38. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br>>. Acesso em: 15 de outubro de 2010.

BAUDEL, H. M., Pré-tratamento e Hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3, 2006, Campinas. **Palestra...** Campinas: UNICAMP, 2006. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>>. Acesso em: 18 de agosto de 2009.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisie* sob condições não proliferantes**. 2001. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BENAR, P. **Polpação acetosolv de bagaço de cana e madeira de eucalipto**. 1992. 71 p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.

BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv**. 1995. 87 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR: ENERGIA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. 316 p. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 90–104, 1981.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética (EPE). **Balanco energético nacional 2010 – ano base 2009**. Rio de Janeiro, 2010. 54 p. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/downloads/Resultados_Pre_BEN_2010.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Balço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia**. Brasília: MAPA/SPA, 2007. 139 p. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/etanolverde/artigos/economia/balanconacionalcana.pdf>>. Acesso em: 28 de agosto de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Relação das Unidades Produtoras cadastradas no Departamento da Cana-de-açúcar e Agroenergia – posição 01/04/2010, 2010**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/1984_posicao_04_2010.pdf>. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* using the ethanol organosolv process for ethanol production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 18, p. 8328-8334, 2009.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. p. 365–380.

CANETTIERI, E. V. et al. A. Evaluation of the kinetics of xylose formation from dilute sulfuric acid hydrolysis of Forest residues of *Eucalyptus grandis*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 7, p. 1938-1944, 2007.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, dez.2009/jan.2010.

CAPARRÓS, S. et al. Optimization of *Paulownia Fortunei L.* autohydrolysis – organosolv pulping as a source of xylooligomers and cellulose pulp. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 623-631, 2007.

CARASCHI, J. C. **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivatização de polpa de bagaço de cana-de-açúcar**. 1997. 188 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.; GIRIO, F. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

CARVALHEIRO, F. et al. Wheat straw autohydrolysis: process optimization and products characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 84–93, 2009.

CASTRO, L.R.D. Energia da Cana “A Energia Verde”. In: CONBIEN – CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROBIOENERGIA & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2008, Center Convention. **Resumos...** Uberlândia, MG, 2008.

CGEE – CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília, 2009. 536 p. Disponível em: <http://www.cogen.com.br/paper/2010/Livro_Bioetanol_Cana_Acucar_2009.pdf>. Acesso em: 18 de dezembro de 2010.

CGEE – CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo – Fase 1**. Campinas: Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético (Nipe/Unicamp) e Centro de Gestão de Estudos Estratégicos, 2005.

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

CHAVES, M. C. C; GOMES, C. F. S; PEREIRA, E. R. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA OPERACIONAL, 42., 2010, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. **Trabalhos Completos...** Bento Gonçalves: SOBRAPO, 2010. Disponível em: <<http://www.xliisbpo.iltc.br/>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2011.

CHEN, S-F. et al. Pseudo reaction kinetics of organic degradation products in dilute-acid-catalyzed corn stover pretreatment hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 6, p. 1135–1145, 2007.

CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars. 2. Catalyst effects and the combined severity parameter. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 2, p. 156-162, 1990.

CHUM, H. L. et al. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, n. 1, p. 1-14, 1990.

CLAASSEN, P.A.M. et al. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, n. 6, p.741–755, 1999.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**. Brasília: Conab, janeiro, 2011. 19 p. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.

COSTA SOUSA, L. et al. Cradle-to-grave assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 339-347, 2009.

COUGHLAN, M. Cellulases: production, properties and applications. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, p. 405-406, 1985.

CULLIS, I. F.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 413–421, 2004.

CURVELO, A. A. S. **Processos de deslignificação organossolve**. 1992. 110 p. Tese (Título de Livre Docente) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e Papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2.ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988, v. 1, p. 45-106.

DENCE, C.W.; LIN, S. Y. **Methods in Lignin chemistry**. New York: Springer Verlag, 1992. 576 p.

DOMÍNGUEZ, J. M. O. **Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus***. 2003. 160 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Complutense, Madrid, 2003.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p.1–33, 1996.

ETANOL E BIOELETRICIDADE: A CANA-DE-AÇÚCAR NO FUTURO DA MATRIZ ENERGÉTICA. São Paulo: UNICA, 2010. 315 p. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/Downloads/estudosmatrizenergetica/default.asp>> Acesso em: 13 de dezembro de 2010.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

GALBE, M., ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, n. 6, p. 618–628, 2002.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** 2009. 117 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2009.

GARZÓN FUENTES, L. L. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio.** 2009. 149 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GASTES, G. J. et al. Projeções do agronegócio 2009/10 a 2019/20. In: SOBER – SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 48., 2010, Campo Grande. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/15/1192.pdf>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIERER, J. Chemistry of delignification part I: general concept and reactions during pulping. **Wood Science and Technology**, v. 19, n. 4, p. 289-312, 1985.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G. S. Setor Sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, v. 17, n. 2, p. 39–51, 2008.

GOLDESTEIN, I.S. **Organic Chemicals from Biomass.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1981. 320 p.

GOLDMAN, N. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. **MMG 445 Basic Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2009.

GONÇALVES, A. R. Fracionamento do bagaço e palha da cana visando aos novos desafios para obtenção de etanol. In: Workshop: PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA, 14., 2008, Lorena, SP. **Resumos...** Escola de Engenharia de Lorena – USP, 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/cana>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1500-1503, 2009.

HAGE, E. R. et al. Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 6, p.997-1003, 2010.

HALLAC, B. B. et al. Effect of ethanol organosolv pretreatment on enzymatic hydrolysis of *Buddleja davidii* steam biomass. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 4, p. 1467-1472, 2010.

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

HEITZ, M. et al. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II Technology. **Bioresource Technology**, v. 35, n. 1, p. 23-32, 1991.

HENRY, R. J., CANNON, D. C., WINKELMAN, J. **Clinical chemistry: principles and techniques**. 2 ed. New York: Harper and Row Publishers, 1974. 1288 p.

HIGUCHI, T. Biodegradation of lignin: Biochemistry and potential applications. **Experientia**, v. 38, p. 159-166, 1982.

HOAREAU, W. et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 567–576, 2004.

HODGE, D. B. et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8940-8948, 2008.

HOLTZAPPLE, M. T.; HUMPHREY, A. E. The effect of organosolv pretreatment on the enzymic hydrolysis of poplar. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 7, p. 670-676, 1984.

HUNT, G. R.; STIEBER, R. W. Inoculum development. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1986. p. 32-40.

JANK, M. S. Etanol, petróleo e matriz energética. **O Estado de São Paulo**. 2010. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20100609/not_imp563716,0.php>. Acesso em: 14 de outubro de 2010.

JOAQUIM, A. P. **Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar**. 1997. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

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

JUNIOR, D. L. **Métodos alternativos para aproveitamentos das hemiceluloses da madeira de eucalipto na indústria de celulose Kraft**. 2007. 128p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

KABEL, M. A. et al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2034–2042, 2007.

KAREKESI, S.; COELHO, S. T.; LATA, K. Traditional Biomass Energy: Improving its Use and Moving to Modern Energy Use. In: INTERNATIONAL CONFERENCE FOR RENEWABLE ENERGIES, 2004, Bonn. **Thematic Background Paper...** Alemanha, 2004.

KITAYAMA, O. Bioeletricidade: Co-Geração Através do Bagaço da Cana, Ampliação dos Empreendimentos. In: CONBIEN – CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROBIOENERGIA & SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCOMBUSTÍVEIS, 2008, Center Convention. **Resumos...** Uberlândia, MG, 2008.

KLEINERT, T. N. Organosolv pulping and recovery process. Patent (3585104). Quebec, Canadá. 1971.

KLEINERT, T. N. Organosolv pulping with aqueous alcohol. **Tappi Journal**, v.57, p. 99-102, 1974.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxydation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 738-747, 2003.

KLOCK, U. **Disciplina Polpa e Papel: Nota de aula expositiva**. UFPR – DETF. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/>>. Acesso em: dezembro de 2010.

KNILL, C. J.; KENNEDY, J. F. Degradation of cellulose under alkaline conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 3, p. 281-300, 2003.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151–172, 1993.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 21, p. 5409-5416, 2003.

LOBO, P.C. et al. Economics of alternative sugar cana milling options. **Applied Thermal Engineering**, v. 27, n. 8-9, p. 1405-1413, 2007.

LORA, E. S.; ANDRADE, R. V.; Biomass as energy source in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 4, p. 777-788, 2008.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403–465, 1996.

MACEDO, I. C. The current situation and prospects for ethanol. **Estudos Avançados**, v. 21, n. 59, p. 157-165, 2007.

MANI, S.; TABIL, L. G.; OPOKU, A. Ethanol from agricultural crop residues: an overview. In: ASAE/CSAE NORTH CENTRAL INTERSECTIONAL MEETING, 2002, Canada. **Resumos...** Universidade de Saskatchewan, 2002.

MANRICH, A. et al. Application of Immobilized Xylanase on Hydrolysis of Soluble wood Hemicelluloses After Pre-treatment Using Microwave and Organosolv. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 32., 2010, Clearwater Beach, FL. **Resumos...** Clearwater Beach, 2010.

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

MARTÍN, C. et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, p. 33-39, 2007.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 121p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 5, p. 372-381, 2009.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 225-274.

McDONOUGH, T.J. The Chemistry of Organosolv delignification. **Tappi Journal**, v. 76, n. 8, p. 186-193, 1993.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p.587-592, 2008.

MESA, L. et al. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: application of 2³ experimental design. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 109-114, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, C. Há área disponível para a cana-de-açúcar. **Revista Canavieiros**, Sertãozinho, SP, n. 15, p. 10-11, set. 2007.

MORFOLOGIA DO CULTIVO: A FOLHA, 2010. Disponível em: <http://sugarcane.crops.com/p/growth_morphology/the_leaf/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOURE, A. et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1913-1923, 2006.

MUSSATO, S I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p. 34-39, 2002.

MUURINEN, E. **Organosolv pulping**: A review and distillation study related to peroxyacid pulping. Finland: Biblioteca da Universidade de Oulu, 2000. 314 p.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20-28, 2007.

NARCISO, G. V. et al. Palha de sorgo: Biomassa Lignocelulósica Potencial para Utilização em Bioprocessos que envolvem o Aproveitamento da Fração Hemicelulósica. In: SINAIFERM – SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2009, Natal. **Anais...** Rio Grande do Norte: UFRN, 2009.

NASSAR, M. M.; ASHOUR, E. A.; WAHID, S. S. Thermal characteristics of bagasse. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 61, n. 6, p. 885-890, 1996.

NEILSON, M. J. et al. Evaluation of organosolv pulp as a suitable substrate for rapid enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 609-612, 1983.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: UNESP/Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2005. Disponível em: <<http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/aguardente/Aguardente.pdf>>. Acesso em: 15 de abril de 2010.

NREL – National Renewable Energy Laboratory, Biomass Program, 2009. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.htm>>. Acesso em: 14 de dezembro de 2010.

ODEGA, T. L.; PETRI, D. F. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OHGREN, K. et al. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, 2007.

OLIVEIRA, B. R. **Estudo da influência da granulometria do bagaço “in natura” na obtenção de etanol de segunda geração**. Campinas: CTBE, 2010. Relatório de Estágio.

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

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PAN, X. et al. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 473-481. 2005.

PAN, X. et al. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 851-861, 2006.

PAN, X. et al. Pretreatment of Lodgepole pine killed by mountain pine beetle using the ethanol organosolv process: fractionation and process optimization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 8, p. 2609-2617, 2007.

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 739-750, 2010.

PEREIRA JR, N. **Intensification of the xylose fermentation process**. Tese (Doutorado) - The University of Manchester, UK, 1991.

PEREIRA, R.E. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para a produção de etanol**. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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 em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

REIN, P. W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol**, v. 26, p. 44-60, 2007.

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROCHA, G. J. M. et al. A Fast and Accurate Method for Determination of Cellulose and Polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 5., 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1997.

ROLLIN, J. A. et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 22-30, 2011.

ROSSELL, C. E. V. Fermentação do Hidrolisado III. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., 2006, Universidade Estadual de Campinas, **Palestra...** Campinas. Disponível em: <<http://www.inovacao.rei.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Rossel%20Fermenta%E7%E3o%20do%20Hidrolisado.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2010.

RUGGIERO, R. et al. Photodegradation of sugarcane bagasse fibers. Influence of acetylation or grafting UV-absorber and/or hindered nitroxide radical on their photostability. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 4, p. 763-770, 2006.

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

SCHLITTLER, L. A. F. S. **Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar**. 2006. 174 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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

SHEVCHENKO, S.M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 867-876, 1999.

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

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia organosolv**. São Paulo: NAIPPE - Núcleo de Análise Interdisciplinar de políticas e estratégia da Universidade de São Paulo, 2008. v. 3, 29 p.

SOUSA, B. M. F. **Separação e identificação dos constituintes do bagaço de cana e sua conversão em insumos químicos pelo processo “organosolv”**. 1984. 117 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

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

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p.111-127, 2000.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical Principles of Textile Conservation**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998, 431 p.

TRIANA, O. et al. **Atlas: Del Bagazo de la Caña de Azucar**. México, Geplacea, 1990. 143 p.

TZVELEV, N.N. The system of grasses (Poaceae) and their evolution. **The Botanical Review**, v. 55, n. 3, p. 141-204, 1989.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Cana-de-açúcar**. 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/FAQ/>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.

VAN WALSUM, G. P.; SHI, H. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 3, p. 217–226, 2004.

VAZQUEZ, M. J. et al. Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. **Bioresource Technology**, v. 96, n.8, p. 889-896, 2005.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.

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

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1959–1966, 2005.

XU, Y.; LI, K.; ZHANG, M. Lignin precipitation on the pulp fibers in the ethanol-based organosolv pulping. **Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng. Aspects**, v. 301, n. 1-3, p. 255-263, 2007.

YAWALATA, D. **Catalytic selectivity in alcohol organosolv pulping of spruce wood**. 2001. Tese (Doutorado) – University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, 2001.

ZHANG, M.; XU, Y.; LI, K. Removal of residual lignin of ethano-based organosolv pulp by an alkali extraction process. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, p. 630-636, 2007.

ZHANG, Y. -H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

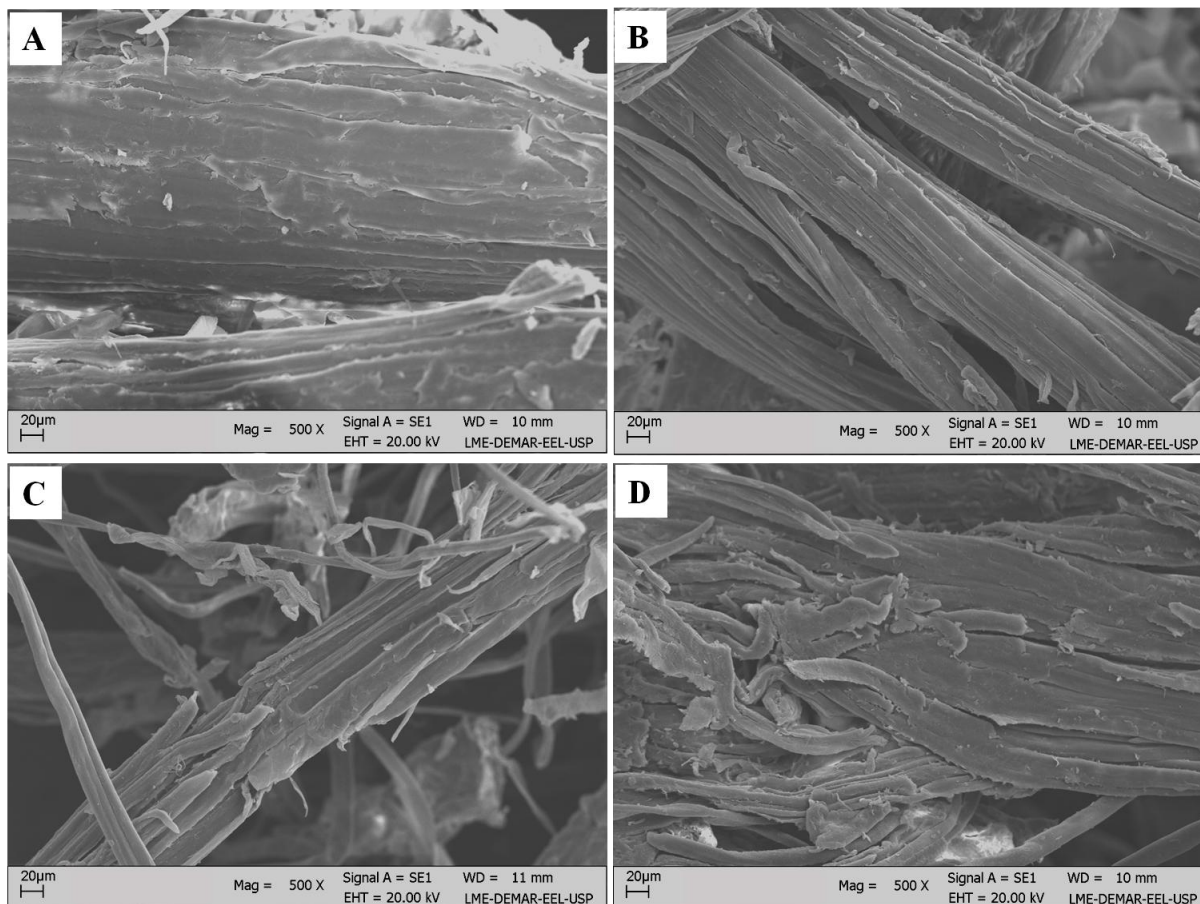
ZHANG, Y. -H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.

ZHU LI. **Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass**. 2005. 291 p. Tese (Doutorado), Instituto de Pós-Graduação da Universidade do Texas A&M University, Texas, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A: Micrografias de amostras do bagaço de cana submetido a diferentes condições de pré-tratamento organossolve.



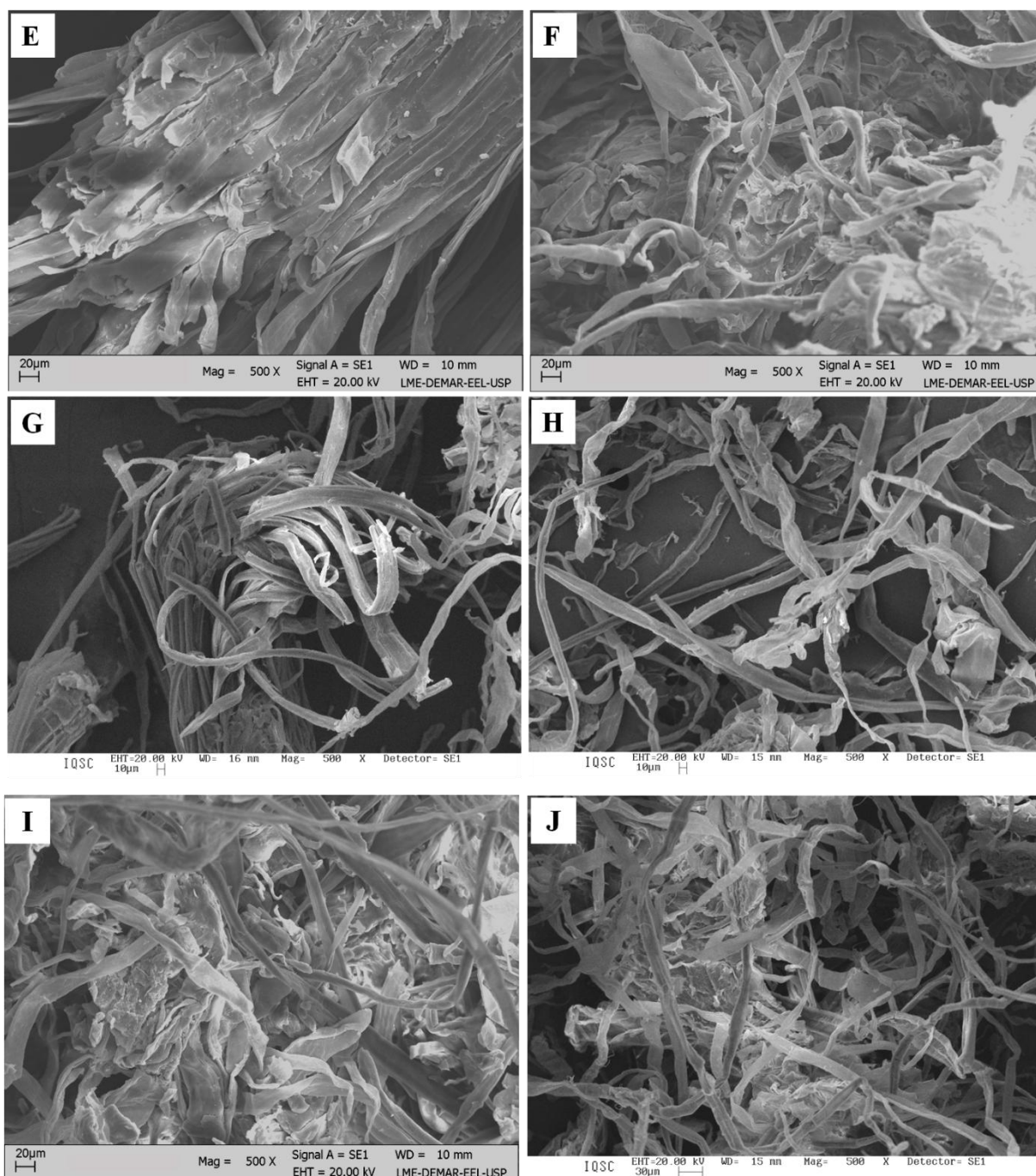
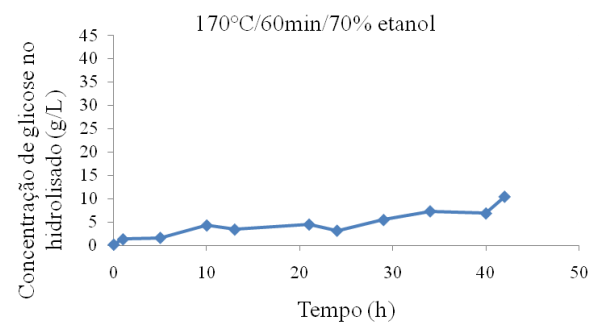
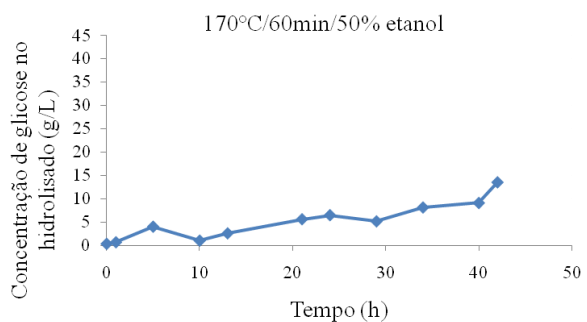
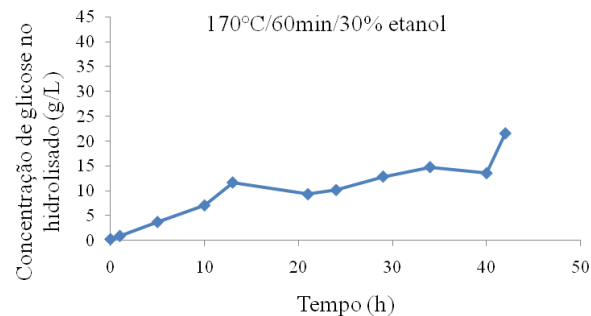
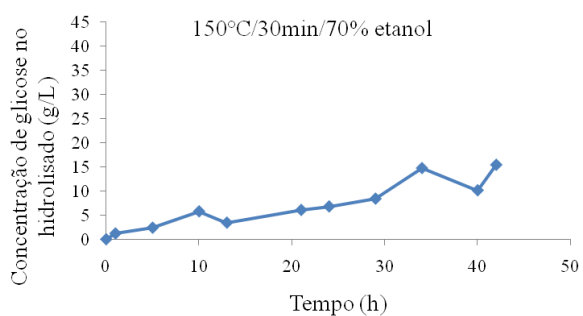
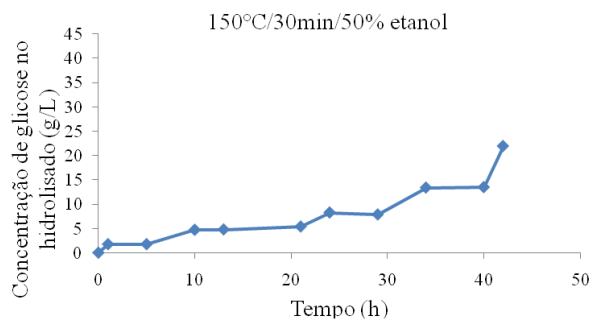
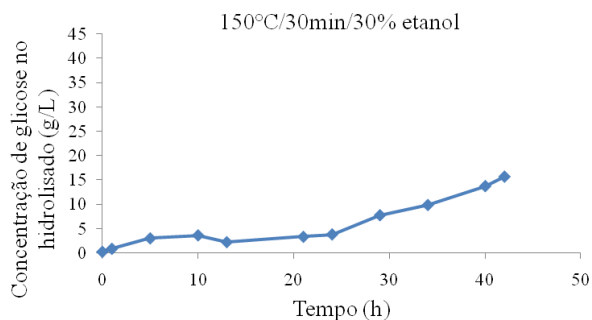


Figura A1: Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes condições de pré-tratamento organossolvente: 150°C/30min/30% etanol (A), 150°C/30min/70% etanol (B), 170°C/60min/30% etanol (C), 170°C/60min/70% etanol (D), 190°C/90min/30% etanol (E), 190°C/90min/70% etanol (F), 190°C/90min/30% etanol seguido de deslignificação alcalina (G), 190°C/90min/70% etanol seguido de deslignificação alcalina (H), 190°C/90min/50% etanol (I) e 190°C/90min/50% etanol seguido de deslignificação alcalina (J). Ampliação de 500x.

APÊNDICE B: Perfis de hidrólise enzimática (concentração de glicose no hidrolisado em função do tempo) de amostras de bagaço submetido a diferentes condições de pré-tratamento organossolve para a primeira condição de hidrólise testada (20 FPU/g celulose, relação sólido (celulose):líquido (tampão citrato) 1:10 (m/v), bagaço sem moer e com umidade de aproximadamente 75%, tempo de 42 h.



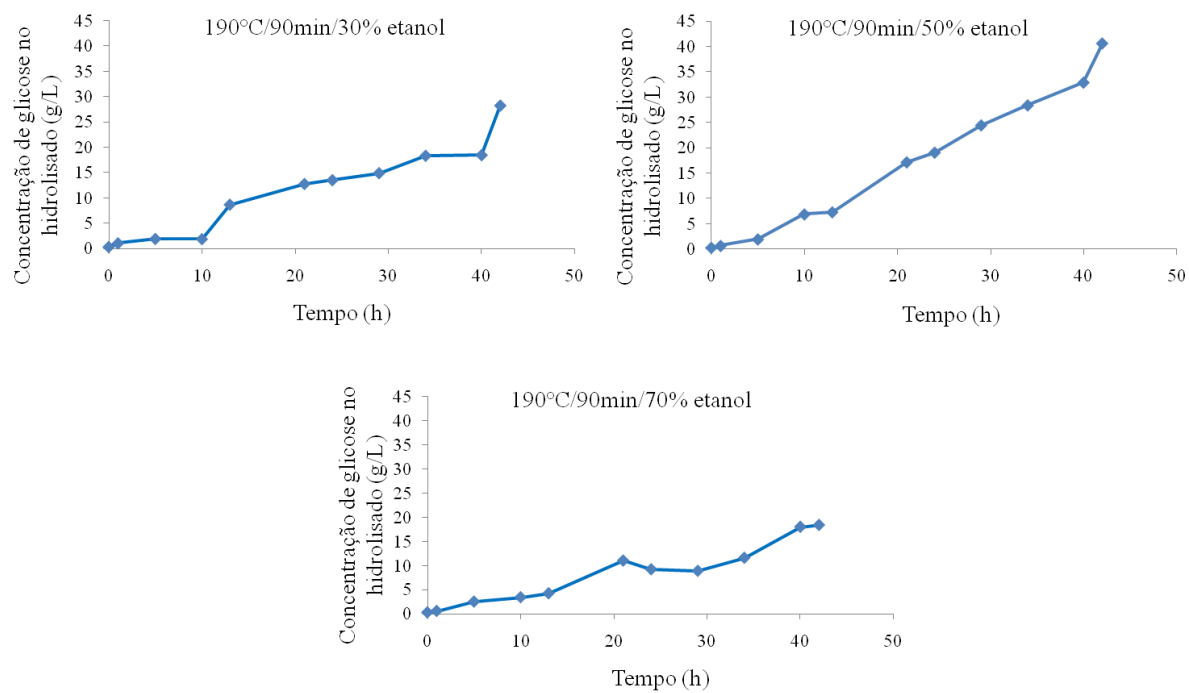


Figura B1: Perfis de hidrólise enzimática de bagaço de cana sob diferentes graus de severidade de pré-tratamento organossolve.