

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

VIVIANE MARCOS NASCIMENTO

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO (NaOH) DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE
XILOOLIGÔMEROS.**

**SÃO CARLOS
2011**

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO (NaOH) DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE
XILOOLIGÔMEROS.**

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

VIVIANE MARCOS NASCIMENTO

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO (NaOH) DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE
XILOOLIGÔMEROS.**

Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, para
obtenção do título de mestre em
Engenharia Química

*Orientação: Prof. Dra. Raquel Camargo
de Lima Giordano.*

**SÃO CARLOS
2011**

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

N244pa

Nascimento, Viviane Marcos.

Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. / Viviane Marcos Nascimento. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
136 f.

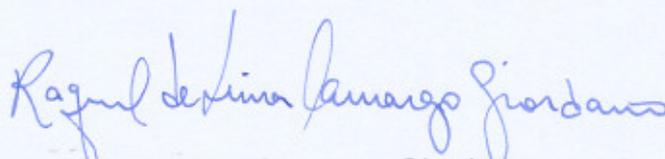
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

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

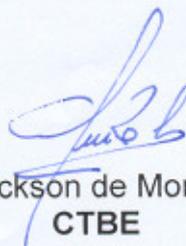
CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VIVIANE MARCOS NASCIMENTO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2011.

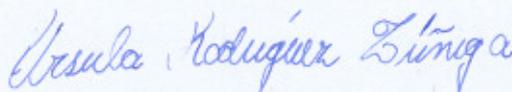
BANCA EXAMINADORA:



Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar



George Jackson de Moraes Rocha
CTBE



Ursula Fabiola Rodriguez
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais,
Selma e Miro, e a minha irmã Juliane.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela fé e coragem em sempre lutar pelos meus objetivos.

À minha família, que mesmo estando distantes, sempre deram suporte, apoio e incentivo para cada desafio e conquista da minha vida.

Ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura tornando assim possível a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Prof. Dra. Raquel Giordano pela orientação, auxílio e apoio durante esses dois anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha, pelo auxílio e aprendizado, que me proporcionou.

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves pelas contribuições referentes à caracterização da biomassa, de extrema importância nessa dissertação.

A Escola de Engenharia de Lorena- EEL/USP, pelo suporte nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz, pelo acompanhamento e discussão dos resultados das análises.

À Empresa Genencor, pelo fornecimento da enzima utilizada neste trabalho.

Aos colegas de laboratório Anderson, Anny, Claudinha, Cris, Lio ,Mineiro, Mirella , João, Sandrinha.

À Lúcia pelo auxílio e companhia em todos os obstáculos e conquistas do nosso trabalho.

As minhas amigas, Anelise, Babi e Lu por todos esses anos de convivência, se tornando uma segunda família em São Carlos.

Ao Marcéu pelo carinho, incentivo e a visão otimista de todos os obstáculos.

E agradecer a todos aqueles que de algum modo fizeram parte da minha vida e contribuíram de alguma forma para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje, possível realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a otimização do pré-tratamento de bagaço de cana *in natura* e explodido com ácido sulfúrico diluído, água e hidróxido de sódio visando a obtenção de xilooligômeros na fração hemicelulósica e produção de etanol de segunda geração. Os experimentos com o bagaço *in natura* e explodido com ácido diluído e água respectivamente foram realizados de acordo com a metodologia DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) com duas repetições no ponto central tendo como variáveis resposta: quantidade de xilose (g), concentração de ácido acético e furfural (g/L) e rendimento em xilooligômeros (%). O pré-tratamento com hidróxido de sódio foi realizado com o bagaço *in natura* de acordo com a metodologia do planejamento fatorial com duas repetições no ponto central com o objetivo de avaliar a influência do tempo de pré-tratamento (t), e concentração de hidróxido de sódio na liberação de açúcares após hidrólise. O Pré-tratamento do bagaço de cana *in natura* com concentração H₂SO₄ 0,8% v/v, 13 minutos a 100°C permitiu 94% de extração de xilana na forma de xilooligômeros, com um mínimo de xilose, furfural e ácido acético se mostrando assim como uma condição de extração favorável para produção de xilooligossacarídeos (XOS). No pré-tratamento do bagaço de cana explodido foi utilizado somente água quente devido a já existência de ácido acético, devido ao fato do bagaço explodido já ter sido submetida a um processo de pré-tratamento de auto-hidrólise na usina. Na condição de lavagem com água na relação 1:5 (m/v) por 5 minutos a 70 °C permitiu a extração de 70% de xilose do bagaço que já se encontrava solubilizada no material, desta fração 45% se encontrava na forma de oligômeros. Essa se condição é desfavorável para produção de XOS pois é grande a produção de monômero (xilose), sendo necessária uma etapa de purificação que é muito onerosa. Se o etanol for o produto final desejado é preciso um leve aumento nas condições do pré-tratamento para maior produção de xilose, por etapa de hidrólise pela enzima xilanase ou utilizando ácido como catalisador. Para o pré-tratamento do bagaço *in natura* os primeiros experimentos se mostraram inconcludentes para a obtenção de uma correlação entre tempo e quantidade de NaOH utilizado nos rendimentos de hidrólise e fermentação. Com o planejamento fatorial obteve-se para 7% NaOH 30 min. 75,3% de eficiência de hidrólise com uma máxima produção de glicose de 61,4 g/l e eficiência de 90% de fermentação com uma média de produção de 20g/L de etanol e para 4% NaOH 60 min 60 min. uma solubilização da xilana do bagaço *in natura* de 65%, com 55% na forma oligomérica. Os materiais foram caracterizados quimicamente e fisicamente antes e após as etapas de pré-tratamento mostrando a abertura e a melhor disponibilidade das fibras para o processo enzimático.

Palavras-Chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Lignocelulósicos. Pré-tratamento. Etanol. Xilooligômeros.

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize the pretreatment of sugarcane bagasse raw and exploded with diluted sulfuric acid, water and sodium hydroxide in order to obtain Xylooligosaccharides in hemicellulose and production of second generation ethanol. The experiments with sugarcane bagasse and exploded with diluted acid and water respectively were performed according to the methodology CCRD (Central Composite Rotatable Design) with two replications at the center point response variables were: amount of xylose (g), acid concentration acetic acid and furfural (g / l) and xylo-oligomers yield (%). Pretreatment with sodium hydroxide was carried out with sugarcane bagasse according to the methodology of factorial design with two replications at the central point in order to evaluate the influence of time of pretreatment (t), and hydroxide concentration sodium in the release of sugars after hydrolysis. The pretreatment of sugarcane bagasse with fresh H₂SO₄ concentration 0.8% v / v, 13 minutes at 100 ° C allowed 94% extraction of xylan in the form of scyllo-oligomers, with a minimum of xylose, furfural and acetic acid showing as a condition favorable for the extraction of XOS production. The pretreatment of sugarcane bagasse was used only blown hot water already there due to acetic acid, due to the fact that exploded bagasse have already undergone a process of pre-treatment self-hydrolysis at the plant. Provided by washing with water in the ratio 1:5 (w / v) for 5 minutes at 70 ° C allowed the extraction of 80% xylose from bagasse which was already dissolved in the material, this fraction was 62.5% in the form oligomers. If this condition is unfavorable for the production of XOS is great because the production of monomer (xylose), which required a purification step which is very costly. If ethanol is the desired end product is a slight increase in the need of pretreatment conditions for improved xylose production by hydrolysis step by the enzyme xylanase or using acid as catalyst. For the pretreatment of sugarcane bagasse early experiments proved inconclusive for obtaining a correlation between the length, amount of NaOH used in the hydrolysis and fermentation yields. With the experimental design was obtained for 7% NaOH, 30 minutes (min.) 76% of hydrolysis efficiency with a maximum production of glucose 62 g / l and 90% efficiency of fermentation with an average yield of 20g / L ethanol. The materials were characterized chemically and physically before and after the stages of pretreatment showing the openness and better availability of fibers for the enzymatic process.

Keywords: Sugarcane bagasse. Lignocellulosic. Pretreatment. Ethanol. Xylooligomers

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M. L. lamela média (KIRK; CULLEN, 1998)	20
Figura 2.2: Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal (FENGEL; WEGENER, 1989). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.	21
Figura 2.3: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (FENGEL; WEGENER, 1989).....	22
Figura 2.4: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL; WEGENER, 1989).	25
Figura 2.5: Ligações α - e β -aryl éter da macromolécula de lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).....	26
Figura 2.6: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coníferílico; (III) álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989).....	26
Figura 2.7: A Cana-de-açúcar (TRIANA et al., 1990).....	28
Figura 2.8: Microscopia Ótica digital (20 μ m) (a), MEV da fibra do bagaço de cana.....	29
Figura 2.9: Esquema de uma biorrefinaria. Diversidade de opções na utilização das frações do bagaço (SCHUCHARDT et al., 2001).	32
Figura 2.10: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de bagaço de cana de açúcar, utilizando hidrólise enzimática.....	33
Figura 2.11: Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU et al. 1980).	36
Figura 2.12: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose. (OGEDA, 2010).	46
Figura 2.13: Seqüência de etapas na transformação de glicose em etanol.....	47
Figura 2.14: Seqüência de reações enzimáticas da fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose) conduzida por <i>Saccharomyces</i> . (LIMA et al., 2001).....	48
Figura 3.1: Fluxograma de trabalho para pré-tratamento ácido para bagaço <i>in natura</i>	64
Figura 3.2: Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana-de-açúcar explodido não lavado pré-tratado com água.....	65
Figura 3.3: Fluxograma de trabalho para bagaço de cana <i>in natura</i> pré tratado com hidróxido de sódio.....	66
Figura 4.1: Gráfico de superfície de resposta para a massa de xilose no hidrolisado.	75
Figura 4.2: Gráfico de superfície de resposta para a concentração de ácido acético no hidrolisado.	76
Figura 4.3: Gráfico de superfície de resposta para a concentração de furfural no hidrolisado.....	80
Figura 4.4: Rendimento em massa após o pré-tratamento de 30 g de bagaço seco com hidróxido de sódio em várias condições.....	83
Figura 4.5: Composição das celuligninas após respectivas condições de cada pré- tratamento.	86
Figura 4.6: Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento de 30 g de bagaço com hidróxido de sódio em várias condições.....	94
Figura 4.7: Composição das celuligninas após respectivas condições de cada pré- tratamento.	97
Figura 4.8: Porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina após pré-tratamento alcalino em várias condições a 30g de bagaço <i>in natura</i> seco.	98

Figura 4.9: Concentração de glicose em função do tempo, na hidrólise de bagaço de cana <i>in natura</i> submetidos a tratamento alcalino sob diferentes condições, etapa 2: a) (4% NaOH, 60 minutos) ; b) (4% NaOH, 60 minutos); c) (4% NaOH, 60 minutos); d) (7% NaOH, 90 minutos) ;e) (1% NaOH, 90 minutos); f) (7% NaOH, 30 minutos); g) (1% NaOH, 30 minutos).....	101
Figura 4.10: Comportamento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela hidrólise enzimática do bagaço de cana proveniente de diferentes condições de pré-tratamento com NaOH da etapa 2. Concentrações dos açúcares (g/L): (■) etanol ; (◆) glicose) : a) Fermentação ensaio a; b) Fermentação ensaio b; c) Fermentação ensaio c; d) Fermentação ensaio d; e) Fermentação ensaio e; f) Fermentação ensaio f; g) Fermentação do ensaio g.	103
Figura 4.11: Solubilização da xilana do bagaço <i>in natura</i> com diferentes concentrações de hidróxido de sódio.	105
Figura 4.12: Ajuste de tendência entre o rendimento de extração de xilana e concentração de NaOH (%) obtidos através da análise da fração líquida para as diferentes condições de pré-tratamento.	106
Figura 4.13: Ajuste de tendência entre o rendimento de extração de xilana e o tempo de reação obtidos através da análise da fração líquida para as diferentes condições de pré-tratamento.	107
Figura 4.14: Influência do teor de hidróxido de sódio utilizado nos pré-tratamentos nas variáveis respostas celulose, hemicelulose, lignina e glicose após hidrólise	109
Figura 4.15: Fotomicrografias: a) bagaço de cana <i>in natura</i> sem pré-tratamento b) após pré-tratamento com NaOH, 7% 90 minutos c) NaOH 7%, 30 minutos.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição química dos materiais lignocelulósicos (CASTRO, 2006).....	19
Tabela 2.2: Sumário das vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de pré-tratamento e hidrólise de material celulósico. (adaptado de OGEDA et al., 2010).....	39
Tabela 2.3: Alguns trabalhos da literatura com pré-tratamento alcalino.....	42
Tabela 3.1: Algumas características dos reagentes utilizados nos experimentos.	50
Tabela 3.2: Faixa de valores estudados no DCCR para o bagaço <i>in natura</i>	62
Tabela 3.3: Matriz do planejamento experimental para o bagaço <i>in natura</i>	62
Tabela 3.4: Faixa de valores estudados no DCCR para o bagaço explodido.....	63
Tabela 3.5: Matriz do planejamento experimental para o bagaço explodido.....	63
Tabela 3.6: Faixa de valores estudados no planejamento 2 ² do pré-tratamento com hidróxido de sódio.....	64
Tabela 3.7: Componentes utilizados na fermentação alcoólica do hidrolisado dos bagaços pré-tratados com suas respectivas concentrações.....	68
Tabela 4.1: Porcentagem de umidade no bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e explodido.....	70
Tabela 4.2: Constituição do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e explodido após caracterização química com ácido sulfúrico 72%.....	71
Tabela 4.3: Rendimento de extração de xilose, xilooligosacarídeos (g) e concentrações de ácido acético e furfural- resultados obtidos para o DCCR (Tabela 4.4) aplicado ao bagaço <i>in natura</i> , obtidas após exposição de bagaço de cana <i>in natura</i> , a diferentes tempos (t), temperaturas (T) e concentrações de ácido sulfúrico (Ác. S). 5 g bagaço (umidade 50%), 10 mL água, massa inicial de xilose contida no bagaço=0,45g).....	73
Tabela 4.4: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta quantidade de xilose.....	75
Tabela 4.5: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta concentração de ácido acético.	76
Tabela 4.6: Ajuste do modelo matemático para todas as variáveis respostas do planejamento experimental para o bagaço de cana <i>in natura</i>	77
Tabela 4.7: Massas de xilose e de xilooligômeros (g) e concentrações de ácido acético e furfural obtidos para o DCCR (Tabela 4.9) obtidas após lavagem bagaço de cana previamente explodido sob diferentes temperaturas e relações sólido úmido/líquido, por 5 minutos. 5g de bagaço explodido (umidade 50%), com massa inicial de xilose contida no bagaço = 0,40g).....	78
Tabela 4.8: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta concentração de furfural para o bagaço de cana explodido.....	79
Tabela 4.9: Concentrações de xilose e de xilooligômeros (g/L) obtidas após lavagem com água a 70°C, e diferentes tempos e condições de agitação, de bagaço de cana previamente submetido a explosão com vapor. 5g de bagaço úmido (50% de umidade, 14,7% de hemicelulose, 16,7% de xilose) lavado com 25 mL de água (0,42g de xilose e C _{total xilose} = 15,5g/L (0,42/ 27,5ml) (concentração máxima de xilose no pré-tratamento).no pré-tratamento).....	81
Tabela 4.10: Tempos e concentrações de NaOH estudados na primeira etapa do estudo do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> . Teor de celulose, hemicelulose e lignina.....	82

Tabela 4.11: Composição química das biomassas corrigidas pelo fator do pré-tratamento.....	84
Tabela 4.12: Condições utilizadas no tratamento com NaOH de bagaço de cana <i>in natura</i> , respectivos teores residuais de celulose e de lignina, concentração de glicose e conversão de celulose em glicose obtido após 72 horas de sacarificação enzimática. Condições de hidrólise :10% carga de sólido, 20FPU/g bagaço seco Accelerase 1500, T= 50°C, pH4.8.....	88
Tabela 4.13: Tempos e concentrações de NaOH usados no tratamento de bagaço de cana <i>in natura</i> , respectivos teores residuais de celulose, hemicelulose e de lignina corrigidos obtidos e rendimentos em etanol 120 min de fermentação do hidrolisado . Condições de fermentação 250 rpm, 30°C, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
Tabela 4.14: Tempo e concentrações de NaOH estudados no pré-tratamento de bagaço de cana <i>in natura</i> usando planejamento 2 ² . Concentrações de celulose, hemicelulose e lignina.....	94
Tabela 4.15: Composições das celuligninas de cada condição do planejamento corrigido pelo fator de rendimento do pré-tratamento.....	96
Tabela 4.16: Efeito do pré-tratamento com hidróxido de sódio na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	99
Tabela 4.17: Tempos e concentrações de NaOH usados no tratamento de bagaço de cana <i>in natura</i> , respectivos teores residuais de celulose (Cel), hemicelulose (Hemi) e de lignina (Lig) corrigidos obtidos e rendimentos em etanol 120 min de fermentação do hidrolisado. Condições de fermentação 250 rpm, 30°C, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	102
Tabela 4.18: Massa de xilose presente no bagaço de cana <i>in natura</i> (30g seco) sem pré-tratamento e massa de xilose obtida na celulignina obtida após tratamento com NaOH em várias condições.(24,14 % de xilose no bagaço <i>in natura</i> sem tratamento).....	104
Tabela 4.19a: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2 ² com hidróxido de sódio para a variável resposta celulose.....	108
Tabela 4.19b: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2 ² com hidróxido de sódio para a variável resposta hemicelulose.....	108
Tabela 4.19c: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2 ² com hidróxido de sódio para a variável resposta lignina.....	108
Tabela 4.19d: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2 ² com hidróxido de sódio para a variável resposta glicose da hidrólise.....	108
Tabela 4.19e: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2 ² com hidróxido de sódio para a variável resposta rendimento de extração de xilana.....	108
Tabela 4.20: Condições utilizadas nos pré-tratamentos da etapa 2 e as análises realizadas para a fração líquida e sólida após o pré-tratamento , com celulose (%), hemicelulose (%), Lignina (%), a conversão de celulose em glicose (%), Rendimento em etanol (%), perda de celulose (%), solubilização da xilana (%) e rendimento de extração de xilana (%)......	111

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	15
2.1 Biomassa Vegetal	19
2.2.1 Celulose	21
2.2.2 Hemicelulose	24
2.2.4 Outros componentes: extrativos	27
2.3 A cana-de-açúcar	28
2.3.1 O Bagaço de cana-de-açúcar	29
2.3.1.1 Características do processamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	30
2.2.2.1 Xilooligossacarídeos- XOS	33
2.4 Pré-tratamento	35
2.4.1 Tipos de pré-tratamento.....	37
2.4.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio.....	41
2.4.1.2 Pré-tratamento com ácido diluído	42
2.4.2 Formação de inibidores na etapa do pré-tratamento.....	43
2.5 Hidrólise	44
2.6 Fermentação.....	46
3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	50
3.1 Materiais	50
3.1.1 Reagentes.....	50
3.1.2 Equipamentos	51
3.1.3 Matéria prima	51
3.2 Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	51
3.2.1 Teor de Umidade	52
3.2.3 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE.....	53
3.2.4 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.....	54
3.2.5 Determinação do teor de cinzas da lignina.....	54
3.2.6 Determinação do teor de cinzas totais	54
3.2.7 Determinação de lignina solúvel	55
3.2.8 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural	55
3.2.9 Determinação dos extrativos	56
3.2.10 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	56
3.3.1 Determinação da atividade enzimática.....	57
3.4 Procedimento Experimental	57
3.4.1 Fluxogramas de trabalho	57
3.4.2 Pré-tratamentos.....	61
3.4.2.1 Pré-tratamento com água e ácido sulfúrico diluído.....	61
3.4.2.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio.....	63
3.4.3 Identificação dos Oligômeros de Xilose presentes na fração líquida após pré-tratamento	65
3.5.1 Determinação da concentração de glicose.....	66
3.6 Preparação do inoculo	68
3.6.1 Fermentação	68
3.6.2 Quantificação de etanol	69
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 Caracterização do bagaço de cana de açúcar <i>in natura</i> e explodido	70
4.1.1 Teor de Umidade	70

4.1.2 Composição química	70
4.2 Remoção de hemicelulose do bagaço de cana <i>in natura</i> e explodido	72
4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> com solução de ácido sulfúrico	73
4.2.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar explodido com água	78
4.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH.....	82
4.3.1 Etapa 1- Estudos Preliminares.....	82
4.3.1.1 Hidrólise enzimática dos pré- tratados da etapa 1	88
4.3.2 Etapa 2- Planejamento Fatorial.....	93
4.3.2.1 Hidrólise enzimática dos Pré-tratados da etapa 2.....	99
4.3.2.2 Fermentação da glicose gerada pela hidrólise dos pré-tratados da etapa 2	102
4.3.2.3 Influência das condições de pré-tratamento na composição da fração líquida- Análise de oligômeros	104
4.3.2.4 Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis.....	107
4.3.2.5 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	112
CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS.....	116
APÊNDICE.....	130

1- INTRODUÇÃO

O crescimento econômico mundial e o aumento na demanda de energia geram preocupação com o suprimento de energia nas próximas décadas, uma vez que o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás). Cerca de 80% do consumo mundial de energia é proveniente dessas fontes, com crescimento anual de cerca de 2% (média em 20 anos) e cresceu 3,1% ao ano nos últimos cinco anos (GOLDEMBERG, 2008).

Torna-se clara, pois, a necessidade de mudanças não só pela exaustão das fontes fósseis como também pelos efeitos negativos ao meio ambiente.

Nesse contexto a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, obtidos a partir de biomassa, tem sido uma alternativa cada vez mais buscada. Contudo, o aumento da produção atual de etanol a partir da cana-de-açúcar e do milho, poderia ocasionar aumento de preços e diminuição da disponibilidade de alimentos. Assim, a produção de biocombustíveis de segunda geração, particularmente utilizando resíduos lignocelulósicos como matéria-prima, aparece como uma solução eficaz.

O Brasil está avançado em relação ao mundo quando se trata de substituir combustíveis fósseis, como a gasolina, por etanol proveniente de matéria prima renovável. O Brasil produz cerca de 28 bilhões de litros de etanol combustível (dado da safra 2008/09 de maio/2009), (UNICA 2010) o que representa 36% do total mundial.

Se a atual taxa de crescimento da produção de etanol no Brasil se mantiver e se outros países produtores de açúcar seguirem a via aprovada pelo Brasil, parece possível que mais que 10% de toda a gasolina usada no mundo possam ser substituídas por biocombustíveis nos próximos 15-20 anos (GOLDEMBERG, 2008). Esta substituição poderia acontecer em menor tempo com o aproveitamento do bagaço de cana, resíduo abundante no Brasil, já que seria capaz de incrementar consideravelmente a oferta de álcool sem a necessidade de aumentar a área de plantio de cana-de-açúcar. O bagaço oferece outra grande vantagem por ter custo mínimo, vir processado das moendas, e estar pronto para uso no local (SHLITTLER, 2006). Além disso, a produção de etanol a partir do bagaço pode compartilhar operações unitárias do processo de produção convencional de etanol da cana-de-açúcar, tais como fermentação e destilação, o que promove uma diminuição nos custos. A utilização do bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carboidratos para a produção de etanol

vem sendo estudada por vários pesquisadores (NEUREITER et al, 2002; BANERJEE; PANDEY, 2002).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material altamente energético. Sua composição química o torna um material de elevado potencial tecnológico, principalmente para a bioprodução de etanol. Ele é composto por 32-48 % de celulose, 19- 24 % de hemicelulose, 23-32% de lignina, 3,2 a 5,5 % de cinzas (BANERJEE; PANDEY, 2002).

O uso de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana para a produção de biocombustíveis, contudo, requer primeiramente submeter o material a uma etapa de pré-tratamento para separação dos polímeros constituintes e aumento da acessibilidade à celulose, para facilitar a posterior hidrólise da celulose desta a glicose. Esta é uma das etapas mais custosas devido à utilização de reagentes de preço elevado, demanda energética e/ou geração de resíduos.

A etapa de pré-tratamento de lignocelulósicos já vem sendo estudada há muito tempo na indústria de papel e celulose, que utiliza predominantemente o tratamento alcalino conhecido como processo Kraft. Contudo para o setor papelero que não utiliza a celulose para fermentação, a geração de inibidores na etapa de pré-tratamento não é um problema, entretanto é um fator essencial para a fermentação do hidrolisado para a produção do etanol lignocelulósico. Assim, na última década, vários tipos de pré-tratamento vêm sendo estudados visando redução de custos e minimização de inibidores para a produção de bioetanol.

As etapas seguintes, hidrólise dos materiais lignocelulósicos e a fermentação posterior dos açúcares resultantes, vêm se mostrando um grande desafio. A etapa de hidrólise pode ser realizada por duas rotas: ácida ou enzimática. A primeira é mais rápida e barata, mas tem que ser cuidadosamente controlada para evitar reações paralelas indesejáveis que geram inibidores. Na hidrólise enzimática o catalisador além de ser de origem biológica, realiza reações específicas causando menores impactos ambientais. Contudo, esses biocatalisadores são caros e para viabilizar economicamente processo, é necessário maximizar a conversão enzimática com o menor custo possível. (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006).

Durante a hidrólise enzimática alguns fatores podem interferir como a presença de lignina e hemicelulose, as quais dificultam o acesso da enzima à celulose resultando em redução da eficiência do processo de hidrólise (SUN; CHENG, 2002).

De acordo com Baudel, (2006) o obstáculo encontrado para viabilizar, economicamente, a produção do bioetanol proveniente da biomassa lignocelulósica é disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

No entanto, para que o etanol seja produzido economicamente a partir de biomassa, é essencial que se considere a utilização não apenas de hexoses, mas também de pentoses, provenientes da hemicelulose. (THAHARZADEH; KARIMI, 2008; SANCHEZ; CANDONA, 2008; STAMBUK et al, 2008, PARVEEN et al, 2009). Ressalte-se que *S.cerevisiae* não fermenta diretamente xilose, o principal monômero resultante da hidrólise de hemicelulose. Assim, será necessário ou isomerização desta a xilulose, este sim fermentável por essa levedura, ou uso de *S.cerevisiae* recombinante. Além de etanol, outros produtos também podem ser obtidos de hemicelulose, tais como furfural, xilose, xilitol, ácido acético e outros. Xilooligossacarídeos surgem também como uma emergente forma de agregar valor ao material lignocelulósico. Os xilooligossacarídeos são açúcares não convencionais (de 2-5 unidades de xilose), não-calóricos e não são metabolizados pelo organismo humano. São considerados prebióticos, uma vez que promovem seletivamente o crescimento de probióticos como *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium bifidum*, promovendo uma série de benefícios à saúde humana, como a redução da constipação intestinal, auxílio a digestão e a absorção de nutrientes, a prevenção de infecções gastrintestinais e a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (MENEZES et al, 2008). Sua produção requer extração da hemicelulose na forma de oligômeros de xilana, ou seja, de tamanho suficientemente pequeno para que seja solúvel e separável da celulose, mas não completamente hidrolisada a xilose. A produção dos xilooligossacarídeos poderá ser feita por hidrólise enzimática da hemicelulose com endoxilanases.

Lignina tem recebido também muita atenção, pois pode gerar composto como os polímeros biodegradáveis, por exemplo. (ARATO et al, 2005, SILVA et al, 2009).

O conceito de biorefinaria integrada surge no momento em que se deseja maximizar o valor agregado obtido da lignocelulose. É definida como uma instalação que extrai carboidratos, óleos, lignina e outros materiais da biomassa, converte-os a combustíveis, produtos químicos de alto valor e outros materiais, aproximando ao desperdício nulo.

Ao se aplicar esse conceito, o estudo do pré-tratamento passa a ter um leque mais abrangente de opções. Na etapa de separação entre os polímeros, uma condição que leve a baixo rendimento de extração da hemicelulose, não desejada se o produto visado é etanol, pode ser interessante para a produção de XOS, se a quantidade extraída estiver na forma de oligômeros de xilana. Por outro lado, condições mais severas que resultem em alto rendimento de extração, com grande produção de xilose seriam a busca para a produção de etanol.

Hemicelulose é o heteropolímero mais facilmente sujeito a hidrólise devido à presença de ramificações e pode ser separada da celulose sequencial ou simultaneamente à lignina, a escolha possivelmente dependendo da aplicação visada para ela. Este trabalho tem, pois, como objetivo geral o estudo dos pré-tratamentos ácido e alcalino de bagaço de cana *in natura* e previamente submetido à explosão com vapor. Etanol é o produto visado na fração celulósica; xilose ou xilooligômeros na fração hemicelulósica. Assim, utilizando metodologia de planejamento experimental pretende-se avaliar diferentes condições de pré-tratamentos de bagaço de cana com ácido diluído e com NaOH, visando máxima remoção de hemicelulose e lignina, máxima extração de xilana (principal polímero de hemicelulose) na forma de oligômeros, mínima formação de subprodutos (ácido acético e furfural) e máximo rendimento em glicose (hidrólise enzimática) e em etanol.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo 2 apresentam-se os principais conceitos sobre a cana-de-açúcar, com suas propriedades e composição química, os tipos de pré-tratamento mais utilizados para a separação dos constituintes da biomassa, tendo ênfase no pré-tratamento com hidróxido de sódio e ácido diluído visando à produção de etanol e xilooligossacarídeos, como também uma revisão dos conceitos principais de hidrólise enzimática com a forma de atuação das enzimas utilizadas e da fermentação.

2.1 Biomassa Vegetal

A biomassa é um material constituído por substâncias de origem orgânica e tem procedência de maneira indireta do sol, podendo ser considerada uma fonte de energia renovável.

A composição química da biomassa lignocelulósica em geral apresenta em média 40-50% de celulose, 18-27% de hemicelulose e 18-27% de lignina, apresentando variação em função do tipo de material, conforme se observa na tabela 2.1. O aproveitamento energético dos materiais lignocelulósicos constitui uma das alternativas mais promissoras para a obtenção de combustíveis e matérias primas de interesse industrial, a partir dos açúcares resultantes da hidrólise de celulose e hemicelulose (DUARTE, 1989; GARROTE et al, 2004).

Tabela 2.1: Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos.

MATERIAL	COMPOSIÇÃO (%)			
	CELULOSE	HEMICELULOSE	LIGNINA	OUTROS
Bagaço de cana	36	28	20	16
Palha de cana	36	21	16	27
Palha de milho	36	28	29	7
Sabugo de milho	36	28	0	36
Palha de trigo	39	36	10	15
Palha de arroz	33	26	7	34
Casca de arroz	38	20	19	25
Palha de algodão	42	12	15	31
Madeira de pinheiro	44	26	29	1
Capim	32	20	9	39

Fonte: CASTRO, 2006

2.2 Constituição geral dos materiais lignocelulósicos

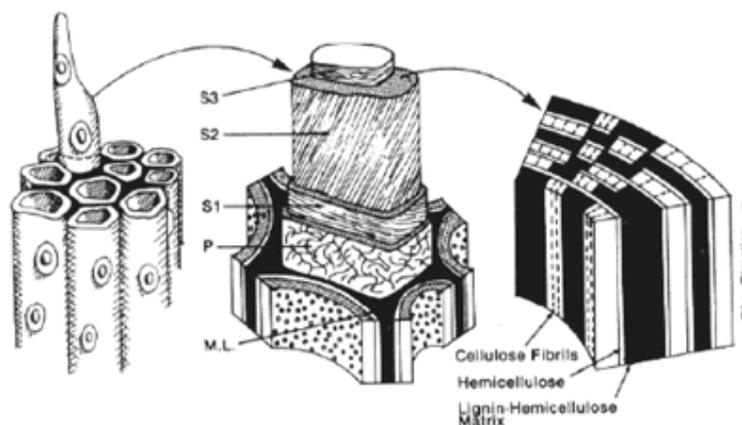
Os materiais lignocelulósicos são muito utilizados industrialmente, como por exemplo, as fibras naturais. No processo de polpação na indústria de papel a fibra de madeira é amplamente utilizada sendo a fibra mais importante economicamente. Embora a maior parte das fibras seja proveniente do tronco das árvores (parte lenhosa), elas também podem vir das folhas e dos frutos, como o sisal e o algodão, respectivamente (RUEDA, 2010). A constituição básica dos materiais lignocelulósicos é celulose, lignina, hemicelulose e constituintes menores como extrativos e cinzas.

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em parede primária (P), parede secundária (S1, S2 e S3) e parede terciária (T) (FENGEL; WEGENER, 1989).

As distribuições da celulose, hemicelulose e lignina variam entre as camadas da parede celular vegetal, apresentando geralmente teor elevado de celulose na camada S2, de hemicelulose entre S1 e a camada exterior de S2, enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média (FENGEL; WEGENER, 1989).

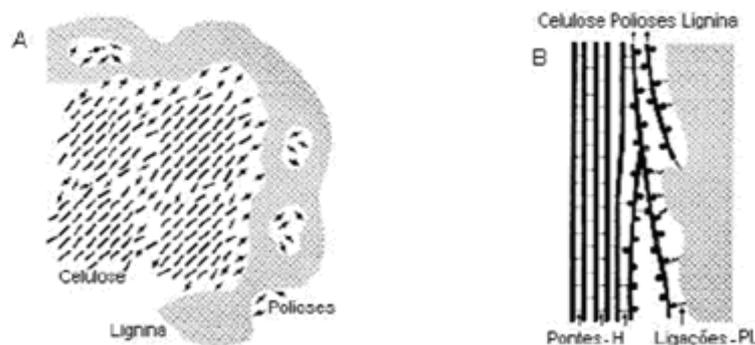
A Figura 2.1 mostra as camadas da parede celular e a lignina envolvendo as células. A Figura 2.2 apresenta o esquema da associação dos três principais componentes na parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose existe na forma de microfibrilas, e os microcapilares que circundam a armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina (RABELO, 2007).

Figura 2.1: Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M. L. lamela média.



Fonte: KIRK; CULLEN, 1998

Figura 2.2: Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal (). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.



Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989.

A hemicelulose liga-se a celulose através de ligações de hidrogênio estabilizando a parede celular e a lignina por meio de ligações covalentes. Acredita-se que as interações entre hemicelulose e microfibrilas de celulose sejam mais fortes que as interações entre as hemicelulose e ligninas. (WYMAN et al, 2005)

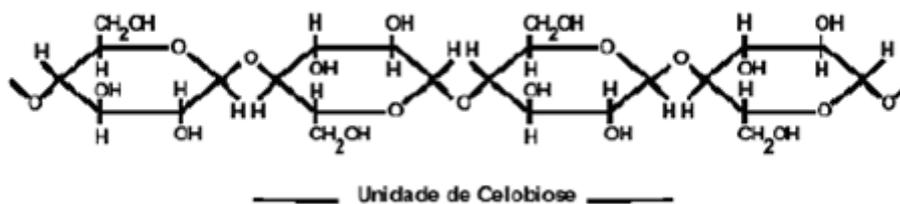
A presença da lignina confere rigidez e uma proteção natural à parede celular fornecendo resistência às pestes e às doenças e impedindo a hidrólise enzimática dos carboidratos. A celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (HINMAN et al, 1989; TAHERZADEH et al, 1999b; SREENATH; JEFFRIES, 2000).

2.2.1 Celulose

A celulose é a matéria prima mais abundante e está presente na estrutura básica das células de todas as plantas respondendo isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. (O’SULLIVAN, 1997).

É um polímero natural linear cuja unidade repetitiva é a celobiose, sendo um homopolissacarídeo (Figura 2.3, é constituída de unidade de β -Dglicopiranosose que se ligam entre si através dos carbonos 1-4, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. (RABELO, 2007).

Figura 2.3: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.



Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose constitui 20 a 30% das paredes celulares primárias e 40% das paredes celulares secundárias, sendo o composto orgânico mais abundante no mundo. Tipicamente cadeias de celulose apresentam grau de polimerização de 100 a 14000 resíduos. Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias com terminações redutoras (C1-OH) e não redutoras (C4-OH em equilíbrio com estrutura de aldeído) que, após hidrólise mais extensa, decompõem-se dando origem a celobiose e a glicose. (ATALLA et al, 1993).

A celulose possui uma estrutura linear ou fibrosa devido à presença sua cadeia linear dos grupos hidroxila (OH). Esses grupos são capazes de formar ligações do tipo pontes de hidrogênio em função do seu posicionamento na unidade glicosídica. As pontes de hidrogênio entre grupos OH de unidades glicosídicas adjacentes da mesma molécula de celulose são ligações intramoleculares, responsáveis por certa rigidez das cadeias unitárias formando a fibra vegetal, já as pontes de hidrogênio entre grupos OH de moléculas adjacentes de celulose, são as ligações intermoleculares, responsáveis pela formação das estruturas supramoleculares. (FENGEL; WEGENER, 1989).

Assim os tipos de interações entre as moléculas de celulose resultam em duas regiões: em uma região de forte interação e com grande número de ligações entre as moléculas de hidrogênio sendo então ordenada e conseqüentemente cristalina, conferindo a fibra de celulose maior resistência a tração, insolubilidade em solventes orgânicos, água, ácidos e álcalis diluídos, à temperatura ambiente. E uma região altamente ramificada e desordenada, sendo assim amorfa, conferindo a fibra maior flexibilidade. (FENGEL; WEGENER, 1989; KLOCK, 2010)

A estrutura cristalina da celulose foi primeiramente descrita por Mark e Meyer, em 1928. A cristalinidade pode ser estudada por várias técnicas como, por exemplo, raios-X, espectroscopia no infravermelho, Raman e outros (FENGEL; WEGENER, 1989; LAUREANO-PEREZ et al, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) e combinação de difração

de raios-X com cálculos de modelo indica que cadeias de celulose cristalina estão em conformação de duplas hélices, achatadas e estendidas. Pequenas variações nesta conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um bom número de polimorfos cristalinos, muitos dos quais podem ser interconvertidos por vários processos de tratamento. (O'SULLIVAN, 1997; MARK et al, 1928).

Sete formas cristalinas foram identificadas para celulose, e cada uma destas formas cristalinas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (MARK 1928; KADLA et al, 2000).

Essas regiões cristalinas e amorfas não possuem fronteiras bem definidas, mas parece haver uma transição de um arranjo ordenado das cadeias de celulose para um estado desordenado ou amorfo, no qual estas cadeias apresentam uma orientação menor. (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Há regiões amorfas devido aos inúmeros capilares e orifícios presentes possibilitam que, materiais gasosos, água e outros líquidos penetrem em suas fibrilas e microfibrilas (BALÁZSY; EASTOP, 1999), ocorrendo o intumescimento das fibras de celulose. (absorção e inchamento da molécula), isso é mais difícil de ocorrer nas regiões cristalinas, pois a forte rede de ligações de hidrogênio impede o inchamento. Uma fibra seca exposta a uma umidade relativa do ar de 100% pode ter o seu diâmetro aumentando de 20-25 % devido à absorção de água (ANNUNCIADO, 2005). A extensão do intumescimento varia de fibra para fibra e de acordo com o agente de intumescimento. (FENGEL; WEGENER, 1989). Normalmente, quanto maior a polaridade do agente intumescedor, maior será a extensão deste fenômeno, porém a água é a que causa maior intumescimento, sendo seu poder aumentado pela adição de ácidos, bases e sais inorgânicos, bases orgânicas (BROWNING, 1963).

A maioria dos polissacarídeos encontrados em paredes celulares vegetais pertence à celulose, hemicelulose ou classes de pectinas. Ainda que a celulose funcione como o componente rígido e sustentador de peso da parede celular, a rigidez da microfibrila celulósica é reforçada dentro de uma matriz de hemicelulose e pectinas.

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada. Os constituintes monoméricos da hemicelulose são pentoses (xilose, arabinose), galactose e ácidos urônicos (Figura 2.4) (HOLTZAPPLE, 1993).

Hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas. (WYMAN et al, 2005). Dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos, várias subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, incluindo glucuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glicomananas, galactomananas, galactoglicomananas, β -glucanas e xiloglucanas (OGEDA, 2010). A unidade mais abundante na hemicelulose é a xilose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4.

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina, e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando a estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Elas estabilizam a parede celular através de interações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes com a lignina (WYMAN et al, 2005). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam baixo grau de polimerização (50 a 300), não formam arranjo fibroso e apresentam somente regiões amorfas possibilitando maior acesso e suscetibilidade à hidrólise ácida (SCHUERCH, 1963; FENGEL; WEGENER, 1989).

A maior parte das hemiceluloses pode ser extraída por tratamento com soluções aquosas e alcalinas sendo de hidróxido de sódio e potássio as mais utilizadas para a extração (FENGEL; WEGENER, 1989).

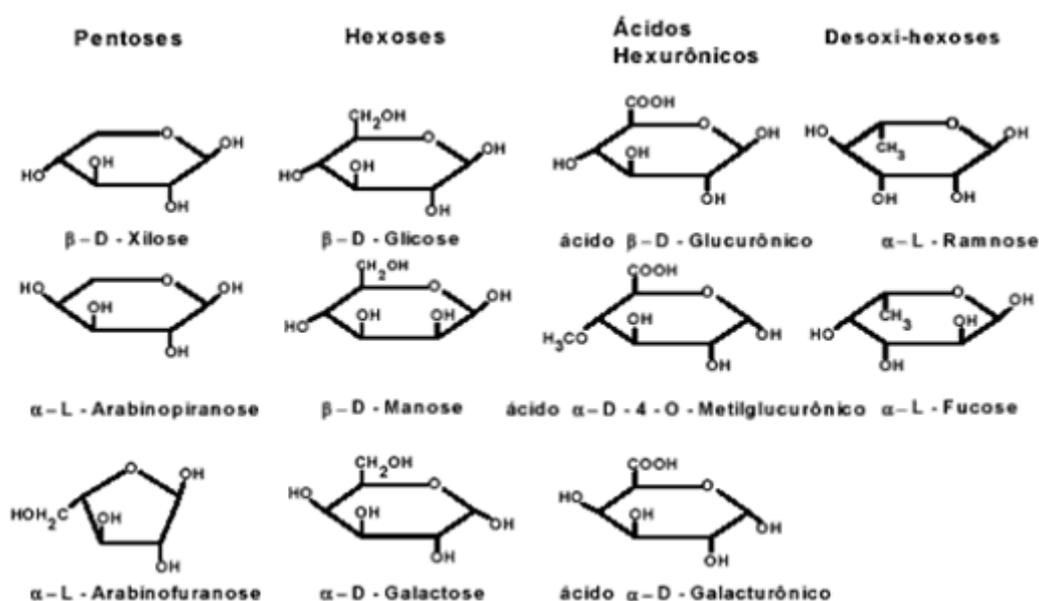
Acredita-se que as hemiceluloses estejam envolvidas na regulação da alongação e modificação da parede, e que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas. (WYMAN et al, 2005). Geralmente as hemiceluloses estão quimicamente associadas ou reticuladas a outros polissacarídeos, como proteínas ou ligninas.

Além da celulose, as β -glucanas e xiloglucanas possuem um importante papel na estrutura e função da parede celular porque estão envolvidas no suporte e reticulação da

matriz celulósica através de ligações de hidrogênio com a celulose, com outras hemiceluloses e pectinas. (WHITNEY et al, 1999; FUJINO et al, 2000).

Os grupos laterais de xilanas podem ter um papel importante na ligação de ligninas com hemicelulose. (ERIKSSON et al, 1980; HARTLEY; FORD, 1989) Grupos secundários, especialmente substituintes acetilas, afetam propriedades físico-químicas e biodegradabilidade das hemiceluloses solúveis ou presas à matriz. A acetilação aumenta a solubilidade do polissacarídeo em água, desfavorecendo o estado agregado. (MATSUO et al, 1974; BIELY et al, 1985).

Figura 2.4: Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.



Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989.

2.2.3 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Ao contrário da celulose, que ocorre em todas as plantas, a lignina só ocorre em plantas vasculares que desenvolvem tecidos especializados em funções tais como transporte de soluções aquosas e suporte mecânico. (FENGEL; WEGENER, 1989)

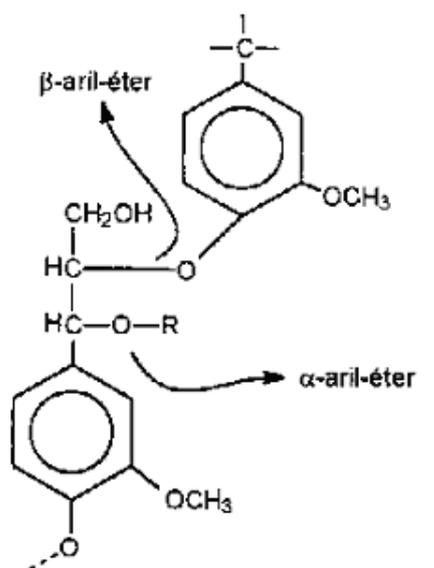
A estrutura da lignina não é bem conhecida sendo bastante heterogênea, consistindo numa rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil- aril-éter

(ligação β -O-4) (Figura 2.5) formando uma estrutura amorfa e pouco flexível. (FENGEL; WEGENER, 1989)

Sua estrutura molecular composta por unidades de fenilpropano formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico.

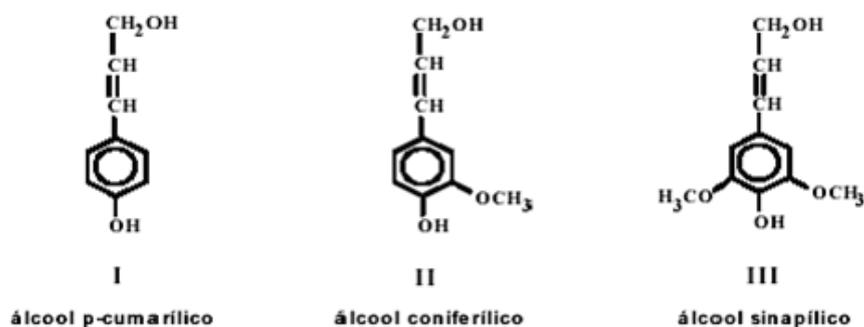
O mecanismo de biossíntese da lignina se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmílicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 2.6), que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente. (FENGEL; WEGENER, 1989)

Figura 2.5: Ligações α - e β -aril éter da macromolécula de lignina.



Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989.

Figura 2.6: Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico.



Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989.

A lignina sendo um material hidrofóbico e amorfo atua como um cimento entre as fibrilas e como um agente enrijecedor no interior das fibras. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose. (SILVA et al, 2009)

A lignina da mesma forma que a hemicelulose, começa a dissolver aproximadamente a 180 °C em condições neutras (BOBLETER, 1994). Devido a seu caráter hidrofóbico é solúvel em solvente orgânico, a quente. A solubilidade da lignina em ácido, ou meios neutros ou alcalinos depende dos precursores da lignina (GRABBER, 2005).

A lignina é bastante resistente a hidrólise ácida, porém quando tratada com soluções alcalinas a temperaturas elevadas podem ocorrer rupturas nas ligações éter entre as unidades de fenil propano, formando grupos fenólicos responsáveis por sua solubilização. As ligninas estão associadas aos polissacarídeos presentes nas paredes celulares, não só através de interações físicas como também de ligações químicas e devido a isso durante a sua degradação ocorre a degradação parcial das polioses (BENAR, 1992), resultando em lignina com porções de polissacarídeos que não podem totalmente separados. (FENGEL; WERGNER, 1989).

2.2.4 Outros componentes: extrativos

Os extrativos são compostos orgânicos e compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, que não fazem parte da parede celular lignocelulósica. Sua ocorrência varia de acordo com a espécie vegetal e podem ser extraídas utilizando solventes polares e apolares. Estas substâncias são terpenos/terpenóides, ácidos graxos, esteróides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta como: cor, sabor, cheiro e resistência natural ao apodrecimento (BROWNING, 1963; ANNUNCIADO, 2005)

A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.3 A cana-de-açúcar

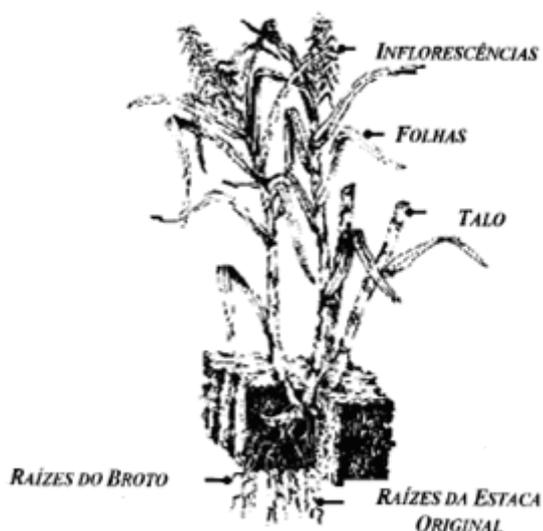
A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma das seis espécies do gênero *Saccharum*. É originária da Índia e introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país. Hoje, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido de planta original com outras espécies da mesma família (JOAQUIM, 1997).

A composição química da cana é bastante variável quanto à proporção dos elementos; porém, quantitativa e qualitativamente, exhibe regularidades em todas as variedades. (SCHLITTLER, 2006)

Como a maior parte das plantas, a cana-de-açúcar apresenta um eixo principal, denominado talo, de onde emergem as raízes, as folhas e as inflorescências (Figura 2.7).

Dos constituintes da cana-de-açúcar, apenas o talo vem apresentando valor econômico por sua capacidade de acumulação de açúcares e produção de fibras.

Figura 2.7: A Cana-de-açúcar.



Fonte: TRIANA et al, 1990.

A cana consiste de vários tipos de tecidos como o córtex constituído por fibras com alto teor de lignina atuando como suporte para a planta devido à espessura da parede celular e rigidez das fibras; tecido parenquimatoso localizado no talo tendo como principal função o armazenamento de seiva produzida pela planta; e hastes fibrovasculares compostas

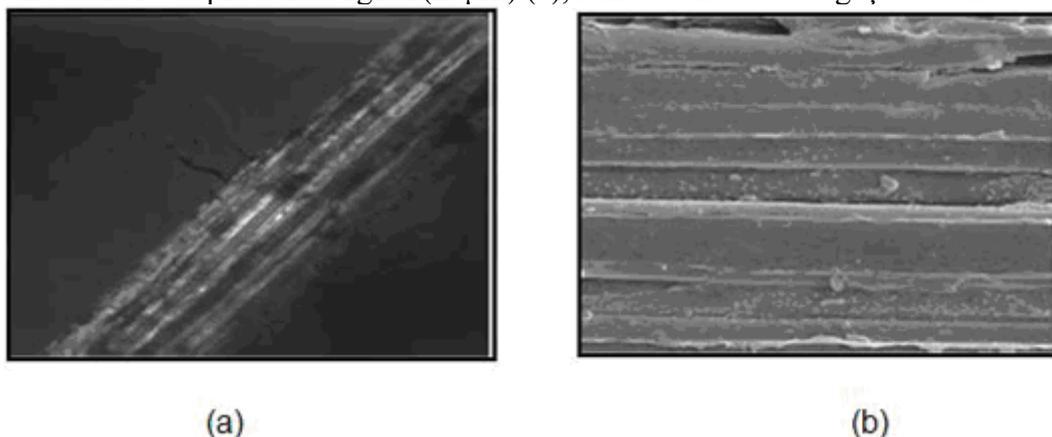
de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos alimentos e outros produtos ao longo da planta (PATURAU, 1989).

2.3.1 O Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto do último moinho das usinas e destilarias, constituído de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm, apresentando um tamanho médio de 20 mm, com aproximadamente 30% de massa de cana e umidade em torno de 50%. (SCHLITTLER, 2006). A morfologia do bagaço se encontra relacionada com a estrutura da cana, onde se encontram fibras exteriores do colmo ou da casca, feixes fibrovasculares e outras formas fibrosas que dão resistência ao colmo vegetal. A figura 2.8 mostra a microscopia ótica digital e eletrônica de varredura da estrutura da fibra do bagaço.

A composição química do bagaço depende das condições climáticas a que esteve exposta a cana como também do tipo de microrganismos. Segundo Banerjee e Pandey (2002) o bagaço de cana de açúcar apresenta 32-48 % de celulose, 19-24 % de hemicelulose, 23-32% de lignina, 3,2 a 5,5 % de cinzas.

Figura 2.8: Microscopia Ótica digital (20 μ m) (a), MEV da fibra do bagaço de cana.



Fonte: SCHLITTLER, 2006

Nos anos 2008/2009 a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 350 usinas, processou $5,69 \times 10^8$ toneladas de cana para produzir 9×10^6 mil litros de etanol anidro e 18×10^6 mil litros de etanol hidratado no Brasil. A quantidade de cana

processada gerou cerca de 1×10^{12} kg de bagaço (base úmida) (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2010). Em geral o processamento de uma tonelada de cana de açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço com 50% de umidade. Dessa forma, para cada tonelada de cana produzida (base seca) têm-se 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (novo resíduo devido à proibição da queima da palha de cana), e segundo dados da safra 2008/2009 o Brasil está acumulando aproximadamente 130 milhões de toneladas de resíduos (palha e bagaço de cana) (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2010).

A principal utilidade do bagaço de cana é tornar o processo da usina auto-suficiente em energia elétrica, por meio da sua queima em caldeiras, as quantidades remanescentes de bagaço podem ser utilizadas em inúmeros processos industriais como fabricação de papéis/móveis, alimentação animal, processos de compostagem e na produção de furfural. (BERTONCINI, 2008).

Segundo Gámez et al, (2006), a utilização do bagaço excedente viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool para a produção do etanol lignocelulósico, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo.

2.3.1.1 Características do processamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana resultante do processo de açúcar e do etanol de primeira geração se encontra em pequena granulometria, devido ao pré-tratamento físico prévio (moagem). Por apresentar uma baixa densidade e baixo grau de compactação, apresenta dificuldades em relação à alimentação do reator e a condução do pré-tratamento com elevado teor de sólidos (acima de 50%), sendo necessária compactação (BAUDEL, 2006).

O bagaço de cana apresenta elevada capacidade de absorção de líquidos, em uma proporção muito maior que seu próprio peso (PATURAU, 1968). Essa característica, juntamente com a reduzida dureza e a umidade de cerca de 50% do bagaço de cana proveniente da moenda facilitam à impregnação adequada da substância química a ser utilizada no pré-tratamento.

A obtenção de elevada eficiência no tratamento com soluções ácidas, necessita de quantidades adequadas de água; tanto para a dissociação do ácido e formação do íon hidroxônio (H_3O^+), como também, para promover o transporte desse íon para o interior da biomassa. (BAUDEL, 2006).

Dentre os diversos métodos existentes para realizar o pré-tratamento da biomassa é necessário estar atento as condições do procedimento (grau de severidade do procedimento), que devem ser conduzidas sob condições moderadas visando promoverem elevada reatividade das fibras celulósicas, elevada recuperação de hemicelulose, mínima perda de glicose no hidrolisado e mínima geração de compostos inibidores às etapas posteriores de hidrólise e fermentação (BAUDEL, 2006).

2.3.2 Produtos da Biorrefinaria – Etanol e XOS.

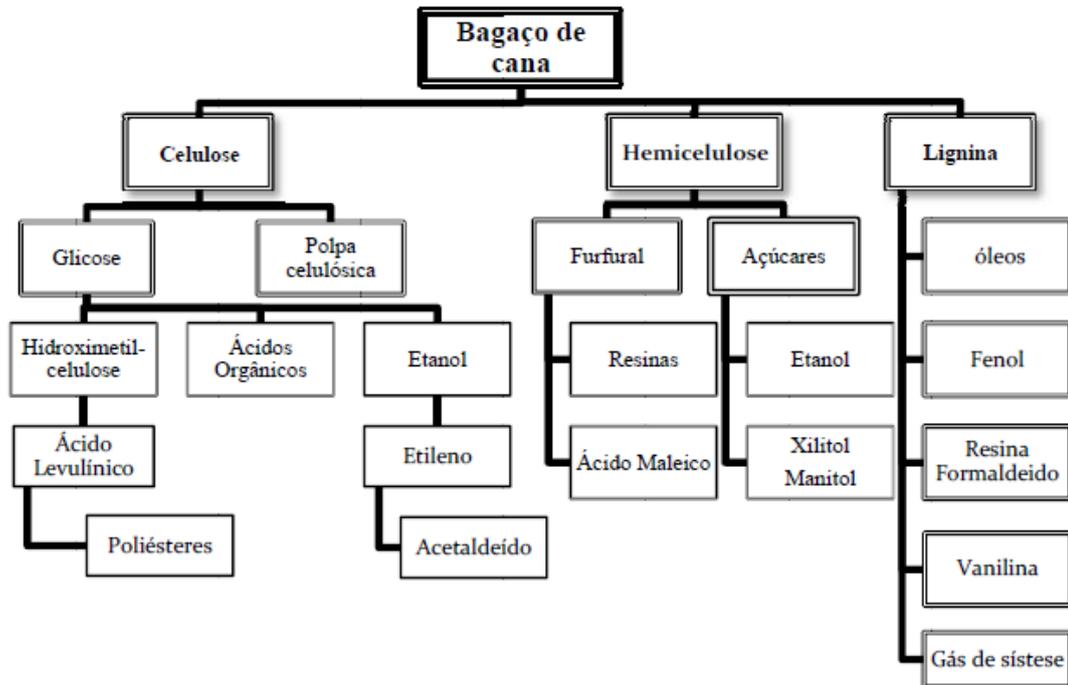
Com a tendência industrial na adoção de tecnologias renováveis e mais limpas para a redução da poluição ambiental, a biorrefinaria surge como conceito potencial de aproveitamento biotecnológico de biomassa e viabilização do desenvolvimento e crescimento econômico sustentável; implicando em vantagens nos aspectos ambientais, sociais e econômicos.

Uma biorrefinaria, similar à sua análoga para o petróleo, pode ser definida como um complexo integrado capaz de produzir diferentes produtos (combustíveis, químicos e eletricidade) com base em diferentes biomassas (BIOETANOL, 2008), processando por completo a biomassa e gerando produtos de alto valor agregado.

Um exemplo de biorrefinaria é uma usina de cana-de-açúcar com a produção combinada e integrada de açúcar, bioetanol e alguns outros produtos químicos, assim como potência e calor com base na biomassa residual (MACEDO; NOGUEIRA, 2005).

Na figura 2.9 são mostradas as diferentes possibilidades de utilização do excedente do bagaço de cana visando à montagem de uma biorrefinaria.

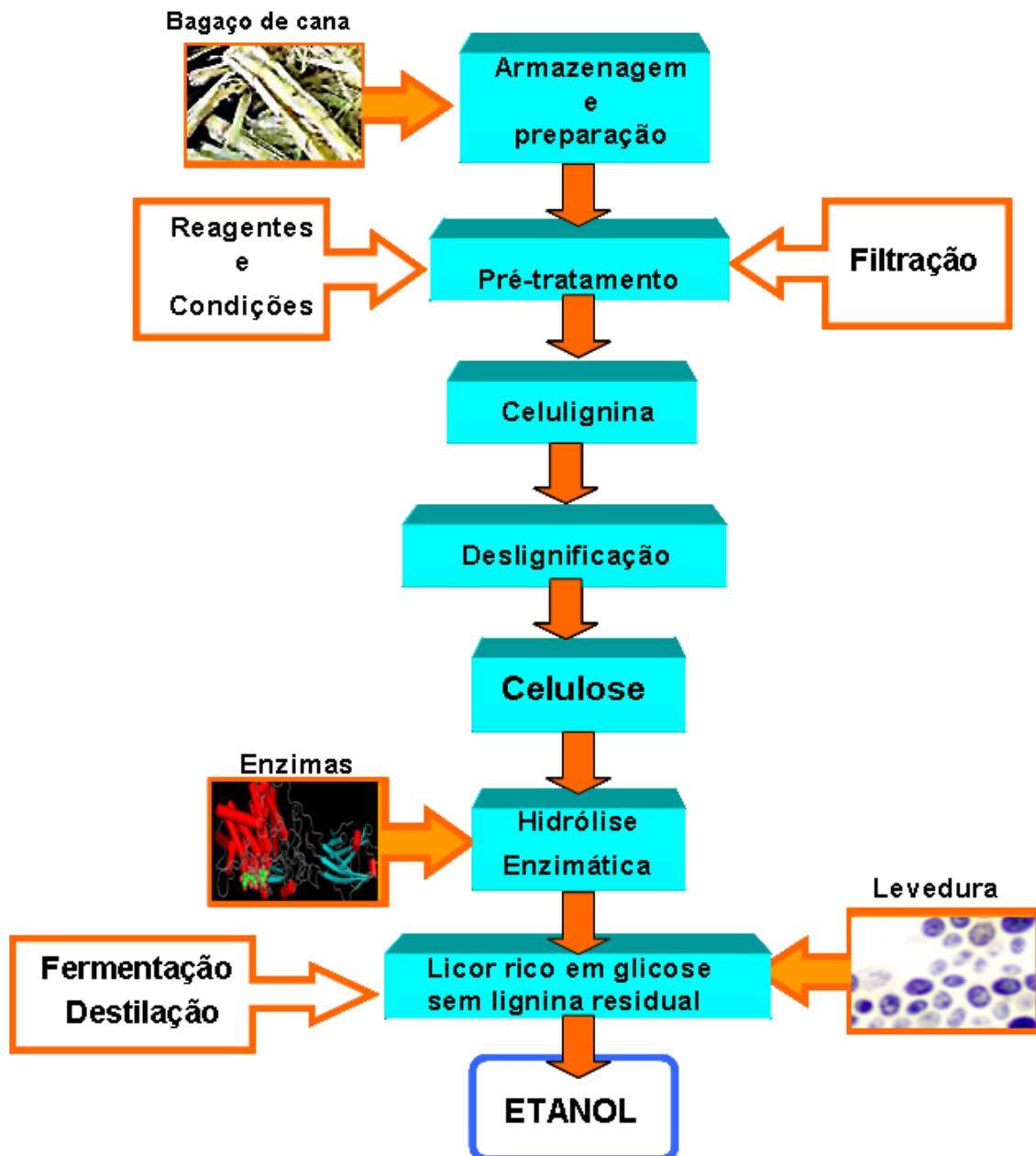
Figura 2.9: Esquema de uma biorrefinaria. Diversidade de opções na utilização das frações do bagaço.



Fonte: SCHUCHARDT et al, 2001.

O etanol de segunda geração consiste no aproveitamento dos subprodutos da produção de álcool e açúcar denominada primeira geração. Devidos às propriedades inerentes da lignocelulose, que representam uma barreira a ações de enzimas e microrganismos, é preciso romper essa complexa matriz lignocelulósica, visando separação dos polímeros e aumento da acessibilidade do catalisador da hidrólise à celulose. Para isso, anteriormente à hidrólise, o material lignocelulósico deve ser submetido aos chamados pré-tratamentos. A Figura 2.10 apresenta o esquema da produção de etanol de segunda geração.

Figura 2.10: Esquema representativo das etapas de produção do etanol de celulose de bagaço de cana de açúcar, utilizando hidrólise enzimática.



2.2.2.1 Xilooligossacarídeos- XOS

A xilana é um polissacarídeo de grande abundância na natureza e o principal componente hemicelulósico das plantas, depois da celulose (KULKARNI; SHENDYE 1999). Essa abundante fonte de carbono tem na última década atraindo o interesse de muitos

pesquisadores devido a uma potencial aplicabilidade em setores industriais e biotecnológicos. (KULKARNI; SHENDYE, 1999; COLLINS et al, 2002).

Segundo Menezes, (2008) os xilooligosacarídeos (XOS) são oligômeros não digestíveis e considerados como ingredientes em alimentos FOSHU (food for specified health use) pelo Ministério da Saúde do Japão, com uma produção mundial em 1995 de cerca de 300 toneladas, sendo metade consumida no Japão (SAKO et al, 1999).

Os XOS são formados por unidades de xilose, (2-5 unidades) que são encontrados na forma livre em frutas, vegetais, leite e mel, (HIRAYAMA, 2002; ALMEIDA; PASTORE, 2004) e são atualmente reconhecidos por inúmeras aplicações como ingredientes de cosméticos, medicamentos, produtos agrícolas (CANO et al, 2006; KIYOHARA et al, 2006) e pelos benefícios a saúde humana diminuindo os níveis de açúcares no sangue e o metabolismo das gorduras. (MONSAN; PAUL, 1995; ALONSO et al, 2003). Também são considerados prebióticos, ou seja, “deve ser resistente a digestão, a absorção intestinal, ser fermentável pela microflora gastrointestinal e ter propriedade de estimular seletivamente certos tipos de bactérias no sistema gastrointestinal.” (AKPINAR et.al, 2007, GOLDMAN, 2009). Dentre suas propriedades estão: aumento da atividade biológica do cálcio no organismo, atividade imunológica com efeito antitumoral, etc.

O leite humano contém oligossacarídeos que promovem a proliferação de determinadas espécies de bifidobactérias. Nos últimos anos, a procura de uma fórmula ideal de probióticos e Prebióticos em alimentos para crianças na fase de lactação tem sido crescente (PUCCIO et al, 2007).

A eficiência de cada oligossacarídeo como prebiótico depende da sua estrutura e constituição químicas. (HU et al, 2006).

São muitos os tratamentos descritos na literatura, testados para a extração de xilana de materiais lignocelulósicos visando produção de xilooligosacarídeos, como extração alcalina, auto-hidrólise (ou hidrotermal) e organosolv. A etapa de purificação da xilana extraída torna-se fundamental para a produção de xilooligosacarídeos, o que implica cuidadosa seleção de tecnologias empregadas em sua produção, visto que sua utilização é viável comercialmente próximo a 95% de pureza (RASTALL, 2010).

Extração alcalina: baixas concentrações de solventes em condições amenas de reação são preferenciais neste caso, cujas vantagens são altas extração de hemicelulose, alta remoção da lignina e aumento da digestibilidade da celulose com baixa produção de compostos inibidores (YOON et al, 2006; ZHU et al, 2006). O processo mais empregado é o uso de NaOH em concentrações de 1 a 5 M a temperaturas entre 25 e 60°C

Auto-hidrólise: neste processo ocorre a formação de ácido acético devido à hidrólise dos grupos acetila contidos na hemicelulose, hidrolisando os componentes da biomassa vegetal. Quando ácido é utilizado na extração, há maior solubilização da hemicelulose, porém com geração de grande quantidade de monômeros (xilose) e co-produtos indesejáveis (furfural, hidroximetil-furfural, ácidos orgânicos). (AKPINAR et al, 2007; RIVAS et al, 2002).

Tratamentos por organosolv: a utilização de solventes orgânicos, principalmente o etanol e o metanol, com emprego de altas temperaturas caracteriza o organosolv, considerado como uma das opções promissoras a serem empregadas nas biorefinarias (lignocelulósicos). Neste processo, há separação dos três componentes principais da lignocelulose, sendo a recuperação delas possível como lignina seca, hemicelulose com alto grau de polimerização e uma fração celulósica relativamente pura (ZHAO; LI, 2009).

Após ser extraída a xilana pode ser convertida em oligossacarídeos por meio de dois tipos de hidrólise: ácida ou enzimática. A hidrólise ácida é uma técnica mais rápida, mas é um processo de degradação não seletivo, gerando oligossacarídeos de diferentes tamanhos (SCHMID et al, 2001), ocorre à formação de compostos tóxicos que impedem subsequente fermentação microbiana, além de corroer equipamentos metálicos que ficam em contato com o ácido (POLIZELI et al, 2005).

Desse modo, a hidrólise enzimática além de ser mais específica, pode contornar estes problemas, trazendo novas perspectivas no tratamento de resíduos hemicelulósicos. Devido à heterogeneidade e complexidade da xilana, sua completa hidrólise requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente.

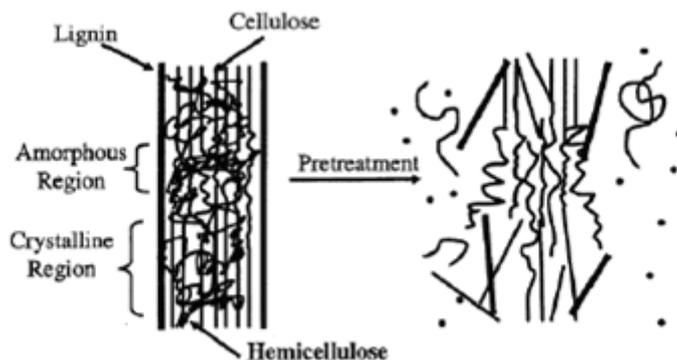
2.4 Pré-tratamento

Na biomassa lignocelulósica a associação entre os três constituintes majoritários faz com que esta seja resistente à bioconversão dificultando o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos como fonte de carboidrato para produtos químicos e combustíveis. Um processo de hidrólise enzimática com prévia etapa de pré- tratamento tem o seu rendimento aumentado de 20% para 90% (NOJIRI, 2009).

Em vista disso, a etapa de pré-tratamento dos resíduos agrícolas, antes da hidrólise é imprescindível para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares

fermentescíveis (CHANG et al, 1998), como representado no diagrama esquemático da Figura 2.11

Figura 2.11. Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de HSU et al, 1980.

A resistência da biomassa é explicada por vários fatores como a cristalinidade da celulose, a proteção da celulose pela lignina e pela hemicelulose e a área superficial (RYDHOLM, 1965; HSU, 1996; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000), isto é o relacionamento entre os fatores estruturais e composicionais que refletem a complexidade dos materiais lignocelulósicos.

O propósito de um pré-tratamento é ser seletivo e funcional garantindo a acessibilidade da celulose, ser eficiente em termos de rendimento, evitar a degradação de carboidratos, apresentar consumo reduzido de energia e insumos. O processo deve ter qualidade com higiene, simplicidade e segurança e que evite ou minimize a geração de compostos inibidores aos microrganismos usados na fermentação e às enzimas (BAUDEL, 2006), além disso, deve contemplar fatores econômicos como o custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de este ser reciclável e a possibilidade de aproveitamento de co-produtos da lignina de alto valor agregado (LADISCH et al, 1983; DELGENES et al, 1996; WYMAN, 1995; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a, b).

O pré-tratamento é uma das etapas do processo mais custosas na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e dentre as várias opções de pré-tratamentos existentes na literatura os fatores citados anteriormente são uma base de comparação para a escolha de um processo eficiente e de baixo custo. (LEE et al, 1994; MOSIER et al, 2003a, b).

O pré-tratamento do bagaço é de extrema importância para o fracionamento dos três componentes, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da

hemicelulose e da lignina, expondo as fibras de celulose e tornando esta mais acessível ao ataque das enzimas. (HAHN-HÄGERDAL et al, 2006; PANDEY et al, 2000).

2.4.1 Tipos de pré-tratamento

A degradação enzimática da celulose está diretamente relacionada ao teor de lignina e a sua disposição nas fibras da biomassa. Para a enzima celulase catalisar a hidrólise da celulose, deve existir um contato direto entre as microfibras da celulose e o complexo enzimático, de forma que a taxa de hidrólise enzimática da celulose é profundamente afetada pela estrutura do material lignocelulósico. Diferentes métodos de pré-tratamento têm sido desenvolvidos para fragmentar a matriz que a hemicelulose e a lignina formam em torno da celulose aumentando assim a susceptibilidade da biomassa as celulasas. (MCMILLAN, 1994).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica pode ser organizado em várias categorias como os pré- tratamentos físicos (ex. moagem), físico-químico (ex. autohidrólise), químicos (ex. ácidos, agentes oxidantes, bases), biológicos, elétricos ou uma combinação deles (KUMAR et al, 2009).

As operações físicas de pré-tratamento utilizam apenas energia mecânica e permitem a redução do tamanho da partícula através de moagem ou trituração, aumentando a superfície específica e causando a quebra de ligações de longas cadeias moleculares diminuindo assim o grau de polimerização. (FAN et al, 1982; LASER et al, 2002; ZACCHI, 2006; SOUSA et al, 2009)

Os pré-tratamentos químicos são os mais utilizados, pois são os mais eficientes no aumento da digestibilidade da biomassa. (FAN et al, 1982).

Dentre os pré-tratamentos químicos têm-se os ácidos, alcalinos ou oxidativos, que diferem entre si nos tipos de química e mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, para a melhoria de rendimentos e acesso da enzima a celulose.

A literatura relata a utilização de álcalis ou ácidos para extrações seletivas de componentes não-celulósicos (lignina e hemicelulose) sendo os mais promissores o vapor d'água, ácido sulfúrico diluído, amônia e hidróxido de sódio. O tratamento com vapor (explosão a vapor) consiste em tratar a matéria prima com vapor saturado, sob alta pressão a

temperaturas elevadas entre 160 e 240°C por até 20 minutos, seguida de uma rápida descompressão resultando em uma mistura denominada de “slurry” de cor marrom devido à fragmentação da biomassa, promovendo transformações químicas e físicas na estrutura lignocelulósica do bagaço (BAUDEL, 2006).

No processo de pré-tratamento com ácido diluído tem-se uma elevada reatividade da fibra apresentando cerca de 90% de digestibilidade enzimática. Contudo, além de requerer configurações de equipamentos complexos e resistentes, demanda elevado consumo de água e energia (BAUDEL, 2006; MARTÍN et al, 2007).

Segundo Martín et al, (2007), o uso conjunto de solução ácida com explosão a vapor leva à formação de alguns subprodutos que interferem, posteriormente, no processo de fermentação do hidrolisado, tais como ácido acético, formado pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulose; ácidos fórmicos e levulínicos, produtos de degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da fração lignina; e furaldeídos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente.

O pré-tratamento alcalino promove intensa deslignificação da biomassa aumentando a reatividade da fibra, utiliza temperaturas e pressões moderadas em relação às utilizadas no pré-tratamento ácido e apresenta baixo custo dos reagentes mais utilizados geralmente utiliza-se soda ou cal. (BAUDEL, 2006).

Os pré-tratamentos biológicos utilizam microorganismos, normalmente fungos e algumas bactérias (FAN et al, 1987). Os micro-organismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que degradam determinadas frações da biomassa, a vantagem desse tipo de pré-tratamento é a baixa energia requerida, mas a taxa de hidrólise ainda é baixa (BOOMINATHAN; REDDY, 1992; SUN; CHENG, 2002; BINOD et al, 2010).

Os pré-tratamentos combinados utilizam a combinação de mais de um tipo de pré-tratamento, e causa a solubilização diferencial e o fracionamento dos vários componentes da parede celular vegetal, incluindo a celulose, pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibras (HEINZE; KOSCHELLA, 2005). Exemplos desses métodos são os processos organosolv, fracionamento por ácido fosfórico (ZHANG et al, 2007) e os baseados em líquidos iônicos (SOUSA et al, 2009).

Uma comparação direta dos rendimentos resultantes de açúcar pelos métodos de pré-tratamento conhecidos é difícil devido às variações de como os rendimentos são relatados e quais açúcares estão incluídos. A Tabela 2.2 sumariza as vantagens e desvantagens de cada um deles.

Tabela 2.2: Sumário das vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de pré-tratamento e hidrólise de material celulósico.

Pré-tratamento	Método	Condições	Vantagens	Desvantagens	Referências
Físico	Moagem e trituração		<ul style="list-style-type: none"> • Reduz o tamanho da partícula • Reduz a cristalinidade • Quebra de ligações de longas cadeias 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto gasto energético • Não retira a lignina 	LASER et al, 2002
Combinado	Explosão a vapor	Vapor saturado alta pressão 160 - 240 °C até 20 minutos rápida descompressão	<ul style="list-style-type: none"> • Ruptura das ligações de lignina e hemicelulose à celulose. • Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose • Redução da partícula da biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda de hemiceluloses no “slurry” • Uma etapa adicional é necessária para remover a lignina. 	SADDLER et al, 1993 MC MILLAN,1994 HSU, 1996 TENGBORG et al, 1998
Biológico		Degradação das frações por fungos ou bactérias	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa energia requerida, condições brandas • Remove quantidade considerável de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior tempo de residência • Bactérias e fungos consomem um pouco do carboidrato disponível (menor rendimento) 	SUN & CHENG, 2002; BINOD et al, 2010
Químicos	Ácido diluído	H ₂ SO ₄ de 0,05% a 0,07% 140 a 200°C	<ul style="list-style-type: none"> • Bom rendimento de glicose e de açúcares de hemicelulose. (hidrólise de 80 a 95% da fração hemicelulósica) • Elevada reatividade da fibra 	<ul style="list-style-type: none"> • Formação de produtos de degradação • Concentração baixa de açúcar na corrente de saída. • Necessidade de equipamentos especiais • Necessidade de neutralização do hidrolisado para subsequente fermentação 	BAUDEL, 2006 MARTÍN et al, 2007

	Alcalino	NaOH	<ul style="list-style-type: none"> • Quebra das ligações Ester → ruptura e remoção da lignina da biomassa • Aumento da porosidade do material • Aumento da reatividade da fibra • Aumento da superfície interna • Diminuição do grau de polimerização • Xilose na forma polimérica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Xilose na forma polimérica • Difícil recuperação do álcali • Alto consumo de água 	SUN;CHENG, 2002 SUN et al, 2004. BAUDEL, 2006.
--	----------	------	---	---	--

Fonte: Adaptado de OGEDA et al, 2010.

2.4.1.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio

O álcali é visto como um agente de inchamento onde a base age indiretamente, sendo a água o agente de quebra (KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2001). Pelo inchaço da biomassa, a superfície é aumentada proporcionando maior abertura da estrutura e facilitando a migração da água para dentro do material. Uma vez dentro da biomassa, a água rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato (BALAT et al, 2008). O efeito é a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina através da quebra das ligações aril-éter.

As vantagens do uso do álcali sobre os métodos ácidos são as condições mais amenas e a remoção da fração de lignina, sem a degradação dos outros componentes importantes. (BALAT et al, 2008). Os principais reagentes utilizados para pré-tratamento alcalino são hidróxido de sódio, amônia, etileno diamina (DETROY et al, 1981) e hidróxido de cálcio. A eficiência dessas bases depende da quantidade de lignina presente nos materiais (MC MILLIAN, 1994). O tratamento alcalino requer temperaturas e pressões mais baixas que outros tipos de tecnologias de pré-tratamentos. (MOSIER et al, 2005)

Segundo Elshafei et al, (1991), comparado com o processo ácido, o processo alcalino causa menos degradação de açúcares, e muitos dos sais utilizados podem ser recuperados e reutilizados.

Kim, (2006) relata que a hidrólise enzimática de uma biomassa tratada com base é afetada pelas características estruturais da biomassa resultante do pré-tratamento. O pré-tratamento remove substâncias amorfas (lignina e hemicelulose).

Segundo Kim, (2006) um tratamento lignocelulósico efetivo deveria remover todos os grupos acetil e reduzir a quantidade de lignina a 10%. A remoção da lignina aumenta a efetividade da enzima eliminando sítios de adsorção que não são produtivos e aumentando o acesso para celulose e hemicelulose.

A tabela 2.3 coloca algumas referências com trabalhos com pré-tratamentos alcalinos.

Tabela 2.3: Alguns trabalhos da literatura com pré-tratamento alcalino.

Matéria prima	Condições	Resultados	Referencia
Bagaço de cana	Alkali 192 h T ambiente.	<ul style="list-style-type: none"> Aumentou a digestibilidade da celulose de 20% para 72% após pré-tratamento 	PLAYNE, 1984
Sequeiras de algodão	Relação sólido líquido 10% (w/v) Pré-tratamento com H ₂ SO ₄ , NaOH, e H ₂ O ₂ nas concentrações 0.5%, 1% e 2% (m/v), nas temperaturas 90 °C e 121 °C com 15 psi Nos tempos de 30, 60, e 90 min.	<ul style="list-style-type: none"> O NaOH resultou no maior nível de deslignificação na condição (65,63 % para 2% de NaOH, 90 minutos, 121°C/ 15 PE) A conversão de celulose foi de 60.8% 	SILVERSTEIN et al, 2007.
Palha de milho	0.5g Ca (OH) ₂ / g de biomassa condições oxidativas e não oxidativas a 25, 35, 45 e 55°C.	<ul style="list-style-type: none"> Diminuição da cristalinidade com a retirada da lignina Deslignificação de 60% Remoção e solubilização de lignina e hemicelulose Não ocorreu degradação de celulose entre 25- 55°C. 	KIM et al, 2006
Gramínea (<i>switchgrass</i>)	NaOH Temperatura: 121 50 e 21°C Relação sólido-líquido: 0.1g/mL (0.25- 1, 1-48 e 1-96 horas Concentração de NaOH (0.5, 1.0, 2.0 % massa/ volume) (Cellulase 15 FPU/g biomassa seca e cellobiase 20 CBU/g biomassa seca)	<ul style="list-style-type: none"> Melhor condição (50°C, 12 h, e 1.0% NaOH). A redução da lignina foi 85.8% para 121°C, 77.8% para 50°C e 62.9% com 21°C. Na hidrólise enzimática atingiu-se 453mg de açúcares redutores totais por g de biomassa bruta. (3,78 vezes maior que a biomassa não tratada) 	XUT et al., 2010
Coastal Bermuda Grass	NaOH 0.5% to 3% (m/v) Tempo: 15 a 90 min. 121 °C.	<ul style="list-style-type: none"> A condição ótima foi a 121 °C, 15 min. e 0.75% NaOH. Com remoção de 86% de lignina e conversão enzimática em glicose de 90,4% e em xilose de 65,11%. 	WANG et al, 2010

2.4.1.2 Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento consiste em tratar a biomassa com ácidos diluídos para conseguir a solubilização da hemicelulose, e se obter uma celulose mais acessível. O

material é imerso em uma solução de ácido de aproximadamente 4% (p/p) e aquecido em temperaturas na faixa de 140 a 200 °C por períodos de tempos curtos (10 min. - 1 h). Diferentes reações ocorrem durante os pré-tratamentos ácidos; uma delas é a hidrólise das hemiceluloses, especialmente das xilanas e das glicanas, dando origem à produção de compostos tóxicos para a fermentação como o furfural e hidroximetilfurfural. (PALMQVIST et al, 2000b).

Uma vantagem do pré-tratamento ácido é a solubilização de hemicelulose, entretanto existe o risco de formação de produtos voláteis de degradação do carbono e estes, em muitos casos, diminuem a conversão a etanol. A condensação e a precipitação de componentes de lignina solubilizada é uma reação indesejada, uma vez que diminui a digestibilidade. Pré-tratamentos com ácido concentrado para a produção de etanol não são processos atrativos, devido ao grande risco de produção de componentes inibidores pela degradação de carboidratos.

2.4.2 Formação de inibidores na etapa do pré-tratamento

Componentes inibitórios podem ser classificados em dois grupos: inibidores presentes na biomassa e inibidores produzidos na etapa do pré-tratamento. Os inibidores presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Exemplos de pré-tratamentos que produzem inibidores devido às condições drásticas são os pré-tratamentos ácidos combinados com altas temperaturas, devido à degradação dos açúcares e da lignina e à produção de ácidos orgânicos. Da degradação da xilose resulta o furfural e da degradação das hexoses o inibidor produzido é o 5-hidroximetilfurfural (HMF), os quais são produtos inibitórios bastante conhecidos para a etapa da fermentação (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Com a degradação destes inibidores, são formados o ácido fórmico e levulínico.

Com as altas temperaturas empregadas nos pré-tratamentos, os açúcares, principalmente da hemicelulose, se degradam em derivados do furano: furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados a partir da degradação de xilose e arabinose, e da glicose, manose e galactose respectivamente.

O furfural ainda pode se degradar a ácido fórmico; e o HMF origina quantidades iguais de ácidos fórmico e levulínico, ademais forma-se também ácido acético procedente da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose.

A lignina também sofre degradação durante o pré-tratamento originando uma grande variedade de compostos fenólicos.

Planes (1974) reporta a relação entre a concentração de ácido e a formação de produtos tóxicos à fermentação, no qual a quantidade de ácido é diretamente proporcional a quantidade de produtos inibidores da fermentação formados.

Ferrari et al, (1992) aponta o ácido acético formado da degradação da hemicelulose como um dos principais inibidores do metabolismo microbiano, estando à concentração desse ácido no meio de fermentação diretamente relacionado com a inibição.

Laser, (2001) observou inibição de 20 a 30% da fermentação em meios com concentrações de 0,3g de furfural por litro.

O furfural causa sobre as leveduras de fermentação alcoólica uma diminuição da taxa específica de crescimento e diminuição da produtividade volumétrica de etanol;

Os efeitos do HMF, mesmo este sendo menos tóxico sobre os microorganismos que furfural, são os mesmos devido aos aldeídos (compostos furânicos) poderem reagir com determinadas moléculas biológicas tais como lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos ou ocasionar danos à membrana celular. Ademais, o furfural inibe enzimas glicolíticas e fermentativas. O furfural e o HMF são metabolizados tanto por bactérias como leveduras (TAHERZADEH, 1999a).

2.5 Hidrólise

A sacarificação dos resíduos lignocelulósicos pré-tratados pode ser realizada por ação de ácidos ou enzimas celolíticas. Em ambos os processos de hidrólise, a celulose é convertida em glicose conforme a equação 1.



1

Na hidrólise ácida, existem basicamente dois processos: ácidos concentrados e ácidos diluídos. A hidrólise ácida permite atuação seletiva inicial sobre a hemicelulose, devido à natureza desses heteropolissacarídeo ramificado de cadeia reduzida e amorfo, comparado com celulose, homo polissacarídeo linear de cadeia muito longa e regiões cristalinas (GOMES, 1985).

Os processos de hidrólise com ácido diluído são operados em temperaturas elevadas, e rendimentos limitados a 50-60% (DUARTE, 1989).

Na hidrólise com ácido concentrado, utilizam-se ácidos fortes como sulfúrico clorídrico ou fosfórico fortes com temperaturas baixas (<100°C). Nessa operação a celulose e preferencialmente a hemicelulose presentes na biomassa são quebradas e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos ao meio reacional o que leva a degradação e perda desses açúcares. Essa técnica requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (SZENGYEL, 2000).

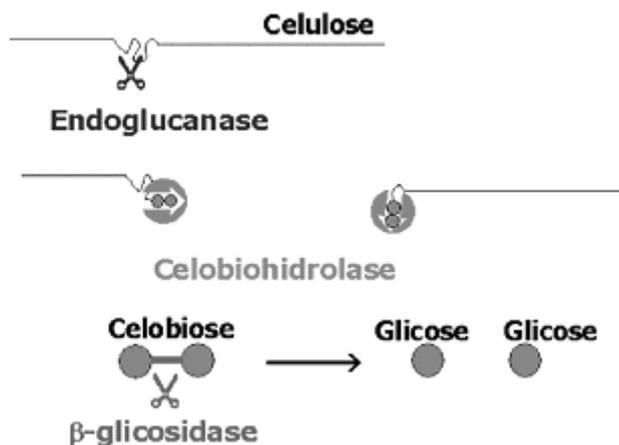
A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias (que levariam à perda de rendimento), ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

Esta consiste em uma reação química catalisada por um complexo de enzimas na presença de água para quebrar uma molécula em duas outras moléculas. Um dos produtos da reação catalisada receberá um grupo OH⁻ e, o outro produto, um próton de hidrogênio que serão incorporados as suas estruturas químicas. Uma das barreiras da utilização em larga escala da hidrólise enzimática é o custo incerto das enzimas celulíticas.

Um mecanismo proposto para a hidrólise enzimática (Figura 2.12) é o sinergismo de, pelo menos, três enzimas: as endoglucanases, que hidrolisam a molécula de celulose nos centros não cristalinos; exoglucanases que formam celbiose partindo das extremidades redutoras e não redutoras de celulose; e β-glicosidases ou celbiases, que hidrolisa a celbiose e forma duas moléculas de glicose.

O rendimento da hidrólise é influenciado por muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, e taxa de agitação. Conseqüentemente é necessária uma otimização dessas condições para resultados satisfatórios dos processos de sacarificação.

Figura 2.12: Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.



Fonte: OGEDA, 2010.

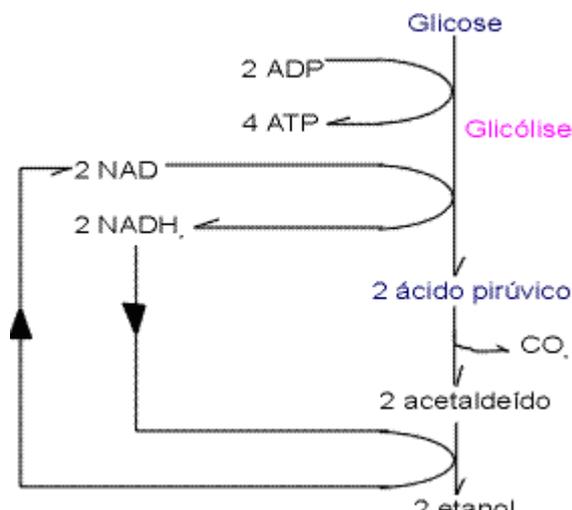
2.6 Fermentação

A fermentação é um processo biológico em que as enzimas produzidas por microrganismos catalisam reações químicas que quebram açúcares simples ou aminoácidos em materiais de menor peso molecular, tais como ácidos orgânicos e solventes neutros, como o etanol. Esses microrganismos digerem uma simples molécula de açúcar para produzir a energia e produtos químicos que necessitam para viver e se reproduzir, gerando ainda produtos derivados, como o dióxido de carbono, ácidos orgânicos, hidrogênio, etanol e outros produtos, que excretam ao meio.

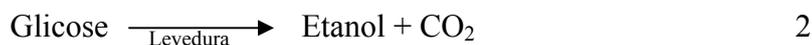
O processo de fermentação alcoólica consiste de uma série de reações químicas catalisadas por um complexo de enzimas, presentes no metabolismo de diferentes microrganismos, sendo o mais utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A figura 2.13 mostra de forma resumida a transformação de glicose em etanol. Conforme mostrado nessa figura, na glicólise, glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato (3C). Os dois pares de hidrogênios liberados, e respectivos elétrons carregados de energia, são temporariamente entregues à forma oxidada de duas moléculas de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), que na forma reduzida passam a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Na presença de oxigênio, este será o receptor final desses hidrogênios, após liberação da energia dos elétrons para formação de ATP, regenerando NAD. Na ausência de oxigênio, a enzima piruvato descarboxilase transforma piruvato em acetaldeído e a enzima desidrogenase alcoólica catalisa a entrega dos hidrogênios

(que estavam na forma de $\text{NADH} + \text{H}^+$) ao acetaldeído, reduzindo este a etanol e, assim, regenerando NAD. Duas ATPs por molécula de glicose são obtidas nesse processo. A fermentação alcoólica permite, pois, que em condições de ausência de oxigênio, a célula possa prover energia para manutenção das atividades vitais e crescimento celular, através desse mecanismo alternativo de regeneração de NAD.

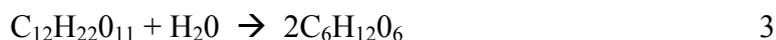
Figura 2.13: Seqüência de etapas na transformação de glicose em etanol.



A seqüência de reações pode ser resumida como apresentado na equação 2.



As reações que ocorrem na fermentação alcoólica do mosto, resumidas na equação 2, podem ser representadas pelas seguintes etapas: Inicialmente a sacarose presente no caldo é invertida a glicose e frutose conforme equação 3:

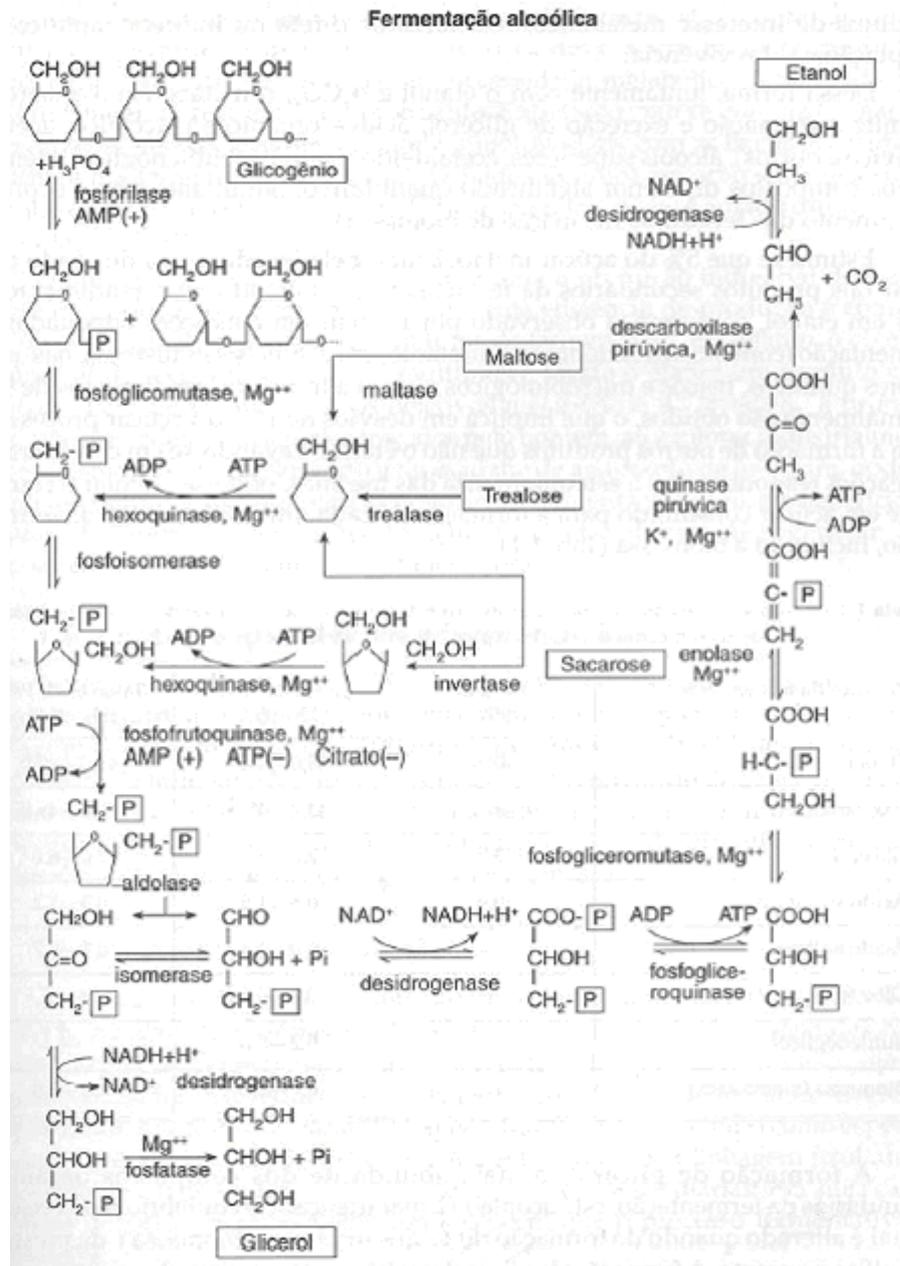


A frutose é invertida a glicose e etanol é produzido a partir da conversão das hexoses, de acordo com a Equação 4:



A figura 2.14 mostra a rota detalhada da fermentação alcoólica, com os outros possíveis produtos que podem ser formados.

Figura 2.14: Sequência de reações enzimáticas da fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose) conduzida por *Saccharomyces*.



Fonte: LIMA et al, 2001).

O rendimento estequiométrico da equação 4 é de 0,511 g etanol/g glicose. No entanto, parte dos açúcares presentes no meio é consumida em reações paralelas necessárias para a síntese de etanol. Como mostrado na Figura 2.14, outros produtos podem ser formados, dentre eles o glicerol e ácidos orgânicos, principalmente acético e succínico, além de outros alcoóis e levedura. Por estes motivos costuma-se observar rendimentos na fermentação alcoólica industrial da ordem de 90 %.

A formação de glicerol na fermentação alcoólica está acoplada ao crescimento, à formação de ácidos e a situações de stress para a levedura, tais como stress osmótico causado por elevadas concentrações de açúcares ou sais no mosto, contaminação bacteriana e temperatura elevada (BASSO, 2006).

A produção desses subprodutos implica diretamente redução da produção de etanol, mas alguns deles são fundamentais para preservar a atividade microbiana. O ácido succínico é produzido nas reações de fermentação e possui atividade antibacteriana, e o glicerol é importante para a manutenção do crescimento da levedura.

Alguns fatores afetam a fermentação como qualidade da matéria prima utilizada, pH do processo, aditivos químicos como: antibióticos, contaminação microbiana, limpeza e assepsia (NETO, 2008).

Dentro dos itens mais significativos, a temperatura que representa uma etapa crítica do processo fermentativo. Em geral, as leveduras são capazes de executar a fermentação alcoólica entre 28 e 35 °C eficientemente. Apesar da taxa inicial de formação de etanol ser maior a temperaturas elevadas (40°C), a produtividade geral do processo fermentativo diminui devido à inibição pelo produto (ROEHR, 2001).

O etanol também apresenta efeito inibitório na taxa de crescimento celular a concentrações acima de 10% p/v. Além do produto (etanol), a levedura também sofre inibição pelo substrato, que ocorre em concentrações maiores que 150 g/L (PORTO, 2005).

3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais das metodologias requeridas para a caracterização do bagaço de cana antes e após da etapa do pré-tratamento, etapas de pré-tratamento dos bagaços de cana *in natura* e explodido com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, hidrólise enzimática e fermentação.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Para a realização dos experimentos foi utilizada água destilada e água mili-Q. Os demais reagentes são apresentados na Tabela 3.1 sendo utilizados sem nenhuma purificação adicional.

Tabela 3.1: Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Fabricante	Pureza (% em massa)
Ácido acético	Quemis	99,7
Ácido cítrico monohidratado	Ecibra	99,8
Ácido fórmico	Quemis	97
Ácido glucurônico	Sigma	99
Ácido sulfúrico	Quemis	98
Arabinose	Sigma	99,5
Citrato sódio	Synth	98
Cloreto de cálcio	Quemis	----
Celobiose	Fluka	99
Etanol	Quemis	95
Extrato de levedura	Acumedia	----
Furfural	Sigma-Aldrich	99
Glicose	Synth	----
HMF	Sigma	----
Hidróxido de sódio	Quemis	----
Kit Glicose God-Pap	Laborlab	----
Sulfato de Magnésio	Synth	98-102
Sulfato de sódio	Quemis	----
Uréia	Synth	99
Xilose	Synth	99
Enzima	Genencor	----

3.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para a determinação experimental foram:

- Autoclave vertical modelo 103 da marca Fabbe-Primar;
- Balança analítica da marca Denver Instrument com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Balança da marca Gehaka precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostático modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01$ °C;
- Centrífuga 5810R da marca Eppendorf;
- Cromatógrafo Shimadzu LC-10AD;
- Espectrofotômetro UV-Visível Ultrospec 200 da marca Pharmacia Biotech;
- Estufa de secagem da Nova Ética;
- Incubadora Refrigerada MA-830 da marca Marconi
- Balança determinadora de umidade ID-50 versão 1.8 da marca Marte
- Medidor de pH 710^a da marca Orion
- Moinho de facas da marca sp labor

3.1.3 Matéria prima

Todo o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) utilizado nos experimentos foi proveniente de uma mesma safra e fornecido pela Usina Iracema e doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira. O material, bagaço in natura e explodido, foi armazenado e congelado em sacos de 50 kg.

O bagaço de cana explodido foi submetido a um pré-tratamento anterior sob altas pressões e temperatura (17 Kgf, 205°C, 20 minutos). Esse pré-tratamento disponibilizou uma maior quantidade de hemicelulose para extração, comparado ao bagaço *in natura*.

3.2 Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar

Foram realizadas análises de composição química para o bagaço de cana antes e após cada pré-tratamento tais como: teor de umidade, cinzas, extrativos, análise de carboidratos, lignina solúvel e insolúvel. A metodologia empregada foi desenvolvida por ROCHA et al, 1997 e validada por GOUVEIA et al, 2009. Estas metodologias são apresentadas a seguir.

Para todas as análises composicionais o bagaço foi seco até poder ser moído e peneirado. As frações retidas nas peneiras de 20 mesh foram misturadas, homogeneizadas e utilizadas para todos os procedimentos de caracterização.

3.2.1 Teor de Umidade

A determinação de umidade nas amostras é importante para apresentar os resultados em termos de biomassa seca.

Foram utilizadas duas metodologias para a determinação do teor de umidade nas biomassas: A utilização de uma balança determinadora de umidade, modelo ID-50, marca MARCONI com modo de secagem automática (à amostra é seca até que não haja mais variação de peso, e o equipamento automaticamente informa o final do processo e seus respectivos valores em % de umidade).

E a análise baseada na norma do NREL (National Renewable Energy Laboratory) “Determination of Total Solids in Biomass”. Onde foram pesados recipientes previamente secos (M1) em uma estufa a 105 °C durante quatro horas e inseridos em um dessecador até temperatura ambiente. Amostras de 2 g de bagaço foram pesadas nesses recipientes (M2), e levadas à estufa a 105°C para secagem até peso constante com variação em $\pm 0,001$ g na umidade atual após de 1 h de aquecimento da amostra. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas num dessecador e pesadas novamente (M3).

Para o cálculo do teor de umidade se tem a equação 5:

$$\% \text{ Teor de Umidade} = \left(\frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \right) \times 100 \quad 5$$

M1= massa do béquer vazio (g)

M2= massa da amostra úmida com béquer (g)

M3= amostra absolutamente seca com béquer (g)

3.2.2 Procedimento para caracterização química do material.

Amostras de 2 g (massa seca) de material lignocelulósico (moído a 20 mesh) foram pesadas com precisão de 0,1 mg e transferidas para um béquer de 100 mL para serem tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72%, sob vigorosa agitação com um bastão de vidro, em um banho termostatzado a 45,0 ± 0,5 °C por 7 min.

A reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada, sendo a amostra transferida quantitativamente para um frasco erlenmeyer de 500 mL, elevando-se o volume de água a 275 mL. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 min. a uma pressão de 1,05 bar, a 121 °C.

Após a descompressão da autoclave, o erlenmeyer foi retirado da mesma, resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e transferida para um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com a água de lavagem do material retido no filtro. O balão volumétrico que contém o hidrolisado foi armazenado para posterior análise de carboidratos.

3.2.3 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE.

Os hidrolisados obtidos no item anterior foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando-se uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, utilizando como fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol. L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL. min⁻¹, a 45 °C para determinação de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, celobiose e ácido glucurônico.

Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C18 (Waters).

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e ácidos orgânicos a serem analisados, sendo a quantificação feita por curvas de calibração de cada composto.

3.2.4 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina.

3.2.5 Determinação do teor de cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente, estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2 h a 800 °C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

A massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item 3.2.4 e então se obter a massa real de lignina insolúvel.

3.2.6 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g de material lignocelulósico (base seca) em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado nas mesmas condições do ensaio. Posteriormente estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400°C, por aproximadamente 1h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

3.2.7 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e NaOH 6,5 N até pH final próximo a 12.

Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. A equação 6 abaixo foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{280nm} - \varepsilon_{HMF} \cdot C_{HMF} - \varepsilon_{Furf} \cdot C_{Furf} - A)}{B} \quad 6$$

onde:

- C_{Lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);
- A_{280nm} : Absorvância do hidrolisado em 280 nm;
- ε_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹);
- $\varepsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural (146,85 L.g⁻¹);
- C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);
- $C_{Furfural}$: Concentração de furfural no hidrolisado (g/L).
- B: Absortividade da lignina

3.2.8 Determinação de furfural e hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna μ Bondapack C-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL. min⁻¹, à temperatura de 25 °C.

O hidrolisado obtido na etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foram filtrados em membrana de diâmetro de poro de 0,45 μ m (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras. Os compostos foram detectados em 276 nm por um detector UV-visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

3.2.9 Determinação dos extrativos

Para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi determinado o conteúdo de extrativos baseada na norma NREL nº10 “Determination of Extractives in Biomass”. Pesaram-se amostras de 4g de bagaço previamente moído e seco em cartuchos de extração e colocados para ser extraídos em um aparelho soxhlet. No balão de 500mL do extrator foi adicionado 400 mL de álcool etílico de 99% de pureza juntamente com pérolas de vidro. O balão foi acondicionado dentro de uma manta aquecedora. A extração termina quando o solvente que se encontra ao redor do cartucho de extração torna-se incolor. Em seguida foram retirados os cartuchos com as amostras e secos em uma estufa a 105 °C até massa constante.

A quantificação do conteúdo de extraíveis é descrita na equação 7.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{M_b - M_f}{M_b} \right) \times 100 \quad 7$$

Onde:

M_b= massa de bagaço seco (g)

M_f= massa do bagaço livre de extrativos (g)

3.2.10 Análise dos materiais lignocelulósicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura foi necessário a fixação das amostras com fita carbono em suporte de alumínio e com o respectivo recobrimento metálico de 17 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um microscópio (modelo 7366) com detector OXFORD INSTRUMENTS a uma potência do feixe de elétrons de 133eV e det. área de 10mm², resolução AT 5,9 keV- 133eV (equipamento disponível na Escola de Engenharia de Lorena – USP).

3.3 Enzima

Para a realização dos experimentos foi utilizada enzima comercial Accelerase 1500 proveniente da empresa Genencor.

3.3.1 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade celulolítica total das enzimas, utilizou-se a metodologia de determinação de açúcares totais, por ácido dinitrosalicílico (DNS), em papel de filtro Whatman No. 1 (GHOSE, 1987; MILLER, 1959).

Em tubos de ensaio Folin Wu foram adicionados 1 mL de tampão citrato 50mM pH 4.8 e 0,5 mL de enzima diluída e tiras de papel de filtro Whatman n°. 1 (1,0 x 6,0 cm) como substrato. Os frascos foram colocados a 50°C por 60 minutos em uma incubadora (Marconi MA-832). Após o período de incubação, adicionou-se 3 mL de reagente DNS em todos os tudo e estes foram agitados e colocados em água fervente no banho-maria por 5 minutos sendo posteriormente resfriados a temperatura ambiente. A leitura foi realizada 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.

3.4 Procedimento Experimental

3.4.1 Fluxogramas de trabalho

Nesse trabalho, foram avaliados várias condições de pré-tratamentos em bagaço de cana *in natura* e explodido não lavado.

A seguir, são apresentados os fluxogramas de trabalho para o bagaço de cana *in natura* e explodido estudados nas figuras 3.1 e 3.2 respectivamente.

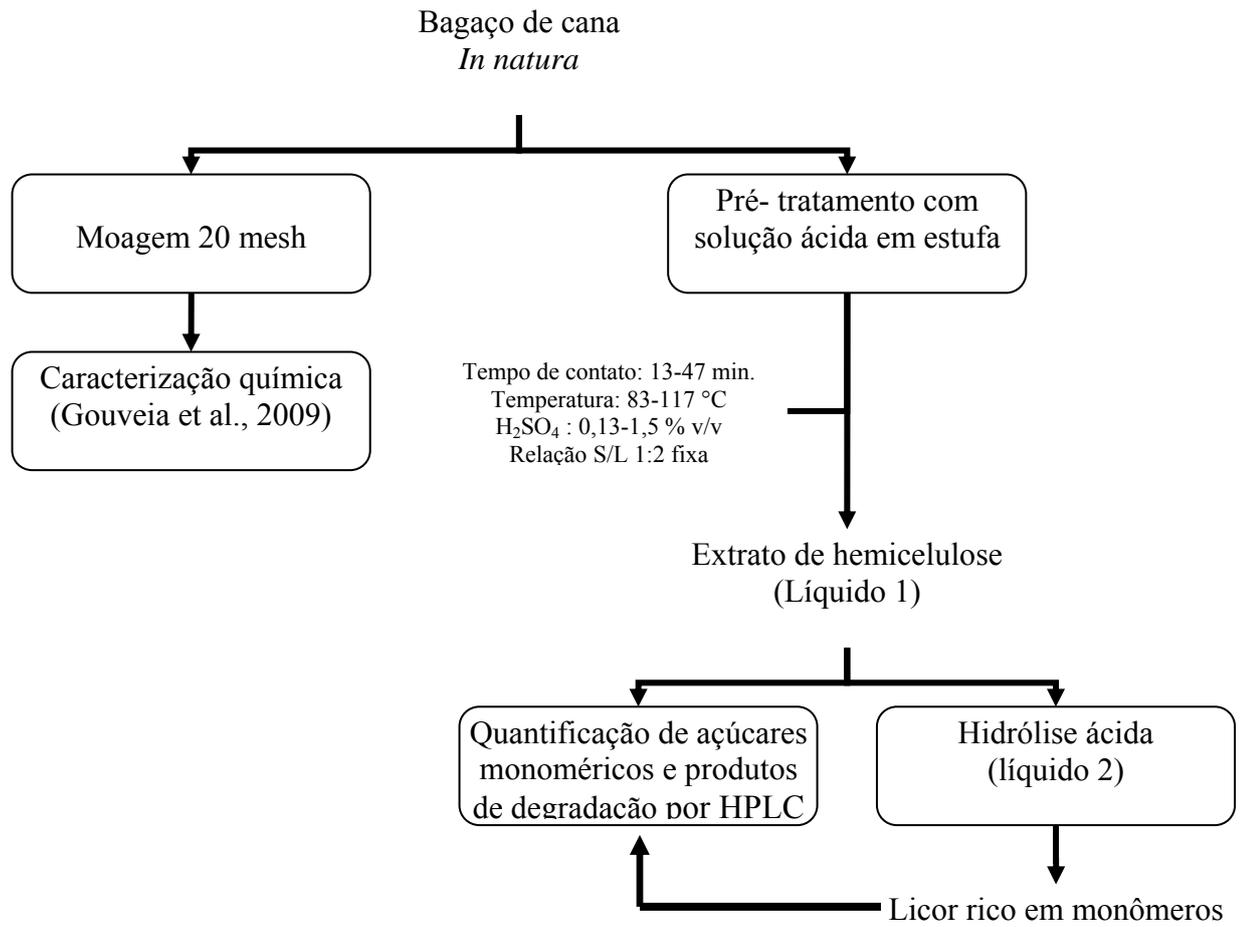
Figura 3.1 Fluxograma de trabalho para pré-tratamento ácido para bagaço *in natura*.

Figura 3.2: Fluxograma de trabalho para o bagaço de cana de açúcar explodido não lavado pré-tratado com água.

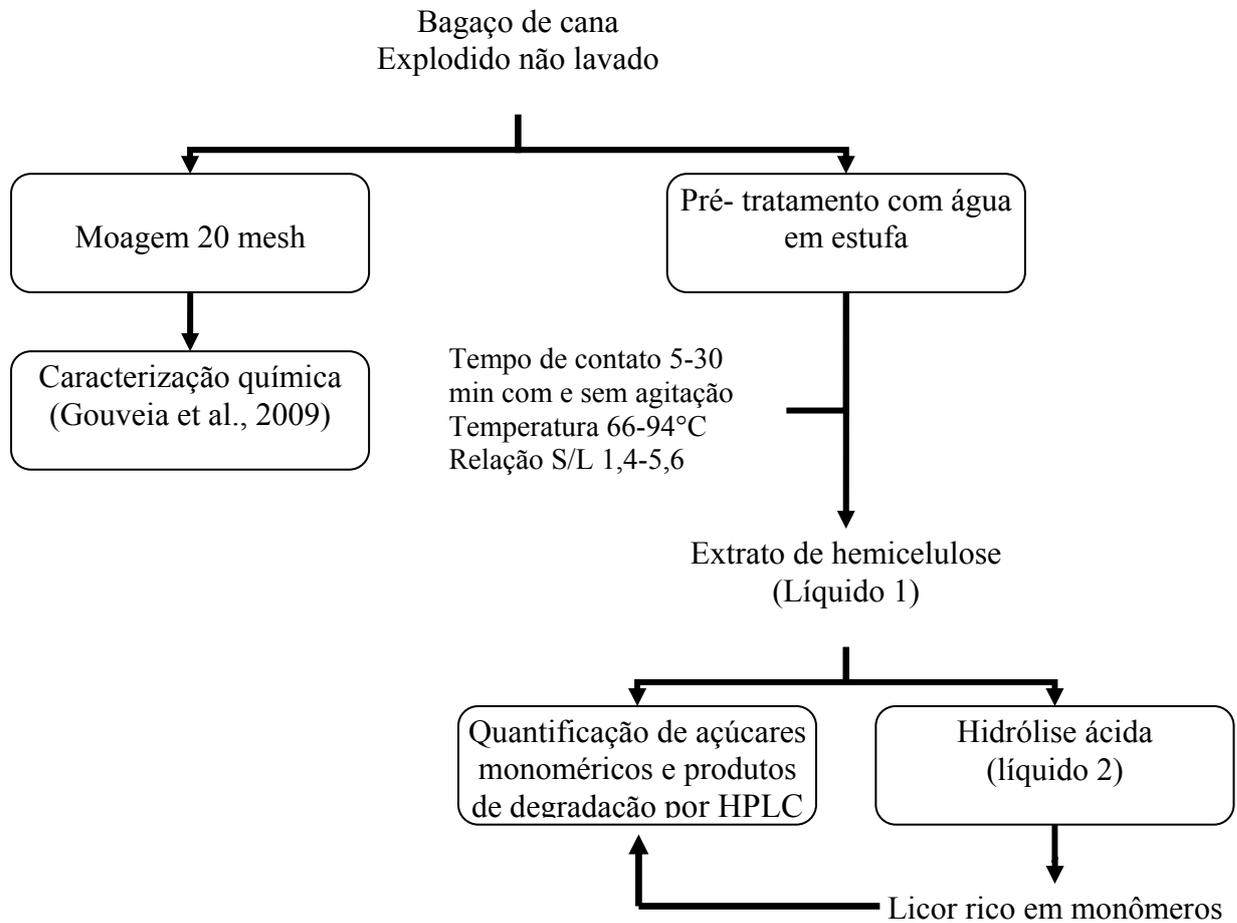
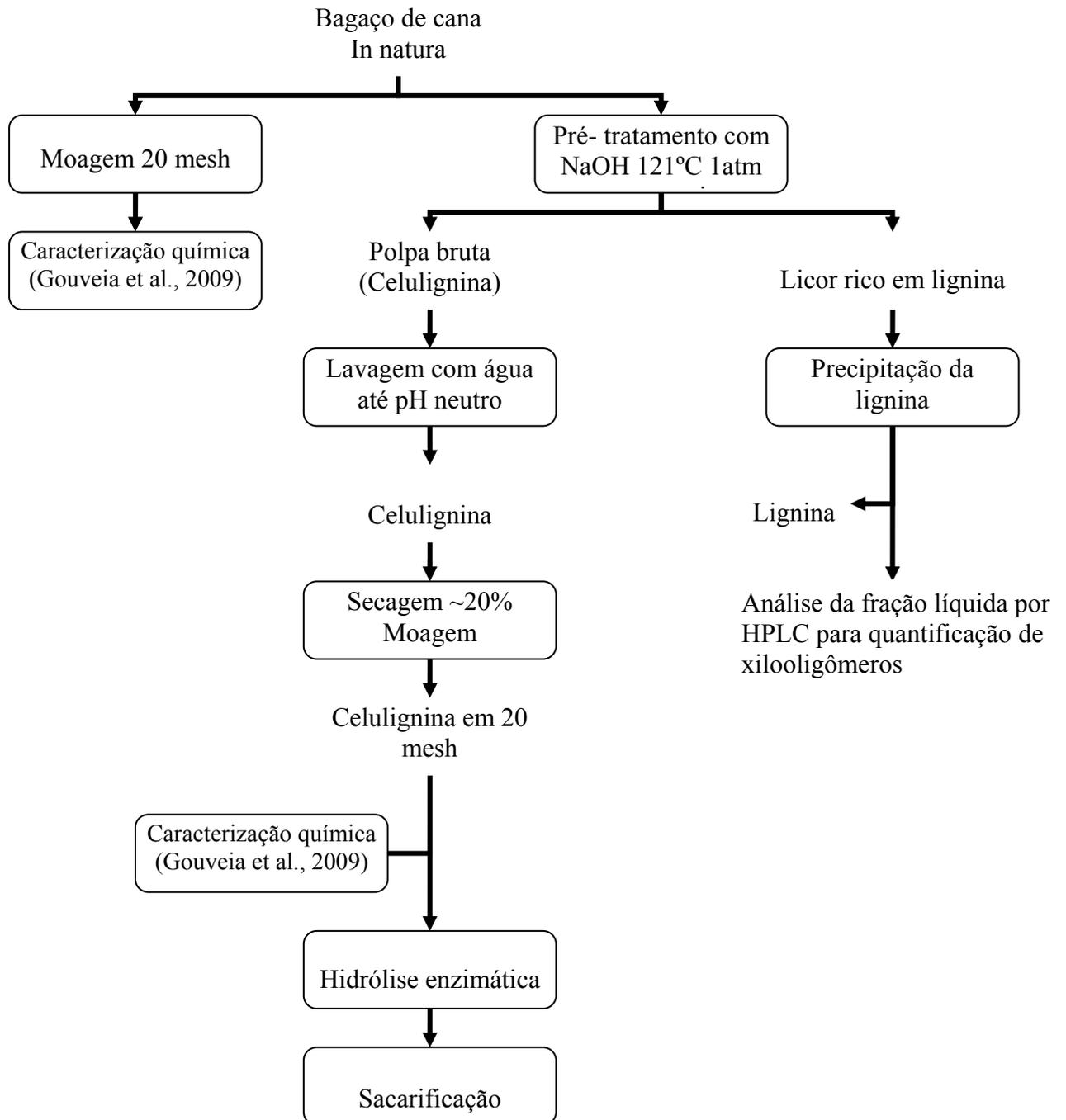


Figura 3.3: Fluxograma de trabalho para bagaço de cana *in natura* pré-tratado com hidróxido de sódio.



3.4.2 Pré-tratamentos

3.4.2.1 Pré-tratamento com água e ácido sulfúrico diluído

Os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e explodido foram primeiramente submetidos à moagem, para redução de tamanho, 20 mesh, em um moinho do tipo facas, sendo posteriormente caracterizados quimicamente.

O bagaço *in natura* e explodido não lavado foram pré-tratados com ácido sulfúrico diluído e água respectivamente, escala de bancada, em seringas descartáveis em estufa.

As condições de reação empregadas foram as seguintes: 2,5 g de bagaço de cana *in natura* (massa seca), volume de 5mL de solução de H₂SO₄ 0,13 a 1,5% (v/v) conforme planejamento, relação sólido-líquido 1:2 (m/v) fixa, tempo de contato de 13 a 47 minutos e temperatura de 83 a 117°C. Ao atingir a temperatura e o tempo correspondente a cada ensaio do planejamento a seringa foi retirada da estufa e com o auxílio do embolo a solução rica em hemicelulose foi extraída (líquido 1). As condições de reação empregadas para o bagaço de cana explodido foram as seguintes: 2,5 g de bagaço de cana *in natura* (massa seca), volume de água conforme a relação sólido líquido do planejamento 1,4 a 5,6 (m/v), tempo de contato 5 ou 30 minutos sem e com agitação. Ao atingir a temperatura e o tempo correspondente a cada ensaio do planejamento a seringa foi retirada da estufa e com o auxílio do embolo a solução rica em hemicelulose foi extraída.

Após a extração, os líquidos ricos em hemicelulose foram submetidos a uma hidrólise ácida conforme descrito no item 3.5. Os açúcares e produtos de degradação foram quantificados por CLAE.

No estudo da extração de hemicelulose do bagaço de cana *in natura* foram realizados 16 experimentos (8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e duplicata no ponto central), tendo sido relacionadas as seguintes variáveis independentes: o tempo de contato (min), a temperatura (°C) e a concentração de H₂SO₄ (%), mantendo-se fixa a relação sólido:líquido (bagaço e solução ácida) de 1:2.

Os valores codificados e reais para os níveis de cada uma das variáveis nos experimentos são apresentadas na Tabela 3.2. A tabela 3.3 mostra a matriz do planejamento experimental adotado.

Tabela 3.2: Faixa de valores estudados no DCCR para o bagaço *in natura*.

Fatores	Níveis Experimentais				
	- α	-1	0	+1	+ α
t(min)	13,3	20	30	40	46,8
T(°C)	83,2	90	100	110	116,8
H ₂ SO ₄ (%v/v)	0,13	0,4	0,8	1,2	1,5

Tabela 3.3: Matriz do planejamento experimental para o bagaço *in natura*.

Exp.	T (°C)	t (min)	H ₂ SO ₄ (%)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0

Para o estudo da extração de hemicelulose do bagaço de cana explodido não lavado foram realizados 10 experimentos (4 pontos fatoriais, 4 axiais e duplicata no ponto central), tendo como variáveis independentes a relação sólido:líquido (bagaço e água) e a temperatura (°C), sendo que o tempo de contato foi mantido em 5 minutos.

Os valores codificados e reais para os níveis de cada uma das variáveis nos experimentos são apresentadas na Tabela 3.4. A tabela 3.5 mostra a matriz do planejamento experimental adotado.

Tabela 3.4: Faixa de valores estudados no DCCR para o bagaço explodido.

Fatores	Níveis Experimentais				
	- α	-1	0	+1	+ α
Rel. sólido: líquido (mL:g)	1,4	2	3,5	5	5,6
Temperatura (°C)	66	70	80	90	94,1

Tabela 3.5: Matriz do planejamento experimental para o bagaço explodido.

Exp.	Relação sólido- líquido	T (°C)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0

3.4.2.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi primeiramente submetido à moagem, para redução de tamanho, 20 mesh, em um moinho do tipo facas, sendo posteriormente caracterizado quimicamente.

O Bagaço *in natura* sem alteração de granulometria foi pré tratado com um solução de hidróxido de sódio em autoclave a 121°C e 1 atm manométrica.

As condições de reação empregadas foram as seguintes: 30 g de bagaço *in natura* (base seca), volume de solução conforme a relação sólido líquido de 1:10 (m/v), tempo de reação de 15-90 minutos e concentração de NaOH de 1-7%.

Para a segunda etapa de pré-tratamento foi realizado um planejamento fatorial com 3 experimentos no ponto central. A tabela 3.6 mostra valores testados para as variáveis.

Tabela 3.6: Faixa de valores estudados no planejamento 2² do pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
NaOH (%m/v)	1	4	7
Tempo (min)	30	60	90

Para ambas as etapas foram pesados 30g de bagaço seco em frascos Erlenmeyer e adicionados solução de 1-7% de hidróxido de sódio, na proporção de 1:10 (massa/volume). O material foi homogeneizado e colocado em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Após o término do pré-tratamento o bagaço foi filtrado sob vácuo. A fração sólida foi primeiramente lavada com 300 ml de água destilada a 60°C para a remoção da lignina extraída e hemicelulose, essa fração líquida foi separada e analisada posteriormente para quantificação de oligômeros de xilose.

A fração sólida então foi lavada com mais água destilada para remoção de toda a lignina extraída, porém ainda não solubilizada, até pH neutro, a fim de não mais apresentar coloração amarelada no efluente da lavagem. Após este procedimento, a polpa bruta do bagaço de cana foi seca à temperatura ambiente e posteriormente mensurada quanto ao rendimento mássico do processo (equação 8). Uma fração de cada material deslignificado foi reservada para posterior análise de caracterização química e ensaio de conversão enzimática.

Todos os rendimentos mássicos das etapas de pré-tratamento estudadas neste trabalho foram calculados utilizando a equação a seguir:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad 8$$

onde:

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

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

R : rendimento mássico da etapa.

A perda do componente macromolecular (celulose, hemicelulose e lignina) foi calculada pela seguinte equação 9 :

$$P = 100 \times \left(\frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot R \cdot y_f}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left(1 - R \frac{y_f}{y_i} \right) \quad 9$$

onde: P: perda do componente macromolecular (%);

M_i : massa inicial de material lignocelulósico;

y_i : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico *in natura*;

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

R: rendimento mássico da etapa de pré-tratamento.

3.4.3 Identificação dos Oligômeros de Xilose presentes na fração líquida após pré-tratamento

Os oligômeros de xilose presentes no líquido recolhido após pré-tratamento foram identificados em um equipamento de Cromatografia em fase líquida (CLAE), usando detector de DAD (detector de arranjo de diodo) Waters 996, modulo de injeção automática Waters 717 plus, equipado com duas bombas Waters 510.

Em uma primeira etapa colocou-se em um béquer de 50 ml uma alíquota de 10 ml da fração líquida recolhida, e o seu pH foi ajustado entre 3,5 e 5,5, sob agitação magnética com H₂SO₄ 98% até que a lignina presente apresentasse sinal de precipitação. O béquer permaneceu sob refrigeração (geladeira) por 12 horas. Após isso os compostos aromáticos foram removidos da fração líquida por extração em cartuchos Sep-Pack C₁₈ (Waters). A amostra então foi filtrada em membrana 0,45 µ Millipore e injetada em uma coluna Supelcogel C- 610H Sigma. Como fase móvel foi empregada solução H₃PO₄ 0,1% com vazão de 0,8 mL/min. A xilose foi monitorada com um detector de índice de refração (Shimadzu R) e o tempo de retenção foi comparado ao da xilose padrão.

Em uma segunda etapa a fração líquida foi submetida a uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico 72%, na proporção de 5 mL de amostra para 174 µL de ácido sulfúrico, em um banho seco por 60 minutos. Os tubos então foram mergulhados em água a temperatura ambiente até o seu resfriamento. O pH das soluções foram ajustados com carbonato de cálcio sólido até pH 1,2 a 1,5 e filtrados novamente em membrana 0,45 µ Millipore e monitorada a xilose em CLAE conforme procedimento anterior.

A quantidade de oligômeros presente na amostra após o pré-tratamento foi calculado pela equação 10.

$$\text{Rendimento Xilooligômeros(\%)} = \left(\frac{Ma * 100}{Mb - Mc} \right) \quad 10$$

Onde:

M a= massa de xilose na fração líquida

Mb= massa de xilose no bagaço de cana sem tratamento

Mc= massa de xilose no bagaço de cana após pré-tratamento

3.5 Hidrólise Enzimática do bagaço pré-tratado

Para verificar como cada parâmetro estudado interfere na hidrólise, foram realizadas para cada uma das amostras nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima, condições obtidas no grupo de trabalho, para que assim, houvesse a quantificação da glicose.

Após a secagem e moagem do resíduo resultante do pré-tratamento do bagaço em cada uma das condições de estudo, aproximadamente 3,0 g de celulignina (massa seca) de cada ensaio foi pesado em erlenmeyers e 30mL de tampão citrato (0,05M) foram adicionados ao resíduo.

Os erlenmeyers foram fechados com rolhas para que não houvesse uma alteração considerável do volumes reacionais e encubados em um shaker com rotação mantida a 200 rpm e 50°C durante toda a hidrólise. A temperatura utilizada durante a hidrólise corresponde ao valor encontrado para a temperatura ótima da enzima, onde sua atividade é máxima.

Para monitorar o processo de hidrólise amostras do líquido reacional da hidrólise enzimática (aproximadamente 300 μ L) foram coletas em períodos de tempo pré-determinado, isto é, 0, 5, 10, 24, 34, 42, 52, 62, e 72 h e então, recolhidas em eppendorf contendo 200 μ L de solução de hidróxido de sódio 0,2N para inativação das enzimas.

Para a avaliação de cada pré-tratamento, utilizou-se concentrações de enzima de 20FPU por g de material lignocelulósico.

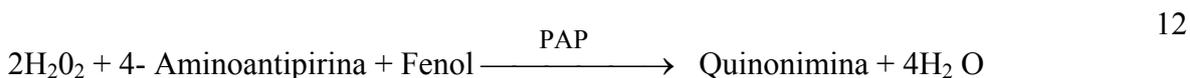
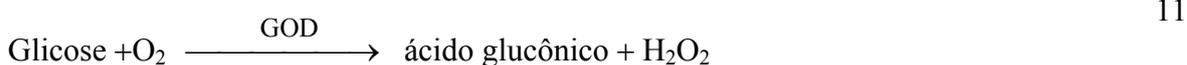
Ao final das 72 h de hidrólise e após coleta do líquido reacional neste tempo, os resíduos restantes foram centrifugados. A fração líquida foi separada e armazenada sob refrigeração para ser usada posteriormente na fermentação.

3.5.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada de acordo com o método enzimático Glicose GOD-PAP, descrito por HENRY, 1974. Trata-se de um kit enzimático contendo um reativo mono-reagente pronto para uso, além de uma solução padrão de glicose com a concentração de 100 mg/mL.

O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando em peróxido de hidrogênio, o qual é subsequentemente usado na geração da coloração rosada pela peroxidase (PAP).

As reações 11 e 12 mostram as reações enzimáticas ocorridas para a quantificação da glicose.



Para a quantificação da glicose, adicionou-se 10 µL de cada uma das amostra em tubos de ensaio previamente identificados e 1,0 mL do mono-reagente. Os tubos foram mantidos em um banho termostático a 37°C por 10 minutos para que houvesse o desenvolvimento da coloração rosada. Ao término da reação, os tubos foram retirados e invertidos para homogeneizar a solução e assim, efetuada a leitura da absorbância no espectrofotômetro em 505 nm.

Os tubos do branco da reação e do padrão de glicose foram feitos juntamente com os tubos das amostras. Para o tubo branco adicionou-se 1,0 mL do reagente enzimático e para o tubo padrão adicionou-se ao tubo 10 µL da solução padrão de glicose (100 mg/dL) e 1,0 mL do mono-reagente enzimático.

Quando necessárias diluições das amostras foram efetuadas para possibilitar a leitura, já que a reação é linear até absorbância de 0,8.

Para o calculo da conversão enzimática foi utilizada a equação 13.

$$\text{Conversão de} \\ \text{Celulose em} \\ \text{Glicose (\%)} = \left(\frac{100 * b}{\% \text{ Cel} / 0,9} \right) \quad 13$$

Onde:

b= concentração de glicose no ultimo ponto da hidrólise

% Cel= Teor de Celulose na biomassa sem ser corrigido pelo fator do pré-tratamento.

3.6 Preparação do inóculo

O inóculo foi obtido do cultivo da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, a partir de um fermento fresco de panificação, contendo 20 g/L de glicose e 10g/L de levedura de panificação e os componentes citados no tabela 3.7 em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio, pH inicial 5,5 sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório a 30°C por 16 h de acordo com NARCISO et al, 2009.

Após 16 horas o inóculo foi centrifugado, filtrado a vácuo e logo adicionado ao meio fermentativo a uma concentração 4 vezes menor em comparação a concentração de glicose de cada hidrolisado.

Tabela 3.7: Componentes utilizados na fermentação alcoólica do hidrolisado dos bagaços pré- tratados com suas respectivas concentrações.

Componente	Concentração
Extrato de levedura	2 g/L
NaSO ₄ .H ₂ O	1 g/L
MgSO ₄	0,25 g/L
Uréia	2 g/L
K ₂ HPO ₄	0,5 g/L
CaCl ₂	0,5 g/L

3.6.1 Fermentação

Os hidrolisados celulósicos de volume variável foram colocados em erlenmeyers de 250mL, e suplementados com os nutrientes da tabela 3.7, empregados para o inóculo, exceto a glicose, empregando-se as mesmas condições de cultivo para o inóculo, porém por um período de 2h.

Foram feitas análises dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a metodologia descrita no item 3.2.3, quanto à composição de glicose e etanol, nos tempos 0min, 30min, 60 min, 90 min e 120min. As amostras foram recolhidas e filtradas com filtro Millipore 0,45 µL com a finalidade de separar a levedura para a interrupção da fermentação.

3.6.2 Quantificação de etanol

No decorrer da fermentação amostras foram recolhidas nos tempos 0min, 30min, 60 min, 90 min e 120min. As amostras foram recolhidas e filtradas com filtro Millipore 0,45 µL com a finalidade de separar a levedura para a interrupção da fermentação. Foram feitas análises dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a metodologia descrita no item 3.2.3, para a determinação da concentração de etanol e da cinética de fermentação.

Para o calculo do rendimento da fermentação utilizou-se a equação 14.

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \left(\frac{100 * c}{\text{Glic}/2} \right) \quad 14$$

Onde:

c= Concentração de etanol após 120 minutos de fermentação

Glic= Glicose no ultim ponto da hidrólise.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do bagaço de cana de açúcar *in natura* e explodido

4.1.1 Teor de Umidade

Antes de iniciar os experimentos, o bagaço era descongelado e analisado em relação ao teor de umidade. O teor de umidade da amostra é mostrado na Tabela 4.1

Tabela 4.1: Porcentagem de umidade no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e explodido.

Amostra	Umidade (%)	Média
Bagaço <i>In natura</i>	51,4	51,5±0,15
	51,7	
	51,5	
Bagaço explodido*	54,4	55,4±0,83
	55,8	
	55,9	

* não lavado.

4.1.2 Composição química

Conforme relatado nos capítulos anteriores, o bagaço de cana é um material lignocelulósico e como tal constituído de extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e inorgânicos (cinzas, após calcinação). A caracterização química é um dado essencial deste trabalho para a comparação entre as condições de pré-tratamento utilizadas em todo o trabalho.

Para a caracterização do bagaço de cana, este foi previamente seco a um conteúdo de umidade de 10% e submetido a hidrólise ácida, tal como descrito no item 3.2.2, visando completa hidrólise e conseqüente solubilização de celulose e hemicelulose. Os resultados da hidrólise dos polissacarídeos e da composição em geral são apresentados na tabela 4.2.

Os compostos presentes no bagaço de cana em maior quantidade foram: a celulose, a lignina e a hemicelulose, e em menores quantidades encontraram-se extrativos e cinzas.

A quantidade de lignina reportada na tabela 4.2 envolve a lignina solúvel e insolúvel. A insolúvel é definida como um resíduo que não se solubilizou em ácido e que permanece na fração sólida da biomassa (retida no papel filtro). A lignina solúvel representa a porção que sofre degradação durante a hidrólise ácida e, desta forma, permanece no líquido do filtrado hidrolisado.

Tabela 4.2: Constituição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e explodido após caracterização química com ácido sulfúrico 72%.

Composição	Bagaço de cana <i>in natura</i> (%)	Bagaço de cana explodido* (%)
Celulose	38,8 ±1,4	41,8
como Glicose	38,5	41,4
como hidroximetilfurfural	0,3	0,4
Hemicelulose	29,4 ±1,7	20,9
como Xilose	20,4	14,7
como Arabinose	3,2	2,6
como Ácido Acético	4,4	2,2
como Furfural	1,4	1,4
Lignina total	21,7±0,3	34,3
Extrativos	5,1 ±0,4	-
Cinzas	4,9 ±1,1	2,2%
Total	99,9	99,2

*não lavado.

No bagaço de cana *in natura* é realizada uma extração com etanol que tem por finalidade a remoção de substâncias de baixa polaridade, tais como terpenos, ceras, ácidos graxos, dentre outros (CARASCHI, 1997). Na tabela 4.2 observa-se para o bagaço *in natura* 5,1 % de extrativos, valor que está dentro da faixa de 3,2 a 5,5% citada por Banerjee; Pandey 2002.

O teor de celulose encontrado de 38,8 está de acordo com a literatura conforme Banerjee; Pandey o qual relata um teor de 32- 48 % de celulose e Rabelo, 2008 com um teor de 39,6 %.

O teor de hemicelulose encontrado para o bagaço *in natura* de 29,4 está um pouco acima do encontrado na literatura com o teor de 23,9% de hemicelulose segundo Rabelo, 2008 e 19- 24 % de hemicelulose segundo Banerjee; Pandey.

O valor de lignina obtido com a caracterização química de 21,7 % apresenta-se um pouco abaixo do encontrado na literatura segundo Banerjee; Pandey com 23- 32% de lignina e 25,8% segundo Rabelo, 2008.

Para o bagaço de cana explodido não lavado obteve-se 41,8% de celulose, 20,9% de hemicelulose e 34,3% de lignina, resultados de acordo com os valores encontrados na literatura.

4.2 Remoção de hemicelulose do bagaço de cana *in natura* e explodido

A utilização da xilana presente no bagaço de cana requer sua separação dos demais polímeros. A fração hemicelulósica é a fração mais facilmente extraível. A explosão a vapor é uma operação que já é realizada por algumas usinas para aumentar a acessibilidade à celulose e assim o teor alimentício do bagaço vendido para ração animal. Conforme já discutido na revisão bibliográfica, há formação de ácidos nessa operação. Assim, a acidez decorrente das condições de explosão já permite hidrólise e conseqüente solubilização da hemicelulose presente, a qual irá permanecer no bagaço explodido, mas que deverá ser facilmente removida por extração com água quente. No bagaço *in natura* é necessária a adição de ácido para extração eficiente da hemicelulose (PEREIRA JR et al, 2005).

Na extração, os parâmetros operacionais como temperatura da água e tempo, para bagaço explodido, e também da concentração de ácido, para o bagaço *in-natura*, podem aumentar o rendimento em hemicelulose, mas podem também aumentar a conversão na hidrólise da xilana a xilose e a degradação dos açúcares, com formação de produtos inibidores indesejáveis.

Pretendeu-se por isso, nesta dissertação, avaliar inicialmente condições de extração de hemicelulose do bagaço previamente explodido na usina e *in-natura*, visando determinar as condições que levassem à máxima extração de hemicelulose na forma de xilooligômeros, com a menor formação de sub-produtos. Buscaram-se, pois, condições brandas de extração, tal que se evitasse a completa hidrólise da hemicelulose durante o processo. Foi utilizada a metodologia de planejamento estatístico de experimentos, visando avaliar a significância de cada variável no fenômeno, bem como das possíveis interações entre as mesmas.

Os experimentos foram realizados de acordo com metodologia DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) (RODRIGUES; IEMMA, 2005), com duas repetições no ponto central, que permite avaliar a influência das variáveis independentes nas seguintes variáveis-resposta: quantidade de xilose (g), concentração de ácido acético e

furfural (g/L) e rendimento em xilooligômeros (%). A metodologia experimental pode ser acompanhada no item 3.4.2.1. Após o pré-tratamento, em todos os ensaios foram quantificadas as massas de xilose liberadas na fração líquida pelo tratamento e depois de submeter a fração líquida a hidrólise ácida (xilose total), bem concentração de furfural, ácido acético e hidroximetilfurfural, conforme descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.8.

4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* com solução de ácido sulfúrico

Na Tabela 4.3 estão mostrados os valores das quatro variáveis respostas obtidas a partir dos experimentos realizados com as combinações dos níveis estudados para o bagaço *in natura*.

Tabela 4.3: Rendimento de extração de xilose, xilooligômeros (g) e concentrações de ácido acético e furfural- resultados obtidos para o DCCR (Tabela 5.3) aplicado ao bagaço *in natura*, obtidas após exposição de bagaço de cana *in natura*, a diferentes tempos (t), temperaturas (T) e concentrações de ácido sulfúrico (Ác. S). 5 g bagaço (umidade 50%), 10 mL água, massa inicial de xilose contida no bagaço= 0,58 g).

Temp (°C)	tempo (min)	H ₂ SO ₄ (%)	Massa xilose extraída antes da hidrólise (g)	Massa total xilana extraída (g)	Xilana extraída (%)	Xilooligômeros (%)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (g/L)
90	20	0.4	0,007	0,035	6,0	4,8	0,21	0,007
110	20	0.4	0,01	0,043	7,4	5,7	0,39	0,007
90	40	0.4	0,007	0,036	6,2	5,0	0,41	0,008
110	40	0.4	0,008	0,03	5,2	3,8	0,52	0,009
90	20	1.2	0,005	0,032	5,5	4,7	0,46	0,011
110	20	1.2	0,01	0,066	11,4	9,7	0,76	0,01
90	40	1.2	0,008	0,035	6,0	4,7	1,08	0,02
110	40	1.2	0,029	0,091	15,7	10,7	2,54	0,009
83,2	30	0.8	0,004	0,034	5,9	5,2	0,36	0,018
116,8	30	0.8	0,022	0,069	11,9	8,1	1,65	0,009
100	13,2	0.8	0,006	0,1	17,2	16,2	0,23	0,004
100	46,8	0.8	0,009	0,03	5,2	3,6	1,27	0,043
100	30	0,13	0,011	0,041	7,1	5,2	1,43	0,007
100	30	1,5	0,029	0,07	12,1	7,1	2,21	0,02
100	30	0,8	0,003	0,024	4,1	3,6	0,6	0,009
100	30	0,8	0,003	0,023	4,0	3,4	0,73	0,015

A caracterização prévia do bagaço *in natura* antes do pré-tratamento mostrou a presença de 23,6% de xilose correspondendo a uma massa de 0,58g de xilose em 2,5g de bagaço seco. Essa massa de xilose contida no sólido inicial foi considerada como 100%.

De modo geral, observando-se os resultados da Tabela 4.3, fica claro que as condições de extração testadas mostraram-se realmente muito brandas, obtendo-se como máxima extração total de xilose de 0,1g (13,2 minutos, 0,8% H₂SO₄ e 100°C) corresponde a 17,2 % da massa total de xilose presente no bagaço. Contudo, 0,094 g (94% da massa total de xilose extraída) estava na forma de xilooligômeros. Isso indica que essa condição de extração é adequada para a produção de xilooligossacarídeos (XOS), o que está de acordo com Gialuen Go et al, (2009), que também observou solubilização de xilana com o uso de ácido sulfúrico, como agente de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

A presença de baixas concentrações de furfural em todos os experimentos, como pode ser observada na Tabela 4.3, é um ponto favorável ao processo estudado. As condições brandas de extração usadas evitaram a degradação da xilose. A maior concentração de furfural obtida foi 0,043 g/L para o experimento realizado a 100°C, 46,8 min e H₂SO₄ 0.8% , valor muito abaixo da concentração (1,0 g/L) considerada inibitória à atividade fermentativa, de acordo com Sanches e Bautista (1988).

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando-se o software Statistica (Statsoft, v. 7.0).

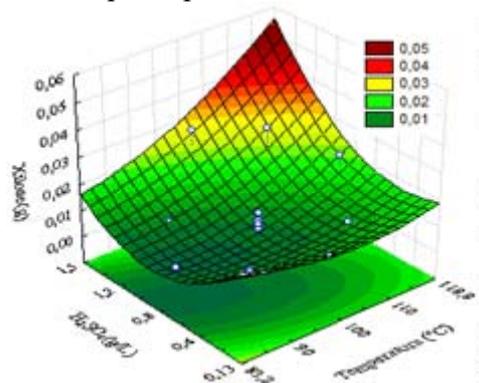
Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a resposta xilose estão descritos na Tabela 4.4, onde é possível observar que o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} a um nível de confiança de 95%. Além disso, observa-se que o coeficiente de correlação e a percentagem de variância explicada são satisfatórios (0,83 e 68,89, respectivamente).

Deste modo, pode-se afirmar que o modelo ajustou-se bem aos dados, podendo ser utilizado para quantificação da influência de cada variável na concentração obtida de xilose, na faixa estudada.

Pode-se verificar também na Tabela 4.4 que a variável que mais influencia na obtenção de xilose é a concentração de ácido sulfúrico, com ambos os efeitos linear e quadrático positivos e significativos. Uma vez que o modelo apresentou significância estatística para a variável xilose, construiu-se a respectiva superfície de resposta (Figura 4.1).

Tabela 4.4: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta quantidade de xilose.

	SQ (10 ⁻⁵)	GL	MQ (10 ⁻⁵)	TesteF	P
T (L)	26,0	1	26,0	11,62	0,009
T (Q)	2,9	1	2,9	1,32	0,284
T(L)	4,1	1	4,1	1,83	0,212
t(Q)	0,2	1	0,2	0,10	0,757
Ác.(L)	18,1	1	18,1	8,16	0,021
Ác.(Q)	19,5	1	19,5	8,78	0,018
T x t	3,0	1	3,0	1,33	0,281
T x Ác	6,2	1	6,2	2,77	0,134
T x Ac	7,6	1	7,6	3,41	0,102
Res.	17,8	8	2,2	-	-
Total	105,1	17	-	-	-
Variância explicada 68,89%	Coeficiente Correlação 0,83		F cal. 4,41	F tab (95%) 3,90	

Figura 4.1: Gráfico de superfície de resposta para a massa de xilose no hidrolisado.

Análise da superfície mostrada na Figura 4.1 permite observar que a região com maior quantidade de xilose está localizada nos pontos nos quais a temperatura esta acima de 100°C e a concentração de ácido acima de 1,2%. Então uma menor temperatura e menor concentração de ácido irão gerar menor quantidade de xilose e assim, possivelmente, uma maior quantidade de xilooligômeros.

A variável resposta concentração de ácido acético também apresentou significância estatística, de acordo com os resultados da análise de variância (ANOVA) descritos na Tabela 4.5, onde se observa uma percentagem de variância explicada de 73,96% para um coeficiente de correlação de 0,86. O teste F também mostra que o valor de $F_{\text{calculado}}=5,40$ é maior que o valor de $F_{\text{tabelado}}=3,39$, mostrando que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais para esta variável. Os p-valores obtidos indicam como variáveis significativas a concentração de ácido sulfúrico (efeito linear e quadrático), o tempo e a

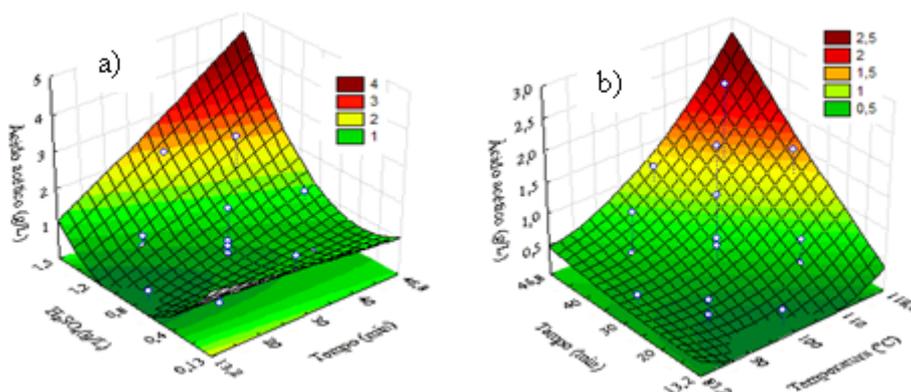
temperatura (efeito linear). Aqui, também, então, a concentração de ácido é a variável mais importante.

Tabela 4.5: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta concentração de ácido acético.

	SQ	GL	MQ (10^{-5})	TesteF	P
T (L)	1,30	1	1,30	8,62	0,02
T (Q)	0,15	1	0,15	0,97	0,35
T(L)	1,47	1	1,47	9,71	0,01
T(Q)	$3,9 \times 10^{-3}$	1	$3,9 \times 10^{-3}$	0,02	0,88
Ác.(L)	1,56	1	1,56	10,34	0,01
Ác.(Q)	2,0	1	2,0	13,10	0,01
T x t	0,15	1	0,15	0,98	0,35
T x Ác	0,27	1	0,27	1,79	0,22
T x Ác	0,53	1	0,53	3,54	0,10
Res.	1,21	8	0,15	-	-
Total	8,56	17	-	-	-
Variância explicada 73,96%		Coeficiente Correlação 0,86		F _{cal.} 5,40	F _{tab (95%)} 3,39

Na Figura 4.2 (a, b) é apresentado o comportamento da concentração de ácido acético em função da variação de temperatura, tempo e concentração de ácido.

Figura 4.2: Gráfico de superfície de resposta para a concentração de ácido acético no hidrolisado.



Pela superfície da figura 4.2 tem-se que a região com maior concentração de ácido acético esta localizada nos pontos de temperatura acima de 110°C, concentração de ácido superior a 1,2% e acima de 40 minutos de extração. Aumentos nos valores de todas as variáveis estudadas levam, portanto, a aumento na formação do ácido.

Isso já era esperado, pois aumento nessas variáveis implicam aumento na severidade do tratamento. Contudo, é importante ter-se em conta que efeitos inibitórios para a levedura só foram observados por Silva (2001) para concentrações de ácido acima de 5g/L.

As maiores concentrações de ácido acético (2,54 e 2,31 g/L), para os experimentos 8 e 14 respectivamente (Tabela 4.3), não são portanto inibitórias para a etapa fermentativa. Segundo o autor, ainda, ao analisar-se o efeito inibitório do ácido acético deve-se também se considerar que esse efeito inibitório também depende da fase de crescimento em que se encontra a levedura.

Os resultados da análise de variância para a concentração de xilooligômeros e de furfural, mostraram que os modelos não apresentavam significância estatística em nível de confiança de 95%, com coeficiente de correlação e a percentagem de variância explicada de 0,7 e 52,1%, para xilooligômeros, e 0,6 e 32,5%, para furfural, respectivamente. Contudo, para rendimento em xilooligômeros, a variável de maior interesse neste trabalho, o ajuste já foi significativo em nível de 90% de significância ($F_{\text{calc}} = 2,5 > F_{\text{tab}} = 2,3$), podendo-se assim fazer previsões do comportamento dessa variável através do modelo ajustado.

A Tabela 4.6 apresenta os modelos empíricos codificados de primeira ordem, para as variáveis respostas estudadas com o bagaço *in natura* e que tiveram significância estatística no mínimo maior que 90%.

Tabela 4.6: Ajuste do modelo matemático para todas as variáveis respostas do planejamento experimental para o bagaço de cana *in natura*.

Variável resposta	Modelo matemático
Xilose (g)	$0,006951 + 0,004345 * T(L) + 0,003642 * H_2SO_4(L) + 0,003625 * H_2SO_4(Q)$
Rend. Xilo (%)	$1,223176 - 0,816130 * t(L) + 0,767800 * t(Q)$
Ácido acético (g/L)	$0,451368 + 0,308967 * T(L) + 0,327972 * t(L) + 0,338423 * H_2SO_4(L) + 0,395820 * H_2SO_4(Q)$

O modelo ajustado para a variável resposta xilooligômeros indica que a única variável significativa a influenciar é o tempo, com efeito positivo. Assim, espera-se que aumento no tempo de extração conduza a maiores rendimentos em xilooligômeros, sem grande aumento na conversão em xilose, uma vez que tempo não parece influenciar para essa última variável. Embora o modelo ajustado para ácido acético indique que tempo também influencia

positivamente na concentração de ácido, a influência no rendimento em oligômeros é quadrática e, portanto, mais sensível ao aumento no tempo de extração.

4.2.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar explodido com água

A Tabela 4.7 apresenta os valores das quatro variáveis respostas obtidas a partir dos experimentos realizados com as combinações dos níveis estudados para o bagaço explodido.

Tabela 4.7: Massas de xilose e de xilooligômeros (g) e concentrações de ácido acético e furfural obtidos para o DCCR obtidas após lavagem bagaço de cana previamente explodido sob diferentes temperaturas e relações sólido úmido/líquido, por 5 minutos. 5g de bagaço explodido (umidade 50%), com massa inicial de xilose contida no bagaço = 0,42g).

Relação sól/Liq	Temp. (°C)	Massa xilose extraída antes da hidrólise (g)	Massa total de xilana extraída (g)	Xilana extraída (%)	Xilooligômeros (%)	C _{Furfural} (g/L)	C _{Ac. acético} (g/L)
1:2	70	0,054	0,308	73,3	60,5	1,19	1,1
1:5	70	0,082	0,389	92,6	73,1	0,432	0,46
1:2	90	0,033	0,25	59,5	51,7	0,988	0,65
1:5	90	0,022	0,214	51,0	45,7	0,198	0,03
1:1,4	80	0,018	0,202	48,1	43,8	1,32	0,14
1:5,6	80	0,037	0,281	66,9	58,1	0,33	0,16
1:3,5	66	0,023	0,233	55,5	50,0	0,457	0,09
1:3,5	44,1	0,021	0,224	53,3	48,3	0,366	0,09
1:3,5	80	0,015	0,221	52,6	49,0	0,505	0,11
1:3,5	80	0,017	0,214	51,0	46,9	0,445	0,12

O processo de explosão a vapor utiliza altas temperaturas, seguido por uma descompressão rápida. O ácido acético é produzido durante o processo, o que diminui o pH. Em consequência, uma grande parte da hemicelulose passa a não ficar quimicamente ligada a biomassa podendo ser extraída através de um único processo de lavagem com água quente.

O bagaço explodido antes do início do pré-tratamento foi caracterizado de acordo com o item 3.2.2, sendo determinada 16,7 % de xilose correspondendo a 0,42g de xilose na massa de 2,5g de bagaço de cana explodido seco utilizado no processo. Essa massa de xilose contida no sólido inicial foi considerada com 100%.

Analisando-se a tabela 4.7 tem-se que a máxima extração de xilose foi 0,389 g para a condição de 70°C e relação sólido líquido 1:5, essa massa corresponde a aproximadamente 92,6% da xilana contida nas 5g de bagaço explodido que foram utilizados nessa extração com água quente. Entretanto dessa massa 73,1 % da xilana encontra-se na forma de oligômeros e o restante na forma de xilose.

Para a produção dos xilooligossacarídeos é interessante que se obtenha a extração da hemicelulose com a maior porcentagem na forma de oligomérica, visto que a etapa de purificação é de alto custo para o processo e para serem empregados comercialmente os XOS tem que apresentar pureza em torno de 95%.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) estão descritos na Tabela 4.8, onde se observa uma percentagem de variância explicada de 96,04% para um coeficiente de correlação de 0,96. O teste F também mostra que o valor de $F_{\text{calculado}}=54,60$ é maior que o valor de $F_{\text{tabelado}}=4,39$, mostrando que o modelo foi bem ajustado para esta variável. O p-valor mostra como única variável significativa a relação sólido-líquido (linear e quadrático). Aparentemente, as condições de extração não levaram a produção de furfural, sendo esse aumento de concentração devido à diminuição do volume de líquido (diferentes relações sólido-líquido).

A partir do modelo matemático (equação 15) pode-se construir a superfície de resposta para a concentração de furfural.

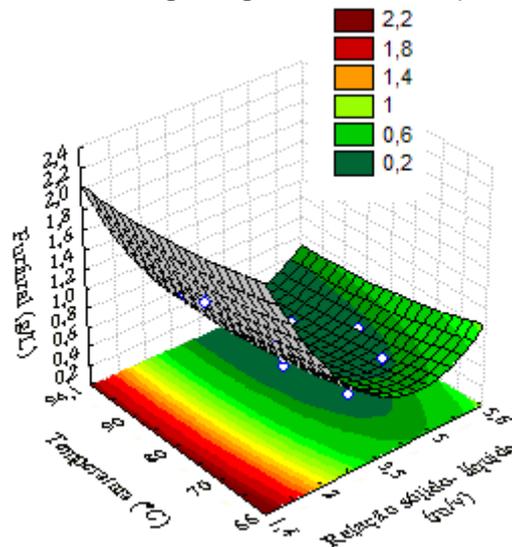
$$\text{Furfural} = 0,4100 - 0,368509 \cdot \text{Rel sol-liq (L)} + 0,228437 \cdot \text{Rel sol-liq (Q)} \quad 15$$

Tabela 4.8: Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta concentração de furfural para o bagaço de cana explodido.

	SQ	GL	MQ	TesteF	p
R (L)	1,09	1	1,08	128,3	$2,8 \times 10^{-5}$
R (Q)	0,34	1	0,33	39,4	$7,6 \times 10^{-4}$
T(L)	0,04	1	0,04	4,71	0,07
T(Q)	$3,0 \times 10^{-3}$	1	$3,0 \times 10^{-3}$	0,35	0,57
R x T	$2,5 \times 10^{-4}$	1	$2,5 \times 10^{-4}$	0,03	0,86
Res.	0,05	6	$8,4 \times 10^{-3}$	-	-
Total	1,52	11	-	-	-
Variância explicada			Coeficiente Correlação		
96,04%			0,96	$F_{\text{cal.}}$ 54,6	$F_{\text{tab (95%)}}$ 4,39

Na Figura 4.3 é apresentado o comportamento da variável concentração de furfural em função da variação de temperatura, tempo e da relação sólido- líquido para o bagaço explodido. Como era de ser esperar, a relação sólido-líquido é a variável responsável pela concentração de furfural, tendo suas maiores concentrações na faixa de menor relação massa- volume.

Figura 4.3: Gráfico de superfície de resposta para a concentração de furfural no hidrolisado.



Pode-se observar que as maiores concentrações de furfural no líquido extrativo foram obtidas quando utilizados os níveis baixos de relação sólido: líquido, indicando a alta influência desta variável dentro da faixa analisada.

Com base nos experimentos realizados tem-se que a máxima extração de xilose foi 0,389 g para a condição de 70°C e relação sólido líquido 1:5. Para analisar se a xilose quantificada já estava solubilizada anteriormente pelo processo de explosão a vapor ou se foi extraída a melhor condição obtida, citada anteriormente, foi repetida com e sem agitação mecânica (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Concentrações de xilose e de xilooligômeros (g/L) obtidas após lavagem com água a 70°C, e diferentes tempos e condições de agitação, de bagaço de cana previamente submetido a explosão com vapor. 5g de bagaço úmido (50% de umidade, 14,7% de hemicelulose, 16,7% de xilose) lavado com 25 mL de água (0,42g de xilose e $C_{\text{total xilose}} = 15,5\text{g/L}$ (0,42/ 27,5ml) (concentração máxima de xilose no pré-tratamento).

Condições	pH após extração	Xilana extraída como xilose (g/L)	Xilana total extraída (g/L)	Xilooligômeros (g/L)	Eficiência de extração de xilana (%)	Rend em oligômeros (%)
5 min Agitando	3	3,9	10,5 ±0,77	6,6	67,7	42,6
5min estacionário	3	3,8	10,8 ±0,77	7,0	69,7	45,2
30min estacionário	3	4,6	10,7 ±0,77	6,2	69,0	40,0
30 min agitando	3	4,1	11,5 ±0,77	7,4	74,0	47,7

O pH foi medido antes e depois da extração, não mostrando alteração significativa, garantindo assim que a água quente não causou alguma degradação de hemicelulose e liberação por consequência liberação de ácido acético no meio.

Analisando-se a Tabela 4.9 tem-se que 70% da xilana presente no bagaço explodido já foi solubilizada durante a explosão a vapor, sendo possível a sua remoção com água. Da xilana extraída, contudo, aproximadamente 45% já se apresentam na forma de xilose, o que não é interessante para a obtenção de XOS. Fica claro, assim, que as condições a que é submetido o bagaço de cana no processo de explosão já são demasiado severas, quando se deseja remover xilana majoritariamente como oligômeros. Decidiu-se, por isso, continuar o estudo apenas com bagaço *in natura*, que seria agora submetido a diferentes condições de tratamento alcalino, um tratamento conhecido na literatura por atingir altos teores de remoção simultânea de lignina e que poderá também levar a alto teor de remoção de xilana na forma de oligômeros. Uma vez que lignina pode ser facilmente separada de carboidratos dada a alta hidrofobicidade dela, uma condição que reduzisse bastante o teor de lignina, com alta extração também de oligômeros de xilana, seria de interesse tanto para a produção de etanol de celulose (fração sólida) quanto de XOS.

4.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com NaOH

4.3.1 Etapa 1- Estudos Preliminares

Nessa primeira etapa foram estudadas duas variáveis do processo de pré-tratamento com hidróxido de sódio: o tempo de reação (min) e a concentração de hidróxido de sódio (m/v).

Para isso foram realizados 12 experimentos em autoclave mantendo-se fixa a temperatura de 121°C e a relação sólido líquido de 1:10 (m/v).

A etapa de pré-tratamento foi realizada com a metodologia experimental descrita nos itens 3.4.2.2. Após cada etapa de pré-tratamento as amostras foram caracterizadas quimicamente conforme descrito na seção 3.2.

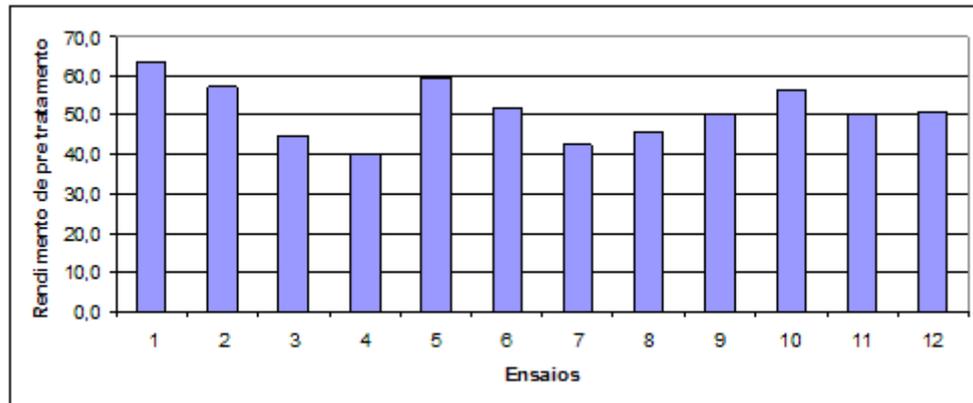
A Tabela 4.10 apresenta as faixas escolhidas para cada uma das variáveis com seus níveis respectivos e a composição química de cada ensaio.

Tabela 4.10: Tempos e concentrações de NaOH estudados na primeira etapa do estudo do pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar *in natura*. Teor de celulose, hemicelulose e lignina.

Ensaio	NaOH (%)	Tempo (min)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
1	1	15	55,6	24,7	16,9	2,1
2	3	15	57,4	21,1	10,5	6,6
3	2	15	65,3	18,0	13,6	2,2
4	4	15	68,2	19,0	10,9	1,4
5	1	30	58,0	25,2	13,4	3,2
6	2	30	58,7	23,1	10,8	6,9
7	3	30	64,0	17,8	10,5	7,0
8	4	30	64,7	21,2	11,8	2,1
9	1	60	69,6	15,5	10,3	4,0
10	2	60	59,4	22,6	15,1	2,6
11	3	60	61,2	16,4	19,8	2,4
12	4	60	64,5	19,1	14,3	1,6

A solubilização dos componentes da biomassa é maior, quanto maior for a severidade do processo. A figura 4.4 mostra as massas restantes após o pré-tratamento de 30 g de bagaço seco, calculadas conforme descrito no item 3.4.2.2. Nela nota-se que aproximadamente 50% de biomassa foi solubilizada no pré-tratamento. Além disso, observa-se que a maior perda de massa ocorreu nos ensaios 4 e 7 da etapa de pré-tratamento.

Figura 4.4: Rendimento em massa após o pré-tratamento de 30 g de bagaço seco com hidróxido de sódio em várias condições.



Após cada condição de pré-tratamento, como mostrado anteriormente, ocorre uma solubilização da biomassa e para ser possível uma correlação entre as porcentagens dos maiores constituintes (celulose, hemicelulose e lignina) é de extrema importância se utilizar a composição química corrigida pelo fator de solubilização do pré-tratamento. A Tabela 4. 11 a seguir mostra a composição química das biomassas corrigidas pelos respectivos rendimentos em massa de cada pré-tratamento, conforme descrito em detalhes na seção 3.4.2.2.

Tabela 4.11: Composição química das biomassas corrigidas pelo fator do pré- tratamento.

Componentes da biomassa	<i>In natura</i> (%)	Ensaio 1	Ensaio 1 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 2	Ensaio 2 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 3	Ensaio 3 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento
Rendimento			63,5		57,3		44,8
Celulose	38,8 ± 1,4	55,6	35,3	57,4	32,8	65,3	29,3
Hemicelulose	29,4 ± 1,7	24,7	15,7	21,1	12,1	18,0	8,1
Lignina total	21,7 ± 0,5	16,9	10,7	10,5	6,0	13,6	6,1
Cinzas	4,9 ± 1,1	2,1	1,3	6,6	3,8	2,2	1,0
Extrativos	5,1 ± 0,4	--	--				
TOTAL	99,9	99,31		95,6		99,1	

Componentes da biomassa	Ensaio 4	Ensaio 4 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 5	Ensaio 5 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 6	Ensaio 6 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 7	Ensaio 7 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento
Rendimento		40,0		59,8		52,1		42,4
Celulose	68,2	27,3	58,0	34,7	58,7	30,6	64,0	27,2
Hemicelulose	19,0	7,6	25,2	15,1	23,1	12,0	17,8	7,6
Lignina total	10,9	4,4	13,4	8,0	10,8	5,6	10,5	4,5
Cinzas	1,4	0,56	3,2	1,9	6,9	3,6	7,0	3,0
Extrativos								
TOTAL	99,5		99,8		99,5		99,4	

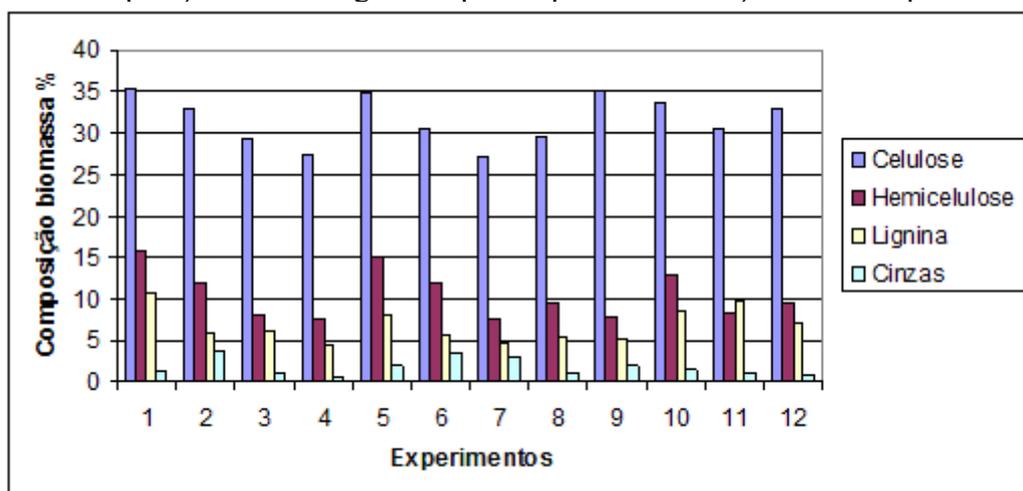
Componentes da biomassa	Ensaio 8	Ensaio 8 corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio 9	Ensaio 9 corrigido pelo rendimento de pré- tratamento	Ensaio 10	Ensaio 10 corrigido pelo rendimento de pré- tratamento	Ensaio 11	Ensaio 11 corrigido pelo rendimento de pré- tratamento
Rendimento		45,5		50,1		56,6		50,0
Celulose	64,7	29,5	69,6	34,9	59,4	33,6	61,1	30,5
Hemicelulose	21,2	9,6	15,5	7,8	22,6	12,8	16,4	8,2
Lignina total	11,8	5,4	10,3	5,2	15,1	8,5	19,8	9,9
Cinzas	2,1	1,0	4,0	2,0	2,6	1,5	2,4	1,2
Extrativos								
TOTAL	99,8		99,5		99,7		99,8	

Componentes da biomassa	Ensaio 12	Ensaio 12 corrigido pelo rendimento de pré- tratamento
Rendimento		51,0
Celulose	64,5	32,9
Hemicelulose	19,1	9,7
Lignina total	14,3	7,3
Cinzas	1,6	0,8
Extrativos		
TOTAL	99,5	

Na referida tabela observa-se que a maior percentagem de celulose ocorreu nos ensaios 1, 5 e 9, com teor corrigido de 35,3; 34,7 e 34,9 respectivamente. A maior percentagem de celulose foi obtida quando se utilizou no pré-tratamento a quantidade de hidróxido de sódio de 1 %.

Era de se esperar que com o aumento da quantidade de NaOH utilizada resultaria em uma celulignina com menor teor de lignina e conseqüentemente um maior teor de celulose. Contudo, a variação do teor de celulose entre a condição mais branda 1% NaOH 15 min. e 4% NaOH 30 min. foi menor que 10%. Tendo uma média de 31, % de celulose corrigida e um desvio padrão entre todos os teores de celulose de 3%, o que pode ser observado na figura 4.5.

Figura 4.5: Composição das celuligninas após respectivas condições de cada pré- tratamento.



A partir da figura 4.5 e os dados da tabela 4.11 pode-se observar que para os experimentos realizados 15 minutos (ensaios 1, 2, 3 e 4) apresentam uma correlação entre a solubilização de lignina, hidrólise da hemicelulose e perda de celulose em relação ao teor hidróxido de sódio. As equações 16, 17 e 18 a seguir mostram a relação linear entre a perda de celulose e o teor de NaOH, e a relação polinomial entre a solubilização da lignina e hidrólise da hemicelulose em relação ao teor de NaOH utilizado nos experimentos realizados com 15 minutos.

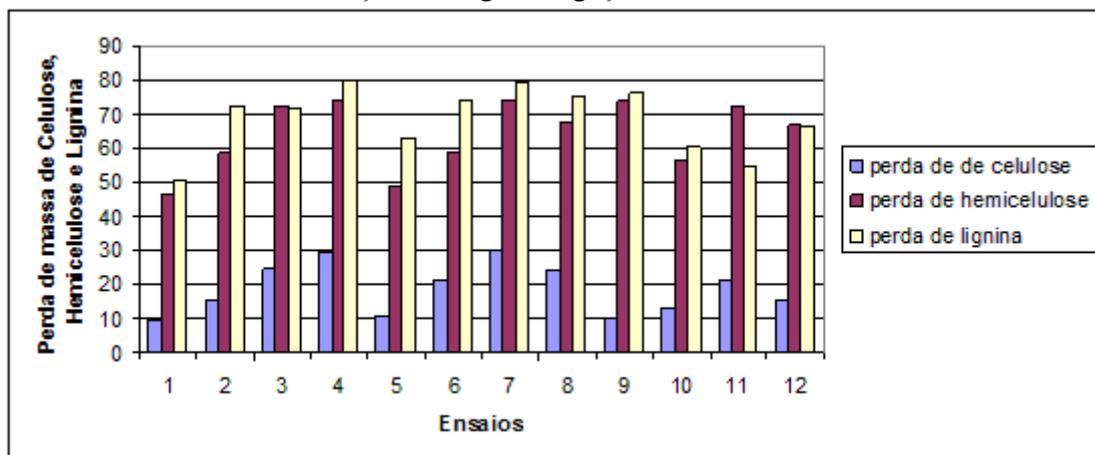
$$y = -2,9x + 41,4 \quad R^2 = -0,99 \quad 16$$

$$y = -19,0 + 2,8x^2 + 35 \quad R^2 = 0,99 \quad 17$$

$$y = -16,3 + 1,9x^2 + 43 \quad R^2 = -0,97 \quad 18$$

Para um pré-tratamento ser eficaz ele tem que retirar seletivamente a lignina e hemicelulose sem causar muitas perdas de celulose, para posterior sacarificação enzimática. De acordo com a figura 4.6, tem-se que com o aumento da concentração de NaOH e do tempo de reação ocorre uma maior perda de celulose, ficando em uma média de 17%.

Figura 4.6: Porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina após pré-tratamento alcalino em várias condições a 30g de bagaço *in natura* seco.



Segundo Chang et al, (2002), o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes. Afirmam que este pré-tratamento remove os grupos acetil e a adição de ar/oxigênio à mistura reacional melhora a deslignificação da biomassa, especialmente para materiais altamente lignificados como a madeira.

Segundo D'Almeida, (1988) durante o cozimento com hidróxido de sódio os produtos das reações ácidas dos carboidratos consomem a maior parte do álcali do licor de cozimento. É possível assim, que a quantidade presente de hidróxido de sódio nesses ensaios preliminares foi insuficiente para a neutralização dos ácidos (grupos acetil) gerados durante o processo e a deslignificação da biomassa. Sendo assim um aumento nas quantidades utilizadas de NaOH, poderia conduzir a uma maior porcentagem de deslignificação.

4.3.1.1 Hidrólise enzimática dos pré- tratados da etapa 1

Massas de bagaço de cana *in natura* e pré-tratada em diferentes condições no estudo preliminar foram submetidas a ensaios de hidrólise enzimática com o objetivo de se avaliar o efeito do pré-tratamento com hidróxido de sódio na conversão de celulose em glicose (tabela 4.12).

Tendo uma atividade enzimática da Accelerase 1500 de 108FPU/ ml extrato enzimático.

Tabela 4.12: Condições utilizadas no tratamento com NaOH de bagaço de cana *in natura*, respectivos teores residuais de celulose e de lignina, concentração de glicose e conversão de celulose em glicose obtido após 72 horas de sacarificação enzimática. Condições de hidrólise: 10% carga de sólido, 20FPU/g bagaço seco Accelerase 1500, T= 50°C, pH 4.8.

Bagaço de cana” in natura “	Celulose (%)	Lignina (%)	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose em glicose (%)
Sem tratamento	38,8	21,6	7	16,2
Ensaio 1 (1%NaOH 15 min)	35,3	10,7	38	58,5
Ensaio 4 (4%NaOH 15 min)	27,3	4,4	51,6	68,0
Ensaio 7 (3% NaOH 30 min)	27,2	4,5	50,7	71,3
Ensaio 8 (4% NaOH 30 min)	29,5	5,4	55,5	77,1
Ensaio 10 (2% NaOH 60 min)	33,6	8,5	44,8	67,9

Diversos autores têm mostrado que a redução do conteúdo de hemicelulose e lignina favorecem a hidrólise enzimática da fração celulósica (HSU, 1996; ÖHGREN et al, 2006).

Tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma barreira física contra o ataque enzimático à celulose, sendo a lignina um dos principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (BERLIN et al, 2005), pois as celulases adsorvem irreversivelmente à superfície da lignina permitindo apenas que pequenas quantidades destas enzimas sejam adsorvidas na celulose (MANSFIELD et al, 1999; PALONEN et al, 2004).

Na tabela 4.12 observa-se que a maior liberação de glicose ocorreu nos experimentos 4, 7 e 8; com 68, 71,3 e 77,1 % de conversão respectivamente.

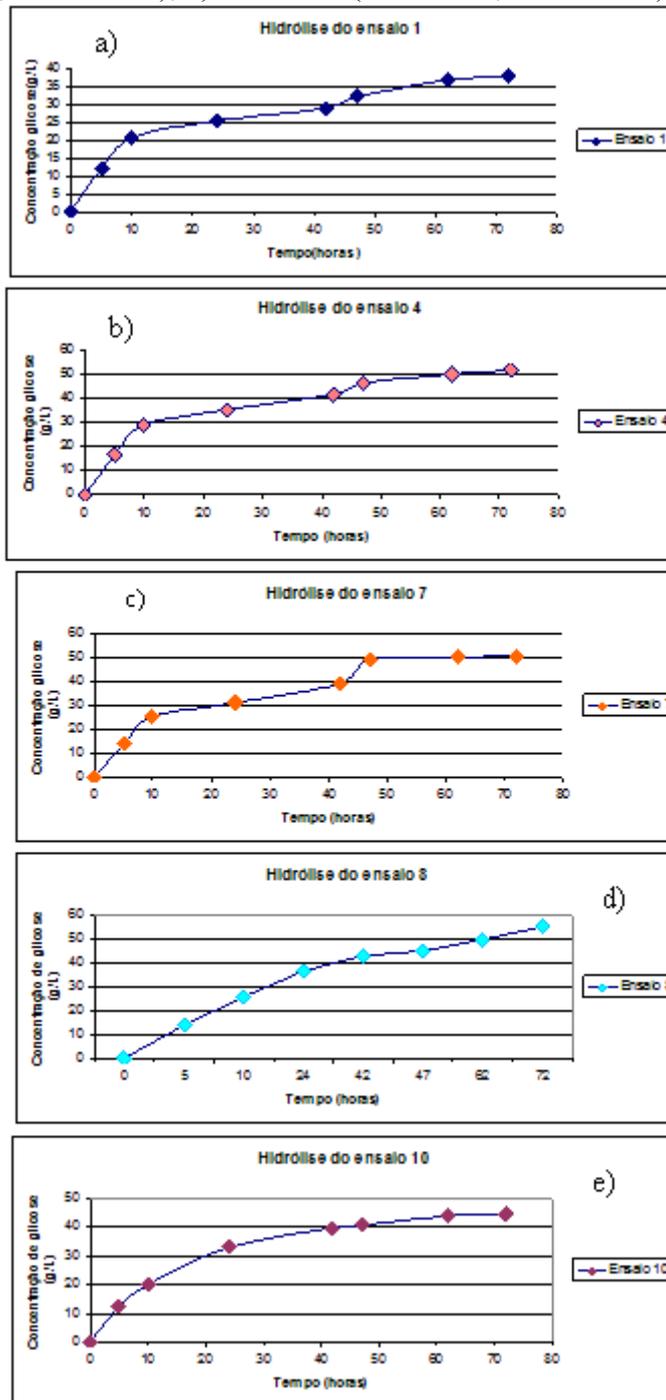
Tem-se que os experimentos 4, 7 e 8 apresentam os menores valores de lignina, em torno de 5 %.

Uma vez que as mais altas conversões de celulose em glicose também foram obtidas para esses bagaços, aparentemente esse componente é que apresenta a maior barreira para a hidrólise enzimática, ou seja, os pré-tratamentos que conduzem à maior redução ou rearranjo da lignina devem ser os mais eficientes, garantindo assim uma maior acessibilidade da enzima a celulose.

Esses resultados estão de acordo com os relatados na literatura evidenciando que a redução ou rearranjo da estrutura desse componente na etapa de pré-tratamento provoca uma extensa mudança na estrutura morfológica da biomassa lignocelulósica tornando a celulose mais acessível ao contato das enzimas celulolíticas e proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão de biomassa lignocelulósica em glicose.

A figura 4.7 apresentada a seguir ilustra a cinética da hidrólise enzimática em função do tempo do bagaço de cana submetidos previamente a tratamento com NaOH. Foram selecionados bagaços tratados sob condições de diferentes graus de severidade para esses ensaios. A hidrólise enzimática também foi realizada para o bagaço de cana in natura sem tratamento, mas somente pegando-se alguns pontos com a finalidade de obtenção de conversão de celulose em glicose, não sendo apresentada assim a sua cinética.

Figura 4.7: Concentração de glicose em função do tempo, na hidrólise de bagaço de cana *in natura* submetidos a tratamento alcalino sob diferentes condições: a) ensaio 1 (1% NaOH, 15 minutos) ; b) ensaio 4 (4% NaOH, 15 minutos); c) ensaio 7 (3%, NaOH 30 minutos); d) ensaio 8 (4% NaOH, 30 minutos); e) ensaio 10 (2% NaOH, 60 minutos).



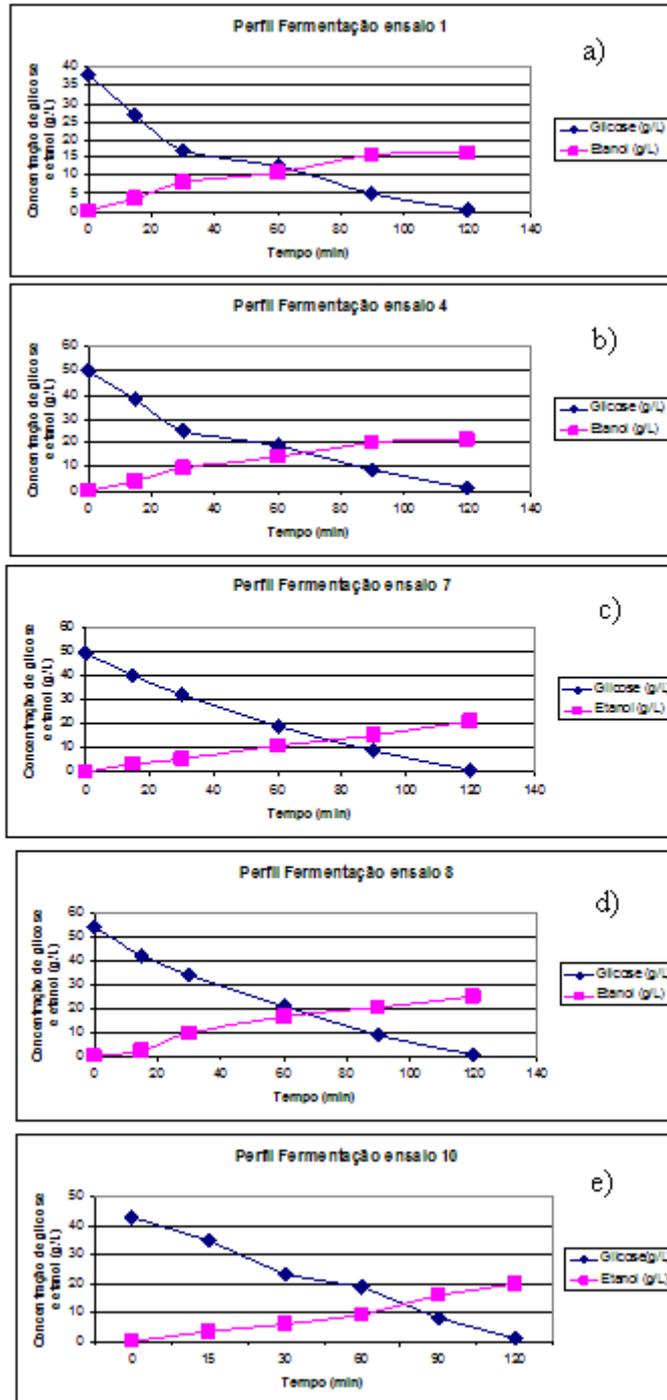
4.3.1.2 Fermentação da glicose gerada pela hidrólise dos pré-tratados da etapa 1

Após a hidrólise enzimática os hidrolisados obtidos das massas de bagaço de cana *in natura* tratados sob diferentes condições, foram submetidas à fermentação com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. A tabela 4.13 mostra dados de conversão de glicose em etanol após duas horas de cultivo para esses hidrolisados e a figura 4.8 mostra perfis de produção de etanol e consumo e glicose em função do tempo para os hidrolisados enzimáticos obtidos após 72h de hidrólise.

Tabela 4.13: Tempos e concentrações de NaOH usados no tratamento de bagaço de cana *in natura*, respectivos teores residuais de celulose, hemicelulose e de lignina e rendimentos em etanol após 120 min de fermentação do hidrolisado. Condições de fermentação 250 rpm, 30°C, *Saccharomyces cerevisiae*.

Bagaço de cana” <i>in natura</i> “	Celulose (%)	Lignina (%)	Concentração de etanol (g/L)	Rendimento em etanol (%)
Sem tratamento	38,8	21,6	3,0	85,7
Ensaio 1 (1%NaOH 15 min)	35,3	10,7	16,2	85,2
Ensaio 4 (4%NaOH 15 min)	27,3	4,4	21,2	84,8
Ensaio 7 (3% NaOH 30 min)	27,2	4,5	20,8	84,9
Ensaio 8 (4% NaOH 30 min)	29,5	5,4	20,4	92,6
Ensaio 10 (2% NaOH 60 min)	33,6	8,5	19,9	89,0

Figura 4.8: Concentrações de glicose (g/L) e de etanol (g/L) em função do tempo (min) durante fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* de hidrolisados enzimáticos provenientes de bagaço de cana *in natura* tratado com NaOH sob diferentes condições e submetidos a iguais condições de hidrólise enzimática. (■) etanol ; (◆) glicose) : a) ensaio 1; b) ensaio 4; c) ensaio 7; d) ensaio 8; e) ensaio 10.



Analisando os gráficos da figura 4.8 e os valores de rendimento em etanol mostrados na Tabela 4.13, observa-se uma similaridade quanto ao consumo da glicose e à

produção de etanol pela levedura, independentemente das condições de pré-tratamento empregadas.

Verifica-se que já nos primeiros 30 minutos de fermentação o consumo de glicose foi superior 50%, exceto para a condição 1 que apresentou consumo inferior correspondente a 44%.

Com relação à produção de etanol verifica-se ainda na figura 4.8 que a máxima concentração de etanol produzida foi em torno de 20 g/L para todos os hidrolisados, sendo assim supõe-se que no processo de lavagem após o pré-tratamento foi eliminado todas as possíveis substâncias inibidoras desta etapa.

Comparando-se os resultados obtidos com bagaços pré-tratados nas condições utilizadas com os do não tratado fica claro que a redução nos teores de lignina e hemicelulose melhoram muito o desempenho das enzimas na hidrólise, sem prejudicar o rendimento em etanol. Contudo, de modo geral, observa-se que as condições de pré-tratamento testadas não conduziram a grandes variações entre si na hidrólise e na fermentação. Decidiu-se por isso realizar uma nova série de experimentos, de modo sistemático, utilizando planejamento experimental, e ampliando a faixa de concentração das duas variáveis estudadas.

4.3.2 Etapa 2- Planejamento Fatorial

Nesse novo estudo a temperatura do pré-tratamento foi mantida fixa em 121°C. a faixa de concentrações de hidróxido de sódio entre 1% m/v – 7 % m/v e o tempo entre 30 e 90 minutos. Os experimentos foram realizados conforme descrito na seção 3.4.2.2. Após cada etapa de pré-tratamento as amostras foram caracterizadas quimicamente conforme descrito na seção 3.2 e em todos os ensaios foram quantificadas as massas de xilose antes e depois do processo de hidrólise ácida conforme metodologia experimental descrita na seção 3.5.

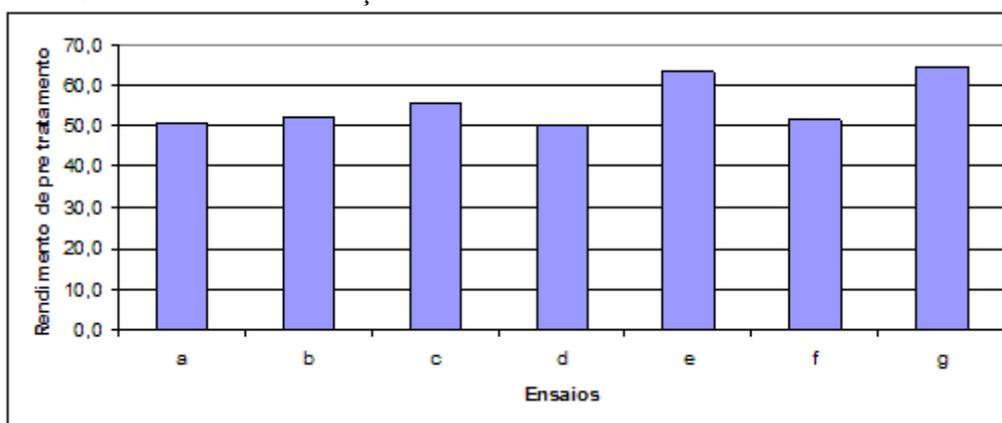
Na Tabela 4.14 apresenta-se a matriz de planejamento 2^2 com 3 repetições no ponto central e suas combinações e respostas. Em todos os ensaios foram quantificadas as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina e as concentrações de glicose liberadas na hidrólise enzimática.

Tabela 4.14: Tempo e concentrações de NaOH estudados no pré-tratamento de bagaço de cana *in natura* usando planejamento 2². Concentrações de celulose, hemicelulose e lignina.

Ensaio	Tempo (min)	NaOH (%m/v)	Celulose (%m/m)	Hemicelulose (%m/m)	Lignina (%m/m)
A	60	4	64,4	16,8	12,6
B	60	4	62,9	18,1	11,3
C	60	4	60,5	15,2	14,1
D	90	7	76,8	9,45	8,1
E	90	1	56,1	20,4	17,9
F	30	7	73,3	10,1	10,4
G	30	1	55,5	24,1	15,6

Após cada pré-tratamento ocorre uma solubilização da biomassa, correspondente a severidade do pré-tratamento. A figura 4.9 mostra as massas restantes após o pré-tratamento de 30 g de bagaço seco, calculadas conforme descrito no item 3.4.2.2. Nela nota-se que a quantidade de biomassa solubilizada no pré-tratamento aumenta com a quantidade de hidróxido de sódio utilizada.

Figura 4.6: Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento de 30 g de bagaço com hidróxido de sódio em várias condições.



Os ensaios e e f, respectivamente 1%, 30 minutos e 1%, 90 minutos apresentaram a menor solubilização da biomassa durante o pré-tratamento, apresentando assim o maior rendimento de pré-tratamento (massa após tratamento/massa inicial).

Dentre os ensaios realizados com NaOH 4% e 7% não foi observada uma variação significativa entre as solubilizações da biomassa.

Após cada condição de pré-tratamento, como mostrado anteriormente, ocorre uma solubilização da biomassa e para ser possível uma correlação entre as porcentagens dos maiores constituintes (celulose, hemicelulose e lignina) é de extrema importância se utilizar a composição química corrigida pelo fator rendimento em massa do pré-tratamento. A Tabela 4.

15 a seguir mostra a composição química das biomassas corrigidas pelo fator do rendimento em massa, conforme descrito em detalhes na seção 3.4.2.2.

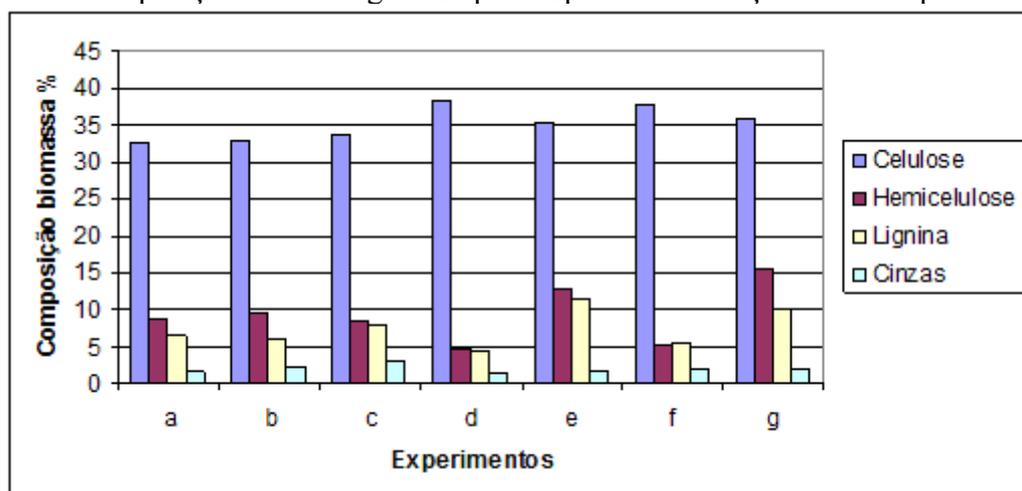
Tabela 4.15: Composições das celuligninas de cada condição do planejamento corrigido pelo fator de rendimento em massa do pré-tratamento.

Componentes da biomassa	<i>In natura</i> (%)	Ensaio a		Ensaio b		Ensaio c	
		Ensaio a	Ensaio a corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio b	Ensaio b corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio c	Ensaio c corrigido pelo rendimento de pré-tratamento
Rendimento			50,8		52,3		55,9
Celulose	38,8 ± 1,4	64,4	32,8	62,9	32,9	60,5	33,7
Hemicelulose	29,4 ± 1,7	16,8	8,5	18,1	9,5	15,2	8,4
Lignina total	21,7 ± 0,5	12,6	6,4	11,3	5,9	14,1	7,8
Cinzas	4,9 ± 1,1	2,9	1,5	3,9	2,1	5,2	2,9
Extrativos	5,1 ± 0,4						
TOTAL	99,9	96,76		96,3		94,99	

Componentes da biomassa	<i>In natura</i> (%)	Ensaio d		Ensaio e		Ensaio f		Ensaio g	
		Ensaio d	Ensaio d corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio e	Ensaio e corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio f	Ensaio f corrigido pelo rendimento de pré-tratamento	Ensaio g	Ensaio g corrigido pelo rendimento de pré-tratamento
Rendimento			49,9		63,3		51,6		64,7
Celulose	38,84 ± 1,4	76,8	38,4	56,1	35,5	73,3	37,8	55,5	35,9
Hemicelulose	29,38 ± 1,7	9,4	4,7	20,4	12,9	10,1	5,2	24,1	15,6
Lignina total	21,7 ± 0,5	8,1	4,1	17,9	11,3	10,3	5,4	15,6	10,1
Cinzas	4,94 ± 1,1	2,5	1,2	2,4	1,5	3,7	1,9	2,7	1,7
Extrativos	5,14 ± 0,4								
TOTAL	99,9	96,92		96,79		97,5		98	

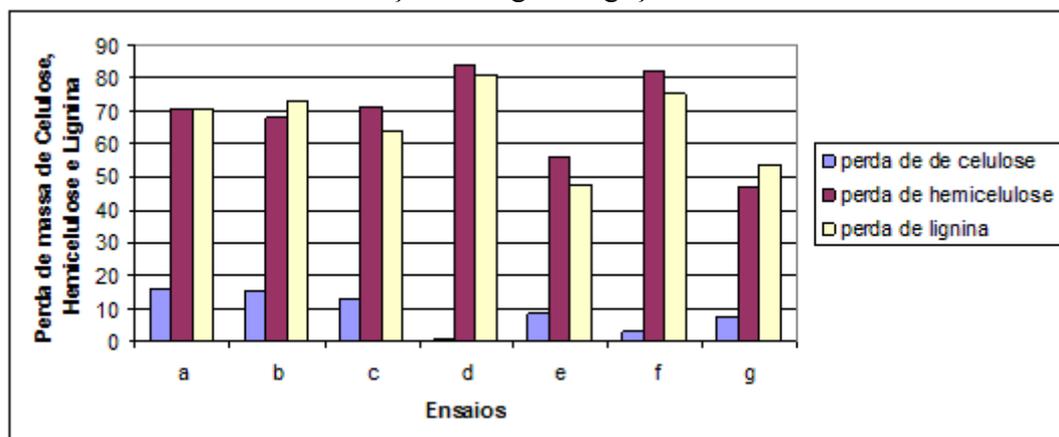
Na referida tabela observa-se que a maior porcentagem de celulose ocorreu nos ensaios d e f, ambos com 7% de NaOH, 90 e 30 min, obtendo-se 38,4 e 37,8% respectivamente. A maior porcentagem de celulose foi obtida, portanto, quando se utilizou no pré-tratamento a maior quantidade de hidróxido de sódio, 7%. Por outro lado, observa-se que a variável tempo não apresenta uma influência significativa no processo de pré-tratamento, ao contrário da variável concentração de NaOH. Resultados mostrados na Tabela 4.15 e Figura 4.9 mostram claramente que para ambas as concentrações de NaOH em que se variou o tempo, 1 e 7%, a variação do tempo não levou a alterações mais significativas do que as observadas na triplicata, ou seja, estão dentro do erro experimental. Conforme pode ser observado de acordo com a figura 4.10.

Figura 4.7: Composição das celuligninas após respectivas condições de cada pré- tratamento.



A partir da figura 4.11 tem-se a perda de massa de celulose, hemicelulose e lignina nos ensaios realizados.

Figura 4.8: Porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina após pré-tratamento alcalino em várias condições a 30g de bagaço *in natura* seco.



Na figura 4.11 observa-se que os ensaios e e g (ambos com NaOH 1%) apresentam a menor perda de celulose, seguido para os ensaios d e f, com NaOH 7% e para os ensaios a, b e c com NaOH 4%.

Segundo D’Almeida, (1988) durante um cozimento típico de polpa branqueável (cozimento com NaOH) aproximadamente 80% da lignina, 50% das polioses e 10% da celulose são dissolvidas.

Segundo Klock, (2010) nas reações que ocorrem no processo de polpação Kraft a lignina é quimicamente quebrada em fragmentos pelos íons hidroxil (OH) presente no licor de cozimento. Carboidratos, as polioses e a celulose, são também quimicamente atacados e dissolvidas em alguma extensão. A perda é causada pela dissolução dos carboidratos de baixo peso molecular, remoção de grupos ácidos e degradação pela chamada reação de “peeling”.

Em algumas biomassas a perda relativamente baixa de celulose, cerca de 10% é explicada pela baixa acessibilidade dos íons OH nas regiões cristalinas da celulose e devido ao tamanho das cadeias moleculares.

Era de se esperar uma relação linear entre a quantidade de soda utilizada e perda de carboidratos durante o processo de pré-tratamento, entretanto não foi isso o observado nesse estudo. Os experimentos realizados com NaOH 7% apresentaram uma menor perda de celulose do que os realizados com NaOH 4%.

Segundo Almeida, (2003) a viscosidade do meio é um parâmetro muito importante no processo de polpação, este é associado com o grau médio de polimerização e o peso molecular correspondente dos polímeros celulose e hemicelulose. Deste modo, geralmente maior viscosidade indica maior preservação dos carboidratos.

Então pode ser que no ensaio utilizando NaOH 7% tenha-se uma viscosidade maior do meio, promovendo assim uma maior integridade da celulose.

4.3.2.1 Hidrólise enzimática dos Pré-tratados da etapa 2

Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com diferentes condições de NaOH, com o objetivo de se avaliar o efeito do pré-tratamento na conversão de celulose, sendo os resultados apresentados na tabela 4.16.

Tabela 4.16: Efeito do pré-tratamento com hidróxido de sódio na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Bagaço de cana <i>in natura</i>	Celulose (%)	Lignina (%)	Concentração de glicose no hidrolisado (g/L)	Conversão de celulose em glicose (%)
Sem tratamento	38,8	21,6	7,0	16,2
Ensaio a (4%NaOH, 60 min)	32,8	6,4	38,8	54,2
Ensaio b (4%NaOH, 60 min)	32,9	5,9	42,3	60,4
Ensaio c (4%NaOH, 60 min)	33,7	7,8	39,7	59,0
Ensaio d (7% NaOH, 90 min)	38,4	4,1	65,6	76,0
Ensaio e (1% NaOH, 90 min)	35,5	11,3	29,4	47,2
Ensaio f (7%NaOH, 30 min)	37,8	5,4	61,4	75,3
Ensaio g (1%NaOH, 30 min)	35,9	10,1	29,2	47,3

Analisando a tabela 4.16, observa-se que após a etapa de pré-tratamento com NaOH a máxima conversão de celulose obtida foi em torno de 75,5% para as condição com NaOH 7%, 90 e 30 minutos.

Como a diferença obtida entre os dois rendimentos não foi significativo, visto que o erro obtido pela triplicata é de ± 3.2 , tem-se que a utilização de um maior tempo não resulta em maiores rendimentos em glicose.

Essa condição apresentou concentração de glicose de 65,6 g/L no hidrolisado, sendo este valore muito superiores aos obtidos pela hidrólise enzimática do bagaço de cana “*in natura*”

sem tratamento, os quais atingiram 16,0% de conversão celulósica e 7 g/L de concentração de glicose no hidrolisado.

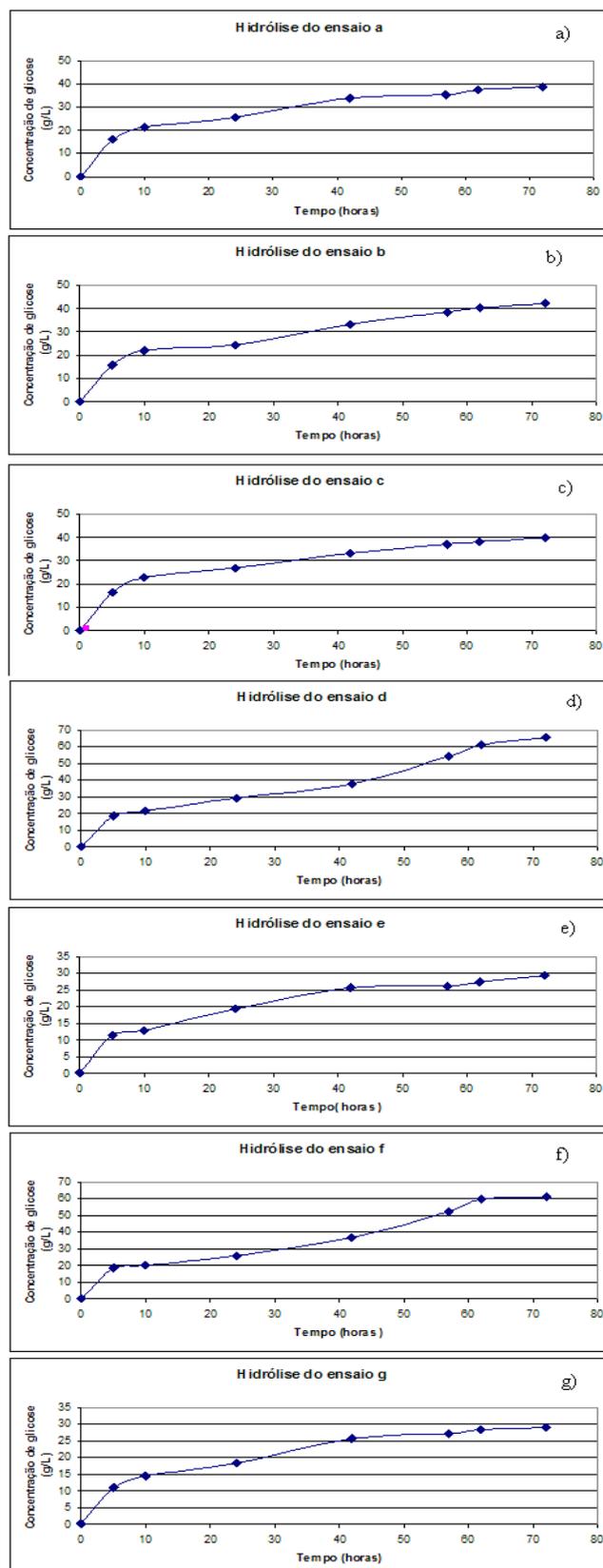
Assim como observado no item 4.3.2 a variável tempo também não se apresentou significativa para o rendimento em glicose na hidrólise, visto que os rendimentos apresentados entre os ensaios com a mesma concentração de NaOH e diferentes tempos não apresentaram incrementos que justificassem a utilização de um maior tempo de pré-tratamento.

Foi possível observar a partir dessa segunda etapa de experimentos que à medida que as condições do pré-tratamento aumentam tem-se uma maior solubilização da fração hemicelulósica e da lignina tornando essa mais acessível à atuação das enzimas celulolíticas e uma fragmentação ou deformação, com a consequente liberação de fragmentos de baixa massa molar no hidrolisado. (PETERSEN et al, 2009).

Todos estes fatores refletiram diretamente em um aumento da conversão celulósica em glicose, como pode ser observado pelo aumento na concentração de glicose no hidrolisado enzimático conforme o aumento da concentração de NaOH no pré-tratamento. Esse aumento deve ter fragmentado a lignina, facilitando sua remoção, resultando ainda em pequena quantidade residual de hemicelulose na fibra (4,7% - tabela 4.11) e uma fração celulósica mais acessível à ação do complexo celulolítico, indicando que há uma melhora significativa da conversão enzimática da celulose após a etapa de pré-tratamento (MUSSATTO et al, 2008).

A figura 4.12 apresentada a seguir ilustra a cinética em função do tempo da hidrólise enzimática dos ensaios do planejamento fatorial do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* em relação à concentração de glicose (g/L) ao decorrer do tempo.

Figura 4.9. Concentração de glicose em função do tempo, na hidrólise de bagaço de cana *in natura* submetidos a tratamento alcalino sob diferentes condições, etapa 2: a) (4% NaOH, 60 minutos) ; b) (4% NaOH, 60 minutos); c) (4% NaOH, 60 minutos); d) (7% NaOH, 90 minutos) ; e) (1% NaOH, 90 minutos); f) (7% NaOH, 30 minutos); g) (1% NaOH, 30 minutos).



Analisando-se a figura dos perfis de hidrólise, tem-se que cerca de 90% da conversão se dá em 45 horas, ocorrendo poucas alterações de concentração após esse tempo.

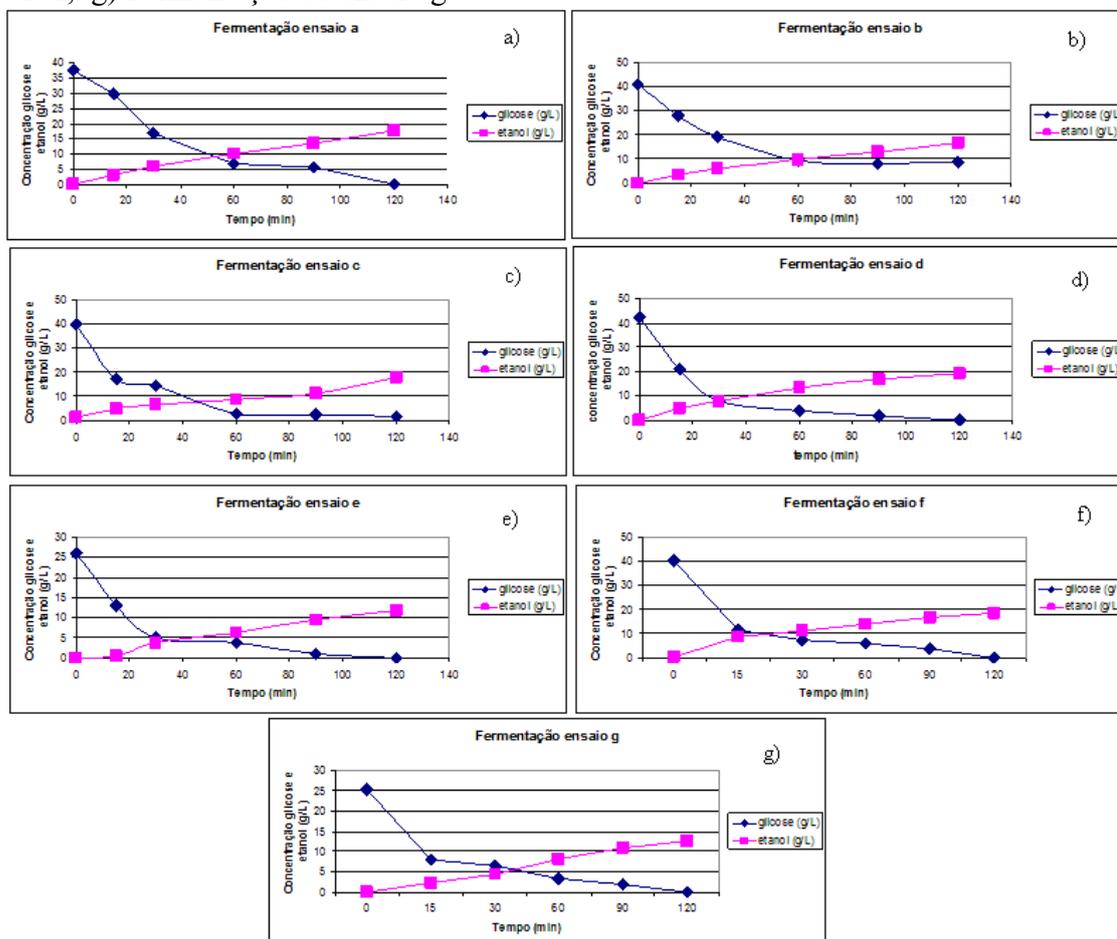
4.3.2.2 Fermentação da glicose gerada pela hidrólise dos pré-tratados da etapa 2

Após a hidrólise enzimática os hidrolisados obtidos das massas de bagaço de cana *in natura* tratados sob diferentes condições, foram submetidas a fermentação com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. A Tabela 4.17 mostra dados de conversão de glicose em etanol após duas horas de cultivo para esses hidrolisados e a figura 4.13 mostra perfis de produção de etanol e consumo de glicose em função do tempo para os hidrolisados enzimáticos obtidos após 72h de hidrólise.

Tabela 4.17: Tempos e concentrações de NaOH usados no tratamento de bagaço de cana *in natura*, respectivos teores residuais de celulose e de lignina obtidos e rendimentos em etanol após 120 min. de fermentação do hidrolisado. Condições de fermentação 250 rpm, 30°C, pH 4.8 *Saccharomyces cerevisiae*.

Bagaço de cana” <i>in natura</i> “	Celulose (%)	Lignina (%)	Concentração de etanol (g/L)	Rendimento em etanol (%)
Sem tratamento	38,8	21,6	3,0	85,7
Ensaio a (4%NaOH, 60 min)	32,8	6,4	16,5	88,3
Ensaio b (4%NaOH, 60 min)	32,9	5,9	16,7	81,7
Ensaio c (4%NaOH, 60 min)	33,7	7,8	17,8	89,2
Ensaio d (7% NaOH, 90 min)	38,4	4,1	19,0	90,0
Ensaio e (1% NaOH, 90 min)	35,5	11,3	11,6	89,8
Ensaio f (7%NaOH, 30 min)	37,8	5,4	18,1	89,8
Ensaio g (1%NaOH,30 min)	35,9	10,1	11,4	89,7

Figura 4.10: Comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o cultivo nos hidrolisados celulósicos obtidos pela hidrólise enzimática do bagaço de cana proveniente de diferentes condições de pré-tratamento com NaOH da etapa 2. Concentrações dos açúcares (g/L): (■) etanol ; (◆) glicose) : a) Fermentação ensaio a; b) Fermentação ensaio b; c) Fermentação ensaio c; d) Fermentação ensaio d; e) Fermentação ensaio e; f) Fermentação ensaio f; g) Fermentação do ensaio g.



Assim como observado a máxima concentração de glicose obtida foi em torno de 20 g/L com eficiências de fermentação entre 80-90%.

Segundo Lima et al, (2001) durante o processo de fermentação parte dos açúcares presentes no meio é consumido em reações paralelas necessárias a síntese do etanol, e por este motivo observa-se em processos de fermentação alcoólica industrial rendimentos ao redor de 90%.

4.3.2.3 Influência das condições de pré-tratamento na composição da fração líquida- Análise de oligômeros

Após o processo de pré-tratamento com hidróxido de sódio a fração líquida foi caracterizado segundo a metodologia descrita na seção 3.4.3 A Tabela 4.18 apresenta os resultados obtidos na extração de xilana durante o processo de pré-tratamento de hidróxido de sódio em várias condições, na etapa 2.

Tabela 4.18: Massa de xilose presente no bagaço de cana *in natura* (30g seco) sem pré-tratamento e massa de xilose obtida na celulignina obtida após tratamento com NaOH em várias condições. (24,14 % de xilose no bagaço *in natura* sem tratamento).

Ensaio	Tempo (min)	NaOH (%)	Massa de xilose no bagaço de cana <i>in natura</i> antes do pré-tratamento (g)	Massa de xilose no bagaço <i>in natura</i> após pré-tratamento	Solubilização da Xilana (%)
A	60	4	7,2	2,47	65,86
B	60	4	7,2	2,84	60,79
C	60	4	7,2	2,63	63,68
D	90	7	7,2	1,44	80,06
E	90	1	7,2	4,29	40,73
F	30	7	7,2	1,51	79,14
G	30	1	7,2	5,00	30,97

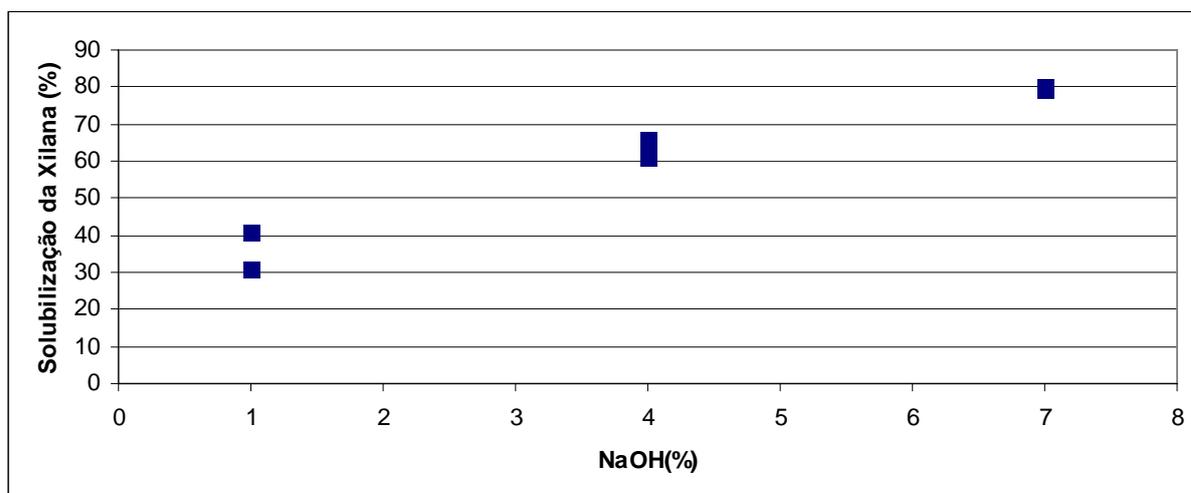
As xilanas da hemicelulose apresentam solubilidade em água e em álcali (SJÖSTRÖM et al, 1999) e devido a isso durante o processo de pré-tratamento grandes quantidades de xilanas são dissolvidas e eliminadas junto com a lignina para a fração líquida.

A solubilização da hemicelulose se deve a diversos fatores como baixo peso molecular, baixa cristalinidade, ramificação das cadeias poliméricas, baixa estabilidade dos monômeros componentes (xilose, galactose, manose, arabinose), e à presença de grupos acetilas (SJOSTROM et al, 1999).

Considerando-se somente o teor de xilose presente no bagaço de cana *in natura*, tanto antes como depois do pré-tratamento observa-se pela tabela 4.18 uma solubilização de até 80% da xilana, obtido com NaOH 7%, 30 minutos.

O gráfico da figura 4.14 mostra uma relação linear entre a concentração de NaOH e a solubilização da xilana presente no bagaço de cana, levando-se em consideração que assim como para as outras variáveis resposta o tempo também não se apresentou significativa.

Figura 4.11: Solubilização da xilana do bagaço *in natura* com diferentes concentrações de hidróxido de sódio.



A tabela 4.18 a seguir mostra os dados obtidos da análise da fração líquida recolhida após varias condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio ao bagaço de cana *in natura*.

Tabela 4.18: Dados da análise do líquido bruto recolhido após diferentes condições de pré-tratamento realizado a partir de 30g seco de bagaço *in natura*. (% de xilose + furfural no bagaço *in natura* sem trat =24,14%).

Ensaio	Tempo (min)	NaOH (%)	Massa de xilose que deveria estar no líquido após pré-tratamento(g)	Massa de xilose antes da hidrólise encontrada no líquido bruto (g)	Massa de xilose total encontrada no líquido (g)	Rendimento de extração de xilana (%)
A	60	4	4,8	0,006	2,6	55,6
B	60	4	4,4	0,009	2,3	52,0
C	60	4	4,6	0,009	2,4	51,9
D	90	7	5,8	0,006	2,3	40,4
E	90	1	2,9	0,016	0,8	25,9
F	30	7	5,7	0,011	2,9	50,0
G	30	1	2,2	0,014	0,6	27,8

Analisando-se a referida tabela tem-se que as massas de xilose, encontradas ao se analisar o líquido bruto após o pré-tratamento, apresentaram-se insignificantes, concluindo-se então que toda a xilose presente estava na forma de oligômeros (xilana). Esse resultado está de acordo com a literatura onde Tschirner et al, (2006), estudando a remoção de xilanas em condições alcalinas observou que com NaOH 4% (m/m) ocorre baixa remoção de xilanas até 170 °C, mas que a fração removida se apresenta na forma polimérica.

Após o processo de hidrólise da fração líquida, efetuada para a determinação da quantidade total de xilana presente, observou-se que as condições de pré-tratamentos com 4% e 7% apresentaram rendimentos de extração de xilana em torno de 50 %.

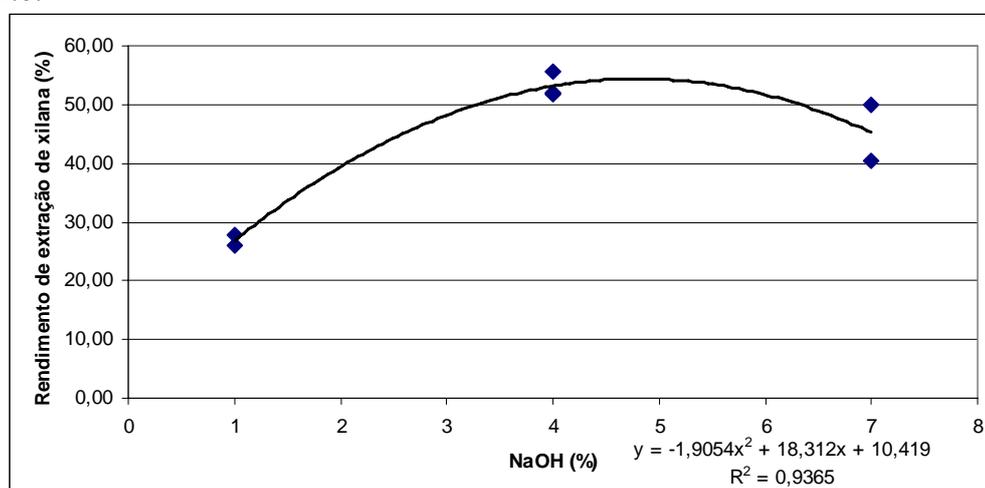
O tempo para rendimento em xilana com NaOH 7% se mostrou significativo, pois com 30 minutos 7% NaOH obteve-se 50 % e para 90 minutos 7% obteve-se 40,4%, indicando que o tempo de reação pode ter gerado produtos de degradação, como o furfural. Essa influência não foi observada para os experimentos realizados com concentração menor de hidróxido (1%), indicando que somente para concentrações altas a variável tempo é significativa para a extração de xilana para a fração líquida.

Também a partir dos dados da tabela pode-se observar que a massa encontrada de xilose no líquido é menor que a esperada, tomando a diferença entre a massa inicial de xilose na biomassa antes e depois do pré-tratamento, isso pode ter ocorrido devido a não contabilização de outros constituintes da cadeia da hemicelulose, já que a cada 10 xiloses na cadeia principal existe um ácido urônico ou uma arabinose (BRIENZO et al, 2010) e que durante a degradação da lignina esta arrasta açúcares que ficam unidos na fração líquida, mas o principal fator é devido a possível degradação da xilose em furfural, esta uma substância muito volátil difícil de ser totalmente contabilizada.

O teor de furfural foi quantificado, sendo encontrado antes da hidrólise uma concentração menor que 0,05 mg/mL e após a hidrólise em torno de 0,01mg/mL.

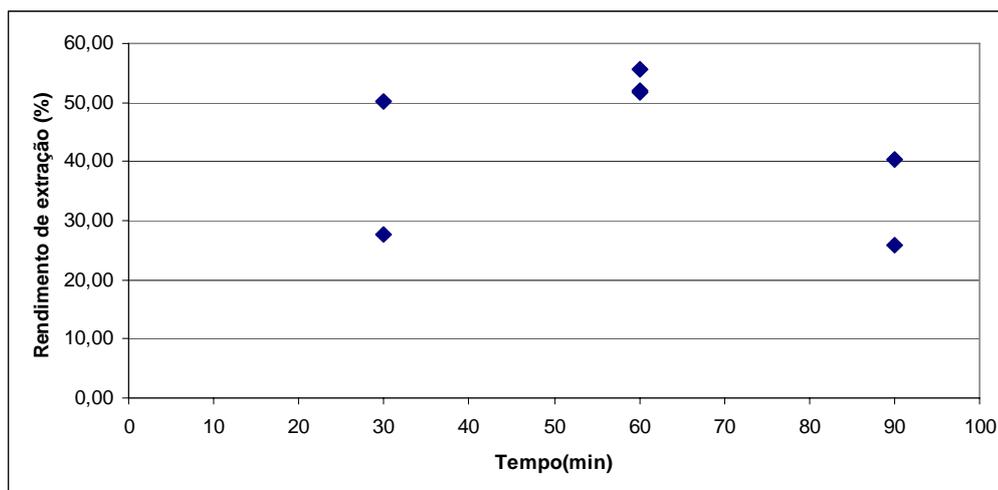
As figuras 4.15 e 4.16 mostram o gráfico do rendimento de extração de xilana versus a concentração de NaOH e tempo de reação.

Figura 4.12: Ajuste de tendência entre o rendimento de extração de xilana e concentração de NaOH (%) obtidos através da análise da fração líquida para as diferentes condições de pré-tratamento.



A partir da figura 4.15 pode-se estimar uma tendência entre a concentração de hidróxido de sódio e o rendimento de extração da xilana, tendo a melhor ajuste com o modelo polinomial e podendo a partir deste supor que o ponto máximo de extração de xilana estaria entre 4 e 7% de NaOH, mostrando um declínio no rendimento com a utilização de teores superiores de NaOH.

Figura 4.13: Ajuste de tendência entre o rendimento de extração de xilana e o tempo de reação obtidos através da análise da fração líquida para as diferentes condições de pré-tratamento.



A partir da Figura 4.16 não foi possível traçar uma tendência entre o tempo utilizado nos experimentos e a extração da xilana para a fração líquida.

A única observação que pode ser retirada é que considerando somente os pontos superiores nota-se uma tendência de diminuição do rendimento com o aumento do tempo, devido talvez à degradação do produto ou arraste de açúcares pela lignina solubilizada (complexo lignina-carboidrato).

4.3.2.4 Determinação dos efeitos principais e de interação das variáveis

A análise dos efeitos principais e de interação das variáveis foi realizada utilizando o software Statistica (Statsoft, v. 7.0) e a interpretação dos dados segundo Rodrigues e Iemma (2005).

Com o fim de avaliar a etapa do pré-tratamento com hidróxido de sódio, foram tomadas como variáveis resposta a produção de glicose após hidrólise enzimática do bagaço

pré-tratado, as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina e o rendimento em oligômeros de xilose obtidos na fração líquida.

A análise dos efeitos principais e das interações para as variáveis resposta estudadas podem ser vista na Tabela 4.19, considerando-se um nível de confiança de 95%.

Tabela 4.19a: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^2 com hidróxido de sódio para a variável resposta celulose.

	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente do Modelo	p-valor
Média	35,3	1,08	35,3	0,00006
(1) tempo (min)	0,1	2,8	0,05	0,97
(2) NaOH (%p/v)	2,4	2,8	1,2	0,46
1 by 2	0,5	2,8	0,25	0,87

Tabela 4.19b: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^2 com hidróxido de sódio para a variável resposta hemicelulose.

	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente do Modelo	p-valor
Média	9,25	0,29	9,25	0,000072
(1) tempo (min)	-1,6	0,78	-0,80	0,8000
(2) NaOH (%p/v)	-9,3,	0,78	-4,65	0,0012
1 by 2	1,10	0,78	0,55	0,2544

Tabela 4.19c: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^2 com hidróxido de sódio para a variável resposta lignina.

	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente do Modelo	p-valor
Média	7,3	0,4220	7,3	0,0004
(1) tempo (min)	-0,05	1,11	0,025	0,96
(2) NaOH (%p/v)	-5,95	1,11	-2,97	0,01
1 by 2	-1,25	1,11	-0,62	0,34

Tabela 4.19d: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^2 com hidróxido de sódio para a variável resposta glicose da hidrólise.

	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente do Modelo	p-valor
Média	43,77000	1,843541	43,77000	0,000164
(1) tempo (min)	2,24500	4,877551	1,12250	0,676632
(2) NaOH (%p/v)	34,18500	4,877551	17,09250	0,005965
1 by 2	2,01500	4,877551	1,00750	0,707273

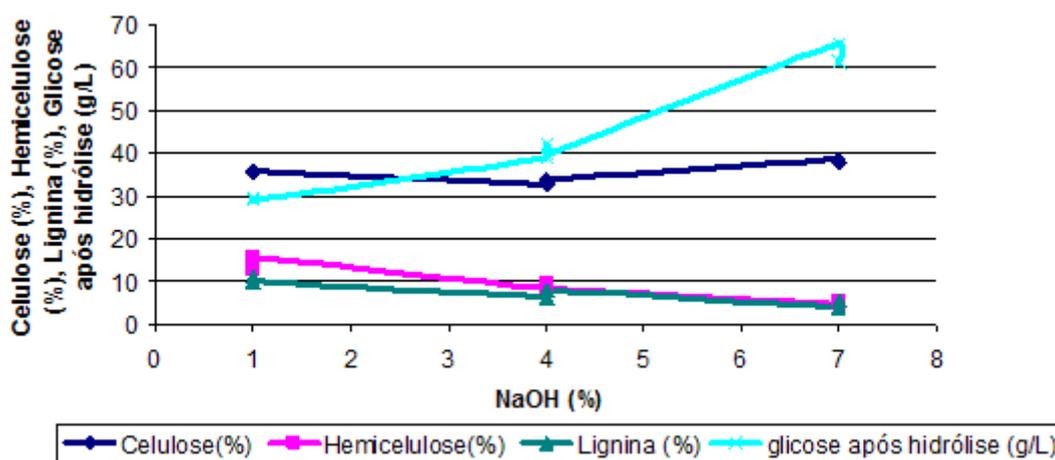
Tabela 4.19e: Análise dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento 2^2 com hidróxido de sódio para a variável resposta rendimento de extração de xilana.

	Efeito	Erro Padrão	Coefficiente do Modelo	p-valor
Média	49,4	6,05	49,3	0,0038
(1) tempo (min)	-6,2	16,01	-3,1	0,72
(2) NaOH (%p/v)	21,4	16,01	10,7	0,27
1 by 2	-4,65	16,01	-2,3	0,79

Analisando-se as tabelas 4.19 (a→d) tem-se que para todas as variáveis respostas, exceto celulose e rendimento de extração de xilana, os únicos efeitos que apresentam significância em relação ao respectivo erro padrão são a média e a concentração de hidróxido de sódio. Pode-se comprovar isso através da análise do p-valor, que para um nível de confiança de 95% apenas a concentração de NaOH apresenta-se significativa.

A figura 4.17 mostra a influência do teor de hidróxido de sódio utilizado nos pré-tratamentos nas variáveis respostas celulose, hemicelulose, lignina e glicose após hidrólise.

Figura 4.14: Influência do teor de hidróxido de sódio utilizado nos pré-tratamentos nas variáveis respostas celulose, hemicelulose, lignina e glicose após hidrólise



A partir da figura 4.17 pode-se observar uma relação linear entre a concentração de soda e as variáveis respostas estudadas na análises realizadas com a fração sólida .

Devido ao fato das análises estatísticas apresentarem que a única variável significativa para a obtenção do teor de hemicelulose, lignina, celulose e a glicose gerado após hidrólise é a concentração de hidróxido de sódio, considerou-se somente essa variável para a análise e previsão de um comportamento entre a concentração de NaOH e as variáveis respostas.

Pelo gráfico da figura 4.17 tem-se uma relação linear crescente entre a quantidade de hidróxido e o teor de celulose e a glicose gerada após hidrólise e uma relação linear decrescente entre a quantidade de hidróxido de sódio utilizada no pré-tratamento e o teor de hemicelulose e lignina restante no bagaço pré-tratado.

O ajuste linear das retas fornece as seguintes equações 19, 20 e 21, que são uma hipótese de modelo preditivo.

Hemicelulose $y = -2,0767x + 24,61$	$R^2 = 0,95$	19
Lignina $y = -1,25x + 17,863$	$R^2 = 0,97$	20
Glicose após hidrólise $y = 5,6975x + 20,98$	$R^2 = 0,93$	21

A tabela 4.20 a seguir traz para todas as condições de pré-tratamentos utilizados na etapa 2 um resumo dos fatores analisados, com teor de celulose, hemicelulose, lignina, conversão de celulose em glicose, rendimento em etanol, perda de celulose, solubilização de xilana, rendimento de extração de xilana.

Tabela 4.20: Condições utilizadas nos pré-tratamentos da etapa 2 e as análises realizadas para a fração líquida e sólida após o pré-tratamento , com celulose (%), hemicelulose (%), Lignina (%), a conversão de celulose em glicose (%), Rendimento em etanol (%), perda de celulose (%), solubilização da xilana (%) e rendimento de extração de xilana (%).

Ensaio	NaOH (%)	Tempo (min.)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Conversão de celulose em glicose (%)	Perda de celulose (%)	Rendimento em etanol (%)	Solubilização da Xilana (%)	Rendimento em extração de xilana (%)
a	4	60	32,8	8,5	6,4	54,2	15,6	85,7	65,86	55,64
b	4	60	32,9	9,5	5,9	60,4	15,3	88,3	60,79	52,04
c	4	60	33,7	8,4	7,8	59,0	12,8	81,7	63,68	51,85
d	7	90	38,4	4,7	4,1	76,0	1,2	89,2	80,06	40,42
e	1	90	35,5	12,9	11,3	47,2	8,5	90,0	40,73	25,89
f	7	30	37,8	5,2	5,4	75,3	2,7	89,8	79,14	50,05
g	1	30	35,9	15,6	10,1	47,3	7,5	89,8	30,97	27,76

Legenda (p/ etanol)

Maior teor de celulose

Menor teor de lignina

Maior conversão em glicose

Menor perda de celulose

Legenda (p/ oligômeros de xilana)

Maior solubilização de xilana

Maior rendimento de extração de xilana

Para a seleção da melhor condição dentre os pré-tratamentos realizados é necessário primeiramente separar a análise em duas frentes: do ponto de vista do etanol de celulose e do ponto de vista para oligômeros de xilose, cada análise leva-se em consideração vários fatores como conteúdo de celulose remanescente na biomassa, rendimento na hidrólise e fermentação da celulose.

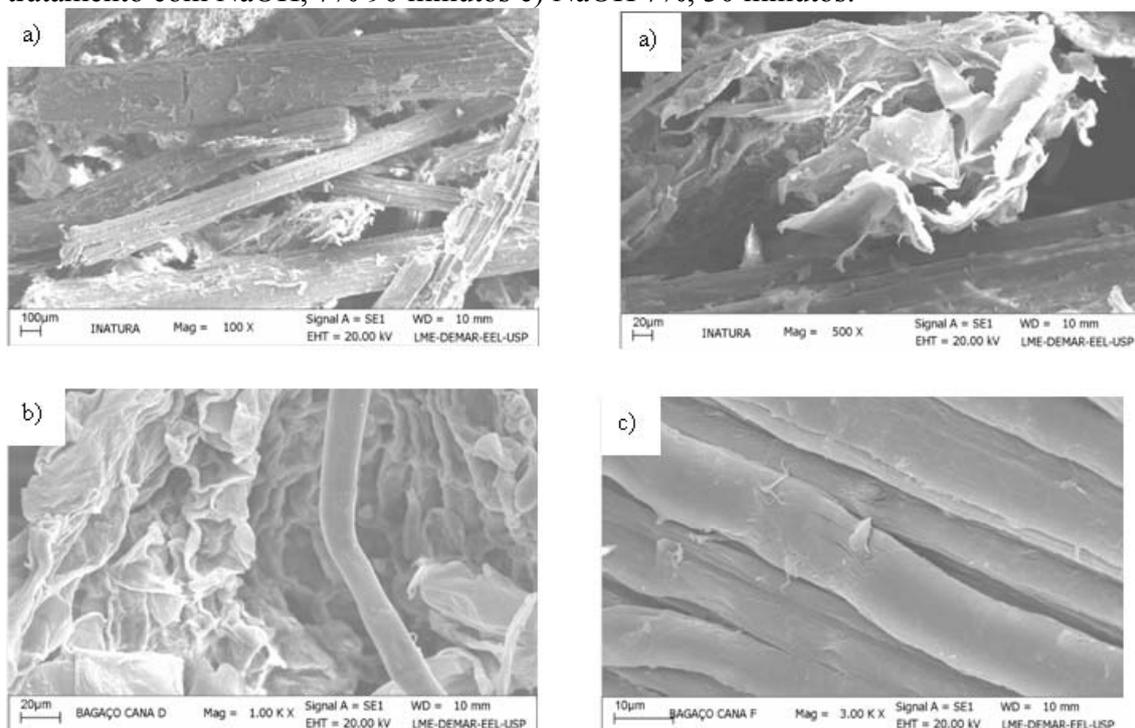
Para o etanol de celulose é de extrema importância que o pré-tratamento disponibilize a celulose para a posterior hidrólise enzimática sem sua degradação. Com base na tabela 4.24, tem-se que a melhor condição de pré-tratamento deste estudo é com NaOH 7%, 30 minutos, na qual ocorreu a maior deslignificação, resultando em torno de 5% de lignina na biomassa, o maior teor de celulose em torno de 38% e a menor perda de celulose em torno de 2%, garantindo assim um alto conteúdo acessível de celulose para a degradação enzimática, com uma conversão em torno de 75,5% com rendimento em etanol de 90%.

Com a finalidade de obtenção de oligômeros de xilose a melhor condição obtida foi 4% NaOH, 60 minutos com uma solubilização da xilana do bagaço *in natura* de aproximadamente 65%, correspondendo a um rendimento de extração de xilana de 55%.

4.3.2.5 Análise morfológica do bagaço de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A figura 4.18 mostra as fotomicrografias realizadas na biomassa após pré-tratamento com hidróxido de sódio a varias condições e temperaturas.

Figura 4.15: Fotomicrografias: a) bagaço de cana *in natura* sem pré-tratamento b) após pré-tratamento com NaOH, 7% 90 minutos c) NaOH 7%, 30 minutos.



Analisando as fotomicrografias do bagaço de cana “*in natura*” (figura 4.18 a) e após a etapa de pré-tratamento 7 % NaOH, 90 minutos - (figura 4.18 b) e etapa de pré-tratamento 4% NaOH, 30 minutos – (figura 4.18 c) observa-se que o pré-tratamento removeu ceras, cinzas e outros fragmentos na superfície tornando as fibras mais nítidas.

È possível observar que o pré-tratamento promoveu uma abertura e fragmentação da estrutura morfológica da biomassa do material lignocelulósico, tornando a celulose mais disponível à hidrólise enzimática.

CONCLUSÕES

- A caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar é um etapa extremamente importante e um dado essencial do trabalho sendo utilizada como parâmetro comparativo entre as condições de pré-tratamento utilizadas. O bagaço *in natura* apresentou teor de 38,8 % de celulose; 29,4 % de hemicelulose; 21,7% de lignina total; 5,1% de extrativos e 4,9% de cinzas. Para o bagaço explodido obteve-se 41,8% de celulose, 20,9% de hemicelulose, 34,3% de lignina total e 2,2% de extrativos.
- Para a utilização da xilana presente no bagaço de cana é necessária a sua separação dos demais polímeros e na remoção de hemicelulose do bagaço de cana *in natura* com solução de ácido sulfúrico obteve-se 94% de extração de xilana na forma de xilooligômeros para a condição 0,8% v/v H₂SO₄, 13 minutos a 83°C com um mínimo teor de xilose (0,006g) , furfural (0,004g/L) e ácido acético(0,23 g/L), sendo uma condição de extração favorável para produção de XOS; mas se etanol for o produto final desejado é preciso aumentar o grau de severidade do pré-tratamento para maior extração da hemicelulose na forma de xilose.
- Na remoção de hemicelulose do bagaço de cana explodido, devido ao fato de ser um material que já provem de um pré-tratamento hidrotérmico tem-se uma prévia solubilização da hemicelulose da biomassa, devido a presença de ácido acético liberado durante o processo de explosão a vapor. A lavagem realizada com água na relação 1:5 (m/v) a 70 °C, 5 e 30 minutos com e sem agitação permitiu uma extração de 70% da xilana da biomassa, tendo que dessa fração 45% já se encontrava na forma de xilose, o que não apresenta um valor atrativo para a obtenção de XOS, visto que o alto custo da etapa de purificação. Tendo assim tem-se que em torno de 70% da xilana presente no bagaço explodido já foi solubilizada durante o processo de explosão a vapor. Então como as condições a que é submetido o bagaço de cana no processo de explosão já são demasiado severas, utilizou-se somente o bagaço de cana *in natura* para os ensaios do pré-tratamento alcalino.
- Na primeira etapa do pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com hidróxido de sódio a maior porcentagem de celulose obtida foram de 35,3%, 34,7% e 34,9 % para os ensaios 1% NaOH/ 15 min; 1% NaOH/ 30min e 1% NaOH 60 min. Não foi

possível estabelecer uma relação entre a faixa utilizada e as variáveis, com uma variação do teor a variação do teor de celulose entre a condição mais branda 1% NaOH 15 min. e 4% NaOH 30 min. menor que 10%. Tendo uma média de 31, % de celulose corrigida e um desvio padrão entre todos os teores de celulose de 3%.

- Na segunda etapa do pré-tratamento com NaOH a faixa estudada foi aumentada de 1-7% de NaOH. Na condição 7% NaOH 30 minutos, ocorreu a maior deslignificação, resultando em torno de 5% de lignina na biomassa, o maior teor de celulose em torno de 38% e a menor perda de celulose em torno de 2%, garantindo assim um alto conteúdo acessível de celulose para a degradação enzimática, com uma conversão em torno de 75,5% com rendimento em etanol de 90%.
- Após o pré- tratamento a fração líquida foi analisada e observou-se uma solubilização de até 80% da xilana presente na biomassa, para o ensaio de NaOH 7% 30 minutos. Visto que a variável tempo não se mostrou significativa para a solubilização da xilana na biomassa. Para o rendimento de extração de xilana na forma oligomérica, observou-se rendimentos de 50% para as condições de pré-tratamento com 4 e 7% de NaOH. O tempo para rendimento em xilana com NaOH 7% se mostrou significante, pois com 30 minutos 7% NaOH obteve-se 50 % e para 90 minutos 7% obteve-se 40,4%, indicando que o tempo de reação pode ter gerado produtos de degradação, como o furfural. Essa influência não foi observada para os experimentos realizados com concentração menor de hidróxido (1%), indicando que somente para concentrações altas a variável tempo é significativa para a extração de xilana para a fração líquida.
- Para a obtenção de oligômeros de xilose a melhor condição obtida foi 4% NaOH 60 minutos com uma solubilização da xilana do bagaço *in natura* de aproximadamente 65%, correspondendo a um rendimento de extração de xilana de 55%.
- Tem-se uma relação linear entre a concentração de NaOH e a solubilização da xilana presente no bagaço de cana.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Açúcares funcionais: produção de galactooligosacarídeos por galactosidases utilizando metodologia de superfície de resposta. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10-14, 2004.

ALMEIDA, F. S. **Influência da carga alcalina no processo de polpação Lo- Solids para madeira de eucalipto**. 2003. 114p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ALONSO, J. L. et al. Xylooligosaccharides: properties and production technologies. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v.2, p. 230-232, 2003.

ANNUNCIADO, T. R. **Estudo da *Chorisia speciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor petrolífero**. 2005. 120p. Dissertação (Mestrado)- Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ARATO, C.; PYE, E.K.; GJENNESTAD, G. The lignol approach to biorefinery of wood biomass to produce ethanol and chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p 871-882, 2005.

ATALLA, R. H. et al. Hemicelluloses as structure in the aggregation of native cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 109-112, 1993.

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

BALÀZSY, A. T.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Hungria: Ed Plant a Tree, 1999.

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

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica. In: FAPESP - WORKSHOP DO PROJETO DIRETRIZES DE POLÍTICAS PÚBLICAS PARA A AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO: Produção de etanol. Lorena, 2006. **Anais** Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/cana/>>. Acesso em: dez. 2010.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar., 2007.

BAUDEL, Relatório final - Workshop Hidrólise de Material Lignocelulósico Sessão 2: “Pré-tratamento / Hidrólise” Palestrante: Henrique Baudel – UFPE, 2006

BAUDEL, H.M. Pré-tratamento e hidrólise. In: Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, projeto programa de pesquisas em políticas públicas. 3; 2006, Campinas. Palestra. Campinas: UNICAMP, 2006.

Disponível em:

<<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2009.

BENAR, P. **Polpação acetosolv de bagaço de cana e Madeira de eucalipto**. 1992. 82f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica)- Departamento de química inorgânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 163-170, 2005.

BERTONCINI, E. I. Projeto diretrizes de políticas públicas para a agroindústria canavieira do Estado de São Paulo - Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP). In: **Workshop: Aspectos ambientais da cadeia do etanol de cana-de-açúcar**, 2008, Piracicaba.

BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

BIOETANOL de cana. 2008. Disponível em:<<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em 12 de dezembro de 2008.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v.19, p. 797–841, 1994.

BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. cAMP-mediated differential regulation of lignina peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 12, p. 5586–5590, 1992.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Xylooligosaccharides production from alkali pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.1195-1205, 2010.

BROWNING, B. L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 1963.

CAMPBELL, C. M. et al. Effects of pressure treatment of sugar cane bagasse upon nutrient utilization. **Proceedings Western Section American Society Animal Science**, v. 24, p. 178-184, 1973.

CANO, A. et al. Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, p. 261-268, 2006.

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

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos obtidas a partir de celulignina do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2006. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Chemistry, v. 74, p. 1271, 2002.

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

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

COLLINS, T. et al. A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p 35133-35139, 2002.

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 Pesquisa Tecnológicas do estado de São Paulo, 1988. v.1, p. 45- 106.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation Products on ethanol fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.19, p.220-225, 1996.

DETROY, R.W. et al. Bioconversion of wheat straw to ethanol: chemical modification, enzymatic hydrolysis, and fermentation, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1527-1535, 1981.

DUARTE, H. C. **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. 1989, 112p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

ELSHAFEI, A. M. et al. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Bioresources Technolgy**, v. 35, p. 73–80, 1991.

ERIKSSON, O.; GORING, D. A. I.; LINDGREN, B. O. Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. **Wood Science and Technology**., v. 14, n. 4, p. 267-279, 1980.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 23, p. 157-187, 1982.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis biotechnology monographs**. Berlin: Springer, p.57. 1987.

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

FUJINO, T. et al. Characterization of cross-links between cellulose microfibrils, and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl. **Plant Cell Physiology**.v. 41, n. 4, p.486- 494, 2000.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.78-88, 2006.

- GARROTE, G. et al. Antioxidant activity of by products from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.191-200, 2004.
- GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H.; FAN, L. T. Structural modification of lignocellulosics by treatment to enhance enzymatic hydrolysis **Biotechnol and Bioengineering**, v. 26, p. 426-433, 1983.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulases activities. **Pure Applied Chemistry**. v. 59, p. 257–268, 1987.
- GOLDEMBERG, J. The challenge of biofuels. **Energy & Environmental Science**, v. 1, p. 523-525, 2008.
- GOLDMAN, N. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis fo xylan to improve xylo-oligosaccharide yield. MMG 445. **Basic Biotechnology**, v. 5, p. 31-36, 2009.
- GOMEZ, R. J. H. **Sacarificacao da hemicelulose do bagaco de cana-de-acucar e sua fermentacao por pachysolen tannophilus**. 1985, Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agricola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,1985.
- 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.
- GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. **Crop Science**, v.45, p.820–831, 2005.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006.
- HARTLEY, R. D.; FORD, C. W. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. **American Chemical Society Symposium**, v. 399, p. 137- 145, 1989.
- HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Solvents applied in the field of cellulose chemistry- a mini review. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 84-89, 2005.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WILKEMAN, J. **Clinical chemistry, principles and techniques**. 2. ed. Nova Iorque: Harper and Row Publishes, 1974.

HINMAN, N. D. et al. Xylose fermentation: an economic analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20/21, p. 391–410, 1989.

HIRAYAMA, M. Novel physiological functions of oligosaccharides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1271, 2002.

HOLTZAPPLE, M. Hemicellulose. In: MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M.J. (Ed.). **Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition**. London: Academic Press, 1993. p. 2324-2334.

HU, B. et al. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. **Anaerobe**, v. 12, p. 260-266, 2006.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: **HANDBOOK on bioethanol: production and utilization**. Washington: Taylor & Francis, 1996, p.179-188.

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

KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. Cellulose structure: a review. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 34, p. 197-216, 2000.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzymedigestibility of corn stover. **Bioresources and Technology**, v. 97, p. 583–591, 2006.

KIRK, T. K.; CULLEN D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wooddegrading fungi. In: Young, R.A. & Akhtar, M. (eds.): **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273-307.

KIYOHARA, M. et al. Structure of -1,3-xylooligosaccharides generated from *Caulerpa racemosa* var. *laete-virens* -1,3-xylan by the action of 1,3-xylanase. **Journal of Biochemistry**, v. 140, p. 369-373, 2006.

KLOCK, U. **Disciplina Polpa e Papel**. Curitiba: UFPR/DEIM, 2010. Disponível em: <www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock> . Acesso em: jan. 2011. Nota de aula expositiva.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Potential Source of Energy and Chemical Products. **The Biotechnology of Ethanol**. M. Roehr. Weinheim, WILEY-VCH. 2001

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnology aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 411-456, 1999.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 28, n. 8, p. 3713- 3729, 2009.

LADISCH, M. R. et al. Process considerations in enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 82–102, 1983.

LASER, M. **Hydrothermal pretreatment of cellulosic biomass for bioconversion to ethanol**. Ph. D. Thesis, Thayer School of Engineering, Dartmouth College. 2001.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry. Biotechnolgy**, v. 124, n1-3, p.1081–1099, 2005.

LEE, D. et al. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45, p. 407–415, 1994.

LIMA, U.; BASSO, L.; AMORIM, H. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos. 2005. Seção 2: **Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil**, p.141.

MACHADO, O. L. T. **Descompressão rápida como pré-tratamento de madeira para hidrólise enzimática**. Tese de mestrado -Instituto de Química UFRG Rio de Janeiro 1982

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 804-816, 1999.

MARK, H.; MEYER, K. H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1928**, 61, 593.

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, 2007.

MARTIN, P. C. et al. The use of fibrous sugacane by-products by ruminants. Effect of NaOH pressure combination on the digestibility and chemical composition of bagasse and bagasse pith. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 8, p. 21, 1977.

MATSUO, T.; MIZUNO, T. Acetyl groups in native glucomannan from ester lily bulbs. **Agricultural na Biology Chemistry**, v. 38,p. 465-466, 1974.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. **In Enzymatic ConVersion of Biomass for Fuels Production**; Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds.; American Chemical Society, Washington, DC, p 292-324, 1994.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xiloologossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38 n.2, Mar./Abr. 2008.

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

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 187-192, 1995.

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

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; DRESCHER, R. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. Paper 103, BIOT Division, 225th **American Chemical Society Meeting**, New Orleans, 26 March 2003, 2003a.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., WELCH, G., et al. Corn fiber pretreatment scale up and evaluation in an industrial corn to ethanol facility. Paper 6A-04, 25th Symposium on **Biotechnology for Fuels and Chemicals**, Breckenridge, CO, 2003b.

MUSSATTO, S. I. et al. Effect of hemicelluloses and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.

NARCISO, G. V. et al. Palha de Sorgo: biomassa lignocelulósica potencial para utilização em bioprocessos que envolvem o aproveitamento da fração hemicelulósica. In: SINAFERM – SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2009, Natal. **Anais**. Rio Grande do Norte: UFRN, 2009.

NETO, P. O. Efeito de fatores inibidores na fermentação alcoólica. In: FAPESP. **Workshop** do Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo: Qualidade da Matéria Prima. Lorena, 2008.
Disponível em <<http://www.apta.sp.gov.br/cana/>>. Acesso em julho de 2010

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

NOJIRI, N. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP2009159904-A **2009**. (CA 151:175883).

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 171-207, 1997.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidólise enzimática de biomassa: revisão, **Química Nova**, v.33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

ÖHGREN, K. et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 28, p. 2503-2510, 2006.

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial: novas usinas, variedades mais produtivas e pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, n. 122, 2006.

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technoly** v. 74, p. 17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technoly**, v.74, p.25–33, 2000b.

PANDEY, A. Et al. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2005. 62 p. (Séries em Biotecnologia. Tecnologia de Bioprocessos).

PARVEEN, K. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic materials for efficient hydrolysis and bioethanol production. **Industrial Engineering and Chemistry Research**, v. 48, p. 3723-3729, 2009.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.

PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw or production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p.834-840, 2009.

PLAYNE, M. J. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. **Biotechnoly and. Bioengineering**, v. 26, p. 426-433, 1984.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbioly and Biotechnoly**, v. 67, p. 577-591, 2005.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, 2005.

PUCCIO, G. et al. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. **Nutrition**, v. 23, p. 1, 2007.

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

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

RASTALL, R. A. Functional oligosaccharides: application and manufacture. **Annual Review Food Science Technoly**, v.1, p. 305–339, 2010.

RIVAS, B. et al. Bioconversion of posthydrolysis liquors: an alternative for xylitol production from corn cobs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 431-438, 2002.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia Seqüencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.

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, 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1997. v.5.

ROEHR, M. (Ed.). **The biotechnology of ethanol: classical and future applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.

RUEDA, G. S. M. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 130f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, 2010.

RYDHOLM, S. A. **Pulping processes**. Interscience Publishers, John Wiley & Sons, New York, pp. 3–90, 1.269p., 1965.

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

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on resarch and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.

SANCHES, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microbiological Technoly**, v.10, p. 315-318, 1988.

SANCHEZ, O.; CANDONA, C. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SCHLITTLER, L. A. F. S. **Engenharia de um bioprocesso para produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar**. 2006. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

SCHMID, F. et al. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1,3; 1,6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb, **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 163-171, 2001.

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

SCHUERCH, C. The hemicellulose. In: BROWNING, B.L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 1963.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e compósitos. **Química Nova**., v. 32, n. 3, 2009.

SILVERSTEIN, R. A. et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v.98, p.3000-3011, 2007.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical methods in wood chemistry, pulping and permaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

SOUSA, L. C. et al. Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 20, n. 3, p. 339- 347, 2009.

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v.72, n. 3, p. 253-260, 2000.

STAMBUK, B. U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Science of Industrial Research**, v. 67, p. 918- 926, 2008.

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

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

SZENGYEL, Z. **Ethanol form wood cellulose enzyme production**. 2000. Tese de Doutorado- Dept. of Chemical Engineering, Lund University, Sweden, 2000.

TAHERZADEH, J.M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. Journal of Molecular Science**. v.9, p. 161-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J. et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 169–74, 1999a.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fedbatch fermentation. **Bioresources Technology**, v. 69, p. 59–66, 1999b.

TENGBORG, C. et al. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. **Applied of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, n. 15, p. 70–72, 1998.

TRIANA, O. et al. **Atlas: del bagazo de la caña de azucar**. México: GEPLACEA, 1990, 143p.

TSCHIRNER, U.; AL-DAJANI, W. W.; JENSEN, T. Preextraction of hemicelluloses and subsequent pulping of Aspen Chips. In: CARLTON, W. Dence Memorial International Symposium on past Achievements, 1.; Future Challenges in Pulping and Bleaching , Vancouver: ESPRA, 2006.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - UNICA. **Perfil da produção**. Disponível em: <www.portalunica.com.br>. Acesso em: 30 mar. 2010.

WANG,Z. et al. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource Technology**, v. 10. p. 1016, 2010.

WHITNEY, S. E. et al. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls **Plant Physiol**, v.121, n. 2, p. 657- 664, 1999.

WYMAN, C. E. et al. Polysaccharides: strutral diversity and functional versatility. In: SEVERIAN, D. (Ed.). New York: Marcel Dekker, 2005. cap.43.

WYMAN, C. E. Economic fundamentals of ethanol production from lignocellulosic biomass. In: Saddler J, Penner M, editors. ACS Symposium Series, vol. 618. Washington, D.C.: **American Chemical Society**, v. 618, p. 272–90. 1995.

XUT, J. et al. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2113–2119, 2010.

YOON,Y. K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Enzymatic production of pentoses from hemicellulosies fraction of corn residues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 4, p. 388- 392, 2006.

ZHANG, Y. H. P. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. v.97, 214–223, 2007.

ZHAO, Z.; LI, C. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN101289817-A 2009. (CA 149:536105).

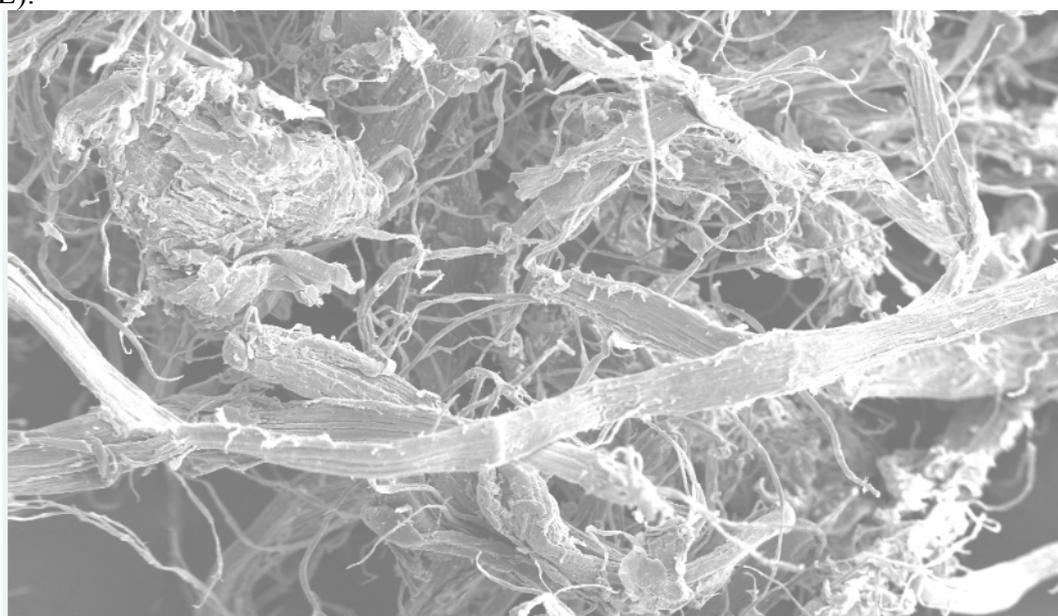
ZHU,Y. et al. Enzymatic production of xylo-oligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.129-132, p.586-598, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Fotomicrografias do bagaço de cana-de-açúcar in natura pré-tratado com NaOH nas condições: 60 min/ 4% NaOH m/v, 90 min/ 7 e 1% NaOH m/v, 30 min/ 7 e 1% NaOH m/v, após cada condição de pré-tratamento.

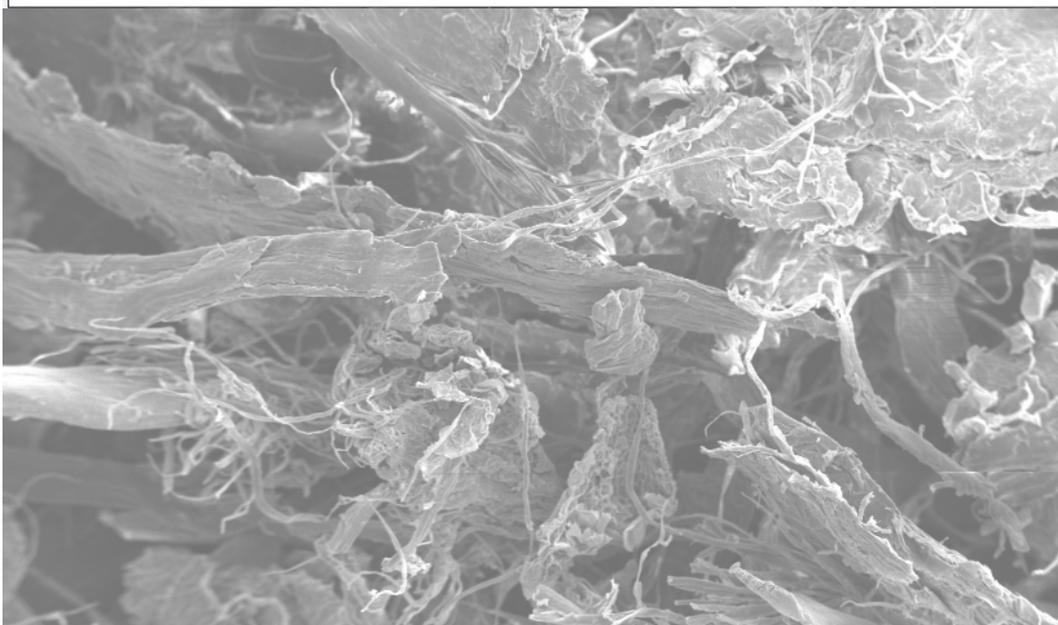
Figura A1. Fotomicrografias do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH a 60 min /4% NaOH m/v (A); pré- tratado a 90 min/ 7% NaOH m/v (B); pré-tratado a 90 min/ 1% NaOH m/v (C); pré-tratado a 30 min/ 7% NaOH m/v (D); pré-tratado a 30 min/ 1% NaOH m/v (E).

A

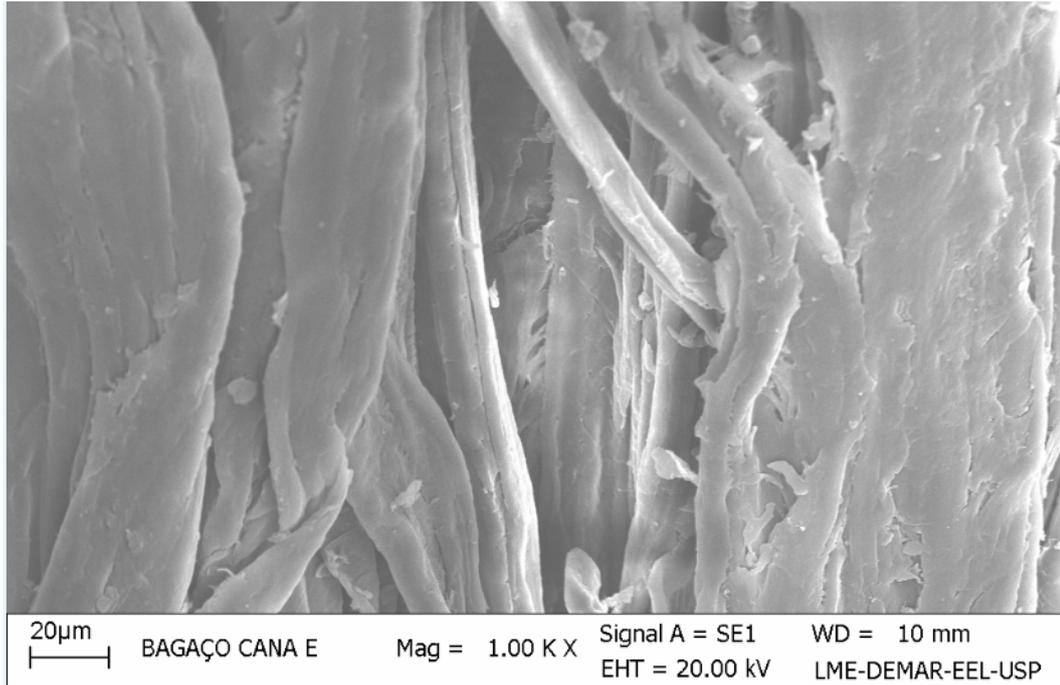
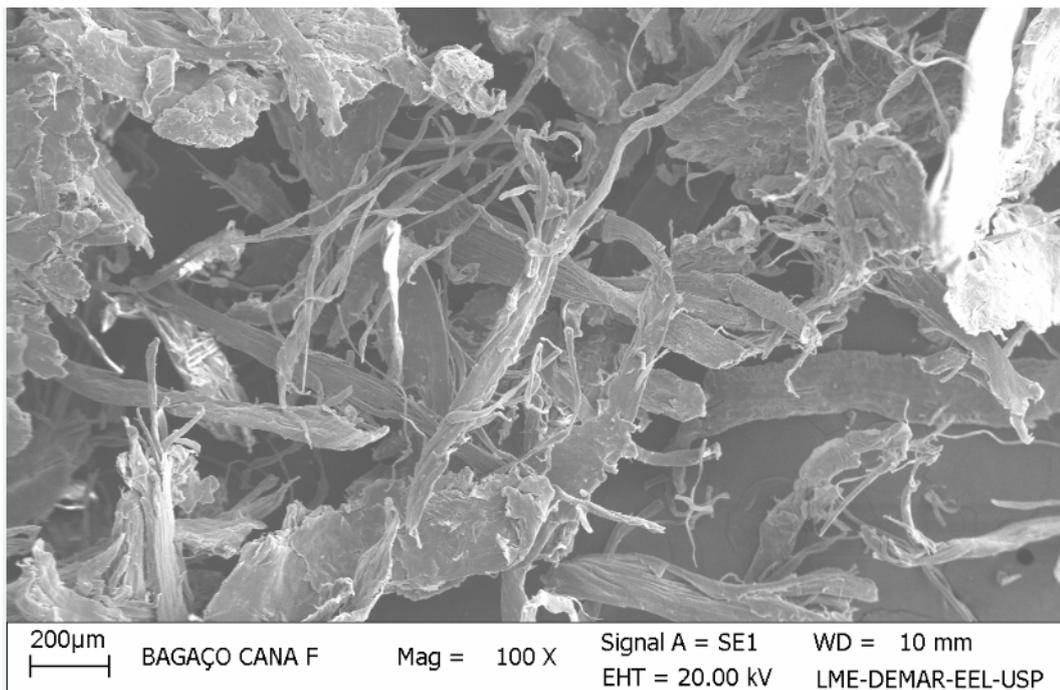


200µm PONTO CENTRAL B Mag = 100 X Signal A = SE1 WD = 10 mm
EHT = 20.00 kV LME-DEMAR-EEL-USP

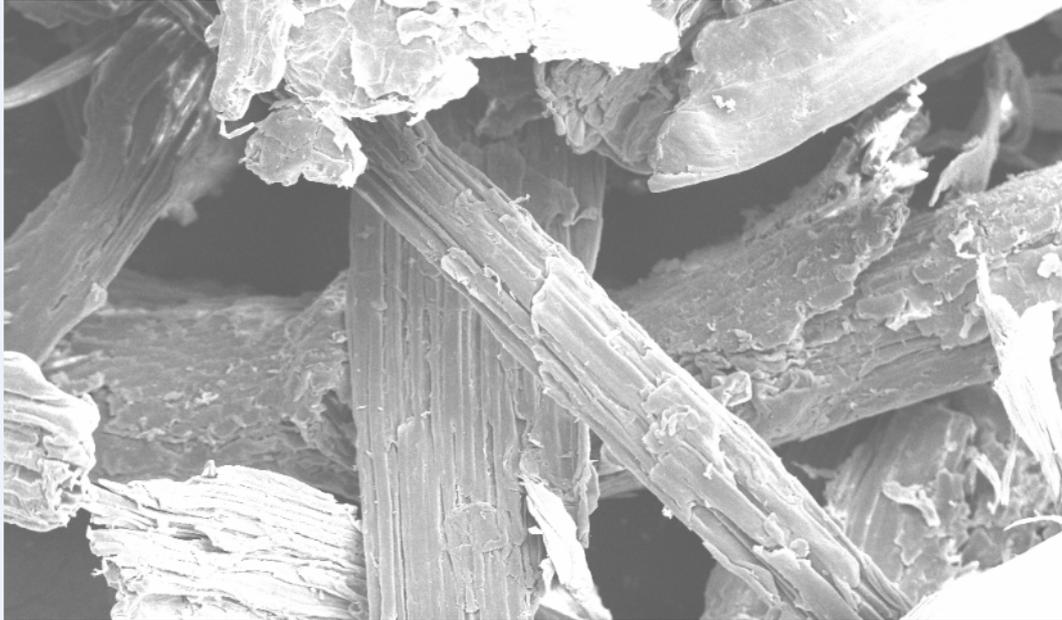
B



200µm BAGAÇO CANA D Mag = 100 X Signal A = SE1 WD = 10 mm
EHT = 20.00 kV LME-DEMAR-EEL-USP

C**D**

E



100µm

BAGAÇO CANA G

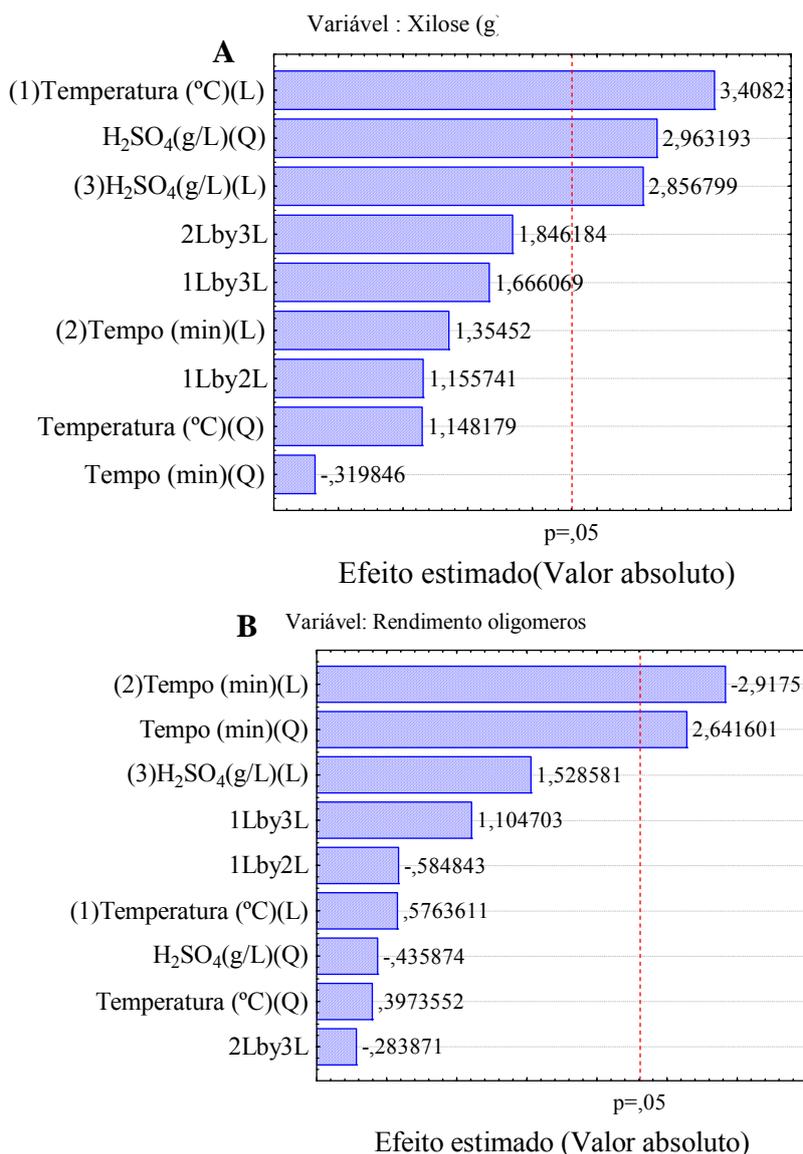
Mag = 200 X

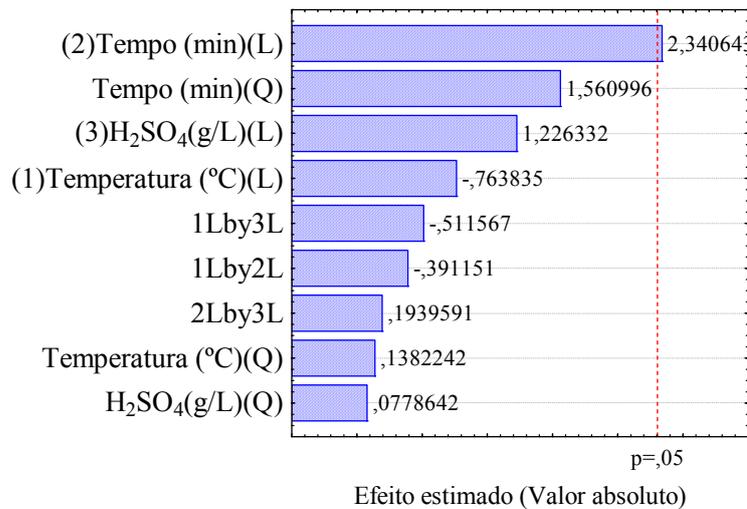
Signal A = SE1
EHT = 20.00 kV

WD = 10 mm
LME-DEMAR-EEL-USP

APÊNDICE B: Diagramas de pareto para as variáveis xilose(g), ácido acético (g/L), Rendimento em oligômeros (%) e furfural (g/L) obtidos após extração da hemicelulose do bagaço de cana *in natura* e explodido sob diversas condições do planejamento experimental.

Figura B1. Diagramas de pareto obtidos após extração de hemicelulose em bagaço de cana *in natura* sob diversas condições do planejamento experimental para as variáveis respostas Xilose (g) (A); Rendimento em Oligômeros (B); Furfural (g/L) (C) e Àcido Acético (g/L) (D).



C Variável: Furfural (g/L)

Variável : Acido acético (g/L)

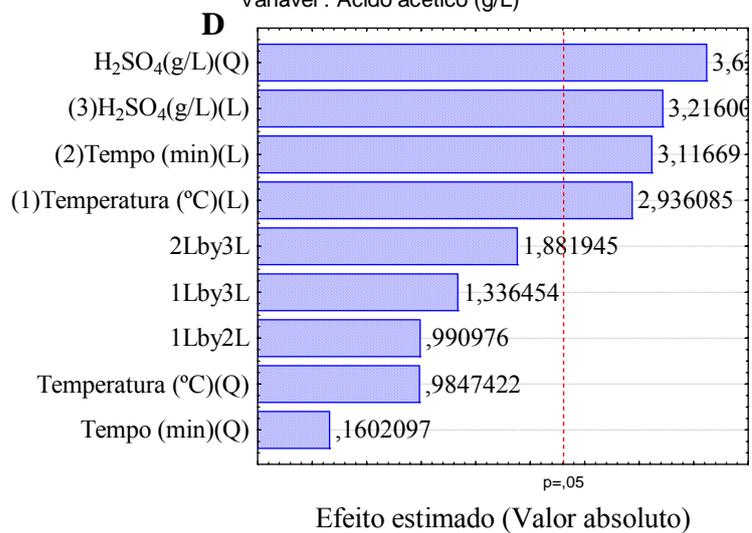
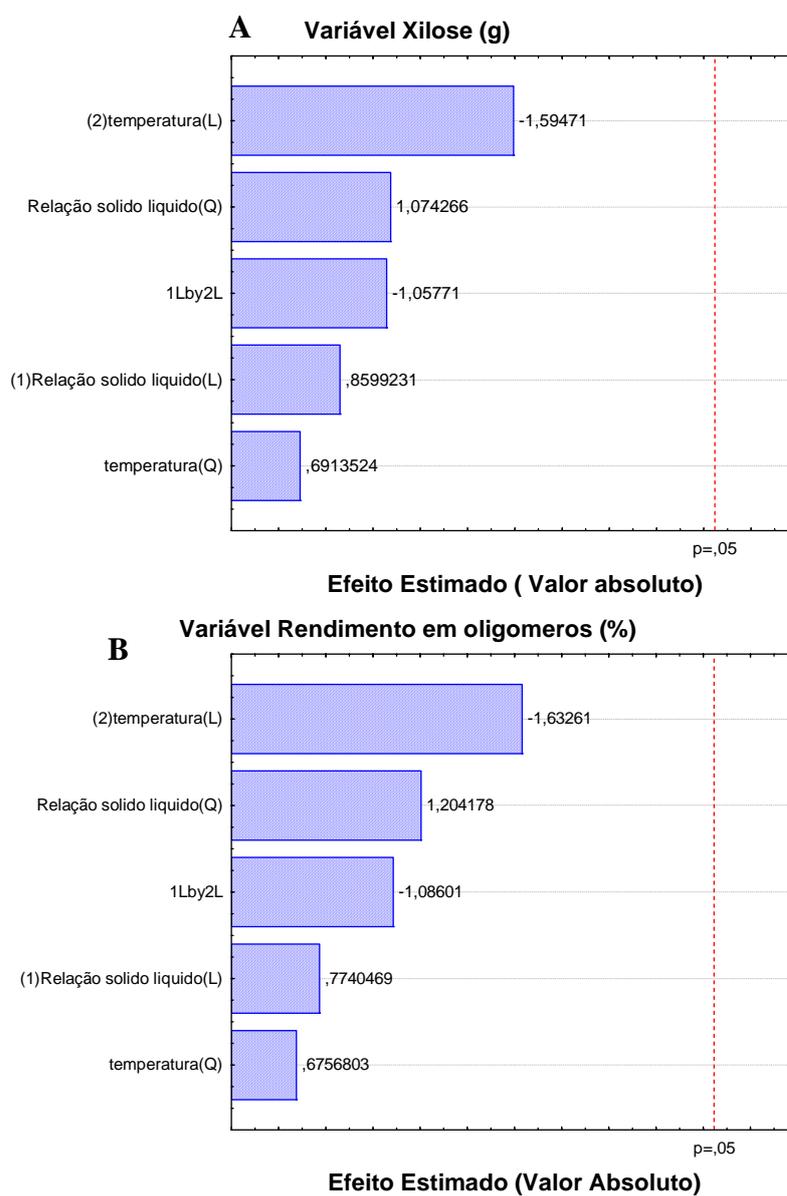
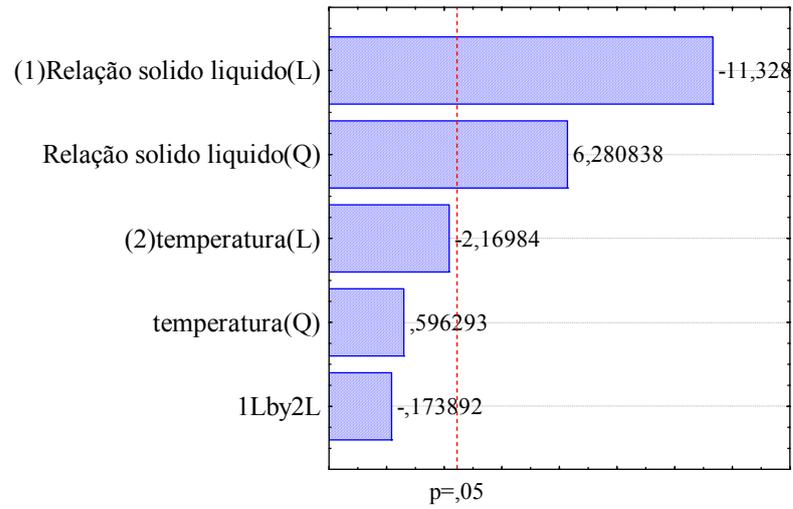
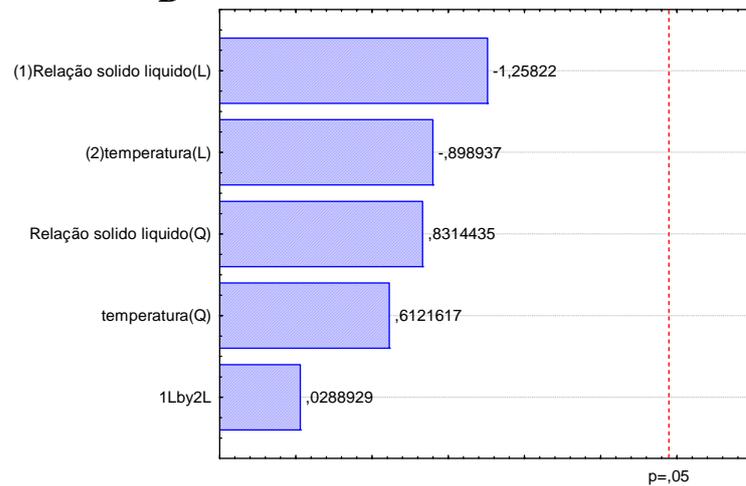


Figura B2. Diagramas de pareto obtidos após extração de hemicelulose em bagaço de cana explodido sob diversas condições do planejamento experimental para as variáveis respostas Xilose (g) (A); Rendimento em Oligômeros (B); Furfural (g/L) (C) e Ácido Acético (g/L) (D).



C Variável: furfural**Efeito Estimado (Valor absoluto)****D Variável ácido acético (g/L)****Efeito Estimado (Valor Absoluto)**