

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO
HIDROTÉRMICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RENATA BERALDO ALENCAR DE SOUZA

SÃO CARLOS – SP
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO
HIDROTÉRMICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

RENATA BERALDO ALENCAR DE SOUZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

SÃO CARLOS – SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)


S729e Souza, Renata Beraldo Alencar de
Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise
enzimática da palha de cana-de-açúcar / Renata
Beraldo Alencar de Souza. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
106 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Palha de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento
hidrotérmico. 3. Hidrólise enzimática. 4. Bioetanol.
I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE RENATA BERALDO ALENCAR DE SOUZA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 08 DE ABRIL DE 2016.


BANCA EXAMINADORA:


Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar


Renata Maria Rosas Garcia Almeida
UFAL


Roberto da Silva
UNESP


Wagner Roberto de Oliveira Pimentel
UFAL


Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA

Dedico com muito amor essa tese:

*A minha pessoa mais importante da
minha vida, minha filha Ana Clara por
ter dado um novo sentido a minha vida e
meus pais por sempre estarem ao meu
lado incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado à vida e por nunca ter me abandonado e nem permitido que desistisse mediante vários obstáculos enfrentados.

Aos meus pais, Tereza e José Luiz, meus irmãos Luciano, Juninho, João e toda minha família que sempre estiveram presentes nos momentos que mais precisei.

Agradeço em especial a minha filha Ana Clara pessoinha mais importante da minha vida e que amo incondicionalmente. Por apesar de tão pequena ser tão grande e sempre me dar todo apoio, compreensão, carinho, incentivo e amor incondicional na realização de tudo isso apesar de muitas vezes sentir minha ausência.

Ao eterno amigo, anjo da guarda e meu irmão de coração Vicente Jessé que de um “lugar especial” sempre está me iluminando e cuidando de mim como sempre fez.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, por compartilhar sua experiência científica, sua amizade e principalmente pela paciência.

A Família Beraldo que mesmo longe alegram meus dias com suas conversas sempre muito intelectuais e sérias pelo WhatsApp. Em especial a Mar pela receita do famoso macarrão doce que também alegra meus dias.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química que de uma forma ou de outra colaboraram com minha formação.

Aos técnicos de laboratório e amigos Alyne, Thais (mana), Amadeus e Thiago por toda a ajuda e amizade.

Aos meus amigos do DEQ – UFSCar, em especial aos amigos da Bioquímica pelo companheirismo, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A todos meus amigos de perto e aos de longe que sempre torceram por mim.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada.

*Não há nada que dominemos inteiramente
a não ser nossos pensamentos”*

René Descartes.

RESUMO

A complexa estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica torna o pré-tratamento uma das etapas operacionais do processo de produção do etanol 2G mais relevantes, devido tanto à dificuldade de se hidrolisar lignocelulose a açúcares fermentescíveis quanto ao custo do processo como um todo. A otimização das condições de pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática é crucial, para atingir altos rendimentos que tornem o processo de produção de etanol 2G viável. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as etapas de pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar. Todas as amostras foram caracterizadas quimicamente antes e após o pré-tratamento. Neste estudo foram avaliadas quatro condições de pré-tratamento: 170°C/5 min., 170°C/15 min., 220°C/5 min, 220°C/15 min e 195°C/10 min. A amostra proveniente do tratamento a 195°C/10 min. foi a que obteve maior remoção de hemicelulose, 85,58%, sendo essa condição de tratamento empregada como referência. Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos de Erlenmeyer a 50°C, 250 rpm e pH 4,8 (volume reacional de 50 mL). Foram avaliados o efeito da carga de sólidos (5, 10, 15 e 20% m/v) mantendo a carga enzimática em 13 FPU/g_{biomassa}. Em 72h de hidrólise as conversões de celulose obtidas foram: 72% (5% de sólidos), 84% (10% de sólidos), 72% (15% de sólidos) e 59% (20% de sólidos). Em seguida foram avaliados o efeito da carga de enzima (3, 7, 10, 13, 16, e 40 FPU/g_{biomassa}) mantendo a carga de sólidos em 15%. Nos experimentos realizados com 15% de sólidos as conversões obtidas foram: 48% (3 FPU/g_{biomassa}), 58% (7 FPU/g_{biomassa}), 66% (10 FPU/g_{biomassa}), 72% (13 FPU/g_{biomassa}), 71% (16 FPU/g_{biomassa}) e 74% (40 FPU/g_{biomassa}). Considerou-se como melhor resultado o ensaio com 15% de sólidos e 13 FPU/g_{celulose}, que resultou em 72,4% de conversão de celulose em glicose. Em seguida foi estudado o efeito de inibição dos produtos durante a hidrólise obtendo-se um maior efeito inibidor para a glicose e celobiose (10 e 30g.L⁻¹). A xilose não apresentou efeito inibidor significativo sobre a β-glicosidase, porém a glicose e a celobiose apresentaram efeitos inibitórios significativos tanto nas endoglucanase e exoglucanase quanto na β-glicosidase. Foram realizados experimentos de hidrólises em reator de bancada (3 L) com 10% de sólidos para comparar o desempenho com as hidrólises realizadas em frascos de Erlenmeyer. Em 72h de hidrólise as conversões de celulose a glicose obtidas foram de 84,8% (em frasco de Erlenmeyer) e de 80,2% (em reator), os perfis de hidrólises obtidos foram similares em ambas às condições avaliadas. Diante do que foi colocado, optou-se pela realização de experimentos em reator (50 mL) nas cargas de sólidos de (15 e 20%) que então apresentaram melhores conversões de celulose a glicose quando comparados com os resultados de experimentos realizados em frascos de Erlenmeyer nas mesmas cargas de sólidos.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar; pré-tratamento hidrotérmico; hidrólise enzimática; bioetanol.

ABSTRACT

The complex cell wall structure of lignocellulosic biomass makes pretreatment one of the most relevant 2G ethanol production process steps due to the difficulty of hydrolyzing lignocellulose to fermentable sugars and the cost of the process as a whole. The optimization of enzymatic hydrolysis conditions is crucial for reaching high yields that make the process feasible. In this way, the aim of this work is to assess the stages of pretreatment and enzymatic hydrolysis of the cellulosic fraction of straw sugarcane. All samples were chemically characterized before and after the pretreatment step. Hydrothermally pretreatment was evaluated in four conditions: 170°C / 5 min, 170°C / 15 min, 220°C / 5 min, 220°C / 5 min, and 195°C / 10 min. Higher hemicellulose removal (85.58%) was found at 195°C / 10 min. This operational condition was set as a reference. Hydrolysis experiments were carried out in Erlenmeyer flasks at 50°C, 250 rpm and pH 4.8, with a reaction volume of 50 mL. Two sets of experiments were performed. In the first, the effect of substrate concentration was evaluated varying solid load (5; 10; 15; 20% $m_{\text{solid}}/V_{\text{solution}}$) with enzyme load constant in 13 FPU/g_{biomass}. At 72h of enzymatic reaction, cellulose conversions were: 72% (5% of solids), 84% (10% of solids), 72% (15% of solids), and 59% (20% solids). In the second set, the enzyme (Cellic[®]CTec2) load effect (3; 7; 10; 13; 16; 40 FPU/g_{biomass}) with solid load settled at 15% ($m_{\text{solid}}/V_{\text{solution}}$), was assessed. For assays with 15% of solid load, cellulose conversions were: 48% (3 FPU/g_{biomass}), 58% (7 FPU/g_{biomass}), 66% (10 FPU/g_{biomass}), 72% (13 FPU/g_{biomass}), 71% (16 FPU/g_{biomass}), and 74% (40 FPU/g_{biomass}). A trade-off between solid load and enzyme dosage was found (15% m/v and 13 FPU/g_{biomass}) which results in 72,4% of cellulose to glucose conversion. After that it was studied the products inhibition effect on hydrolysis was assessed. glucose and cellobiose (10 and 30g.L⁻¹) caused a higher inhibitory effect. Xylose did not show the significant inhibitory effect on β -glucosidase. However, glucose and cellobiose had significant inhibitory effects on endoglucanase and exoglucanase as well as on β -glucosidase. Hydrolysis experiments were conducted in the batch reactor (3 L) with 10% solids to compare the performance with the hydrolysis conducted in Erlenmeyer flasks. At 72h hydrolysis cellulose to glucose, conversion was obtained in 84.8% (Erlenmeyer flask) and 80.2% (in the reactor); hydrolysis profiles obtained were similar in both conditions evaluated. In face of this, it was opted by conduct experiments in bioreactor (50 mL) using solid loads of 15 and 20% showed the best cellulose to glucose conversions when compared to those carried out in shake flasks in the same conditions.

Key-words: Sugarcane straw; hydrothermal pretreatment; enzymatic hydrolysis; bioethanol.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Rotas tecnológicas para a obtenção do bioetanol a partir de diferentes matérias-primas de interesse (adaptado BNDES; CGEE, 2012).	2
Figura 2.1 – Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (Adaptado de US Department of Energy Genome Programs e SANTOS et al. (2012)).	9
Figura 2.2 – Estrutura química da celulose (adaptado de ZHANG; LYND, 2004; WANG et al. 2015).	10
Figura 2.3 – Representação dos vários níveis morfológicos da celulose (adaptado de DAFLORESTAAOPAPEL, 2015).	10
Figura 2.4 – Formula dos principais açúcares componentes da hemicelulose (adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989).	11
Figura 2.5 – Estrutura típica da hemicelulose mostrando as várias ligações e compostos encontrados nas ramificações (adaptado de DODD; CANN, 2009).	12
Figura 2.6 – Estrutura química da lignina (álcool coniferílico, e álcool sinapílico e álcool p-cumarílico em destaque) (LEE et al. 2014).	12
Figura 2.7 – Estrutura típica da biomassa da cana-de-açúcar. (BNDES; CGEE, 2008).	13
Figura 2.8 – Potencial de produção de etanol a partir da palha de cana-de-açúcar (base seca): (A) volume teórico de etanol produzido, adaptado de Santos et al., (2012); (B) volume estimado de etanol produzido com base em rendimentos do processo.	15
Figura 2.9 – Etapas do processo de produção de etanol de segunda geração	16
Figura 2.10 – Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos e possíveis compostos tóxicos formados durante o processo (PHITSUWAN, et al. 2013).	17
Figura 2.11 – Vias de degradação que podem ser apresentadas na etapa de pré-tratamento (adaptado de PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).	18
Figura 2.12 – Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido (adaptado de OGEDA; PETRI, 2010)	22
Figura 2.13 – Ilustração do modo de ação do complexo enzimático (Adaptada de BINOD et al., 2011).	24
Figura 2.14 – Representação das principais vias de inibição da celulase (Adaptada de ANDRIĆ et al., 2010).	27
Figura 2.15 – Comparação das produtividades volumétricas máximas dos processos em SHF (<i>sacarificação e fermentação separadas</i>) e SSF (<i>sacarificação e fermentação simultâneas</i>) (SANTOS et al., 2010).	29
Figura 3.1 – Fluxograma das metodologias experimentais utilizada no trabalho.	31
Figura 3.2 – Fluxograma da metodologia experimental utilizada na caracterização química da biomassa.	32
Figura 3.3 – Fotografia do reator utilizado na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico	38
Figura 3.4 – Fotografia da palha nas das granulometrias avaliadas.	40

- Figura 4.1** – Concentração de glicose liberada por 0,5 mL de enzima diluída em função do log da concentração de enzima..... 52
- Figura 4.2** – Concentração de glicose liberada por 2 mL de enzima diluída em função do logaritmo da concentração de enzima. 53
- Figura 4.3** – Concentração de xilose em função do tempo de reação. 54
- Figura 4.4** – Perfil de concentração de glicose em g.L^{-1} (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (10%, 15% e 20%) de BCA submetido a PTH (195°C-10 min.) utilizando os complexos enzimáticos Accellerase[®]1500 e Cellic[®]Ctec-2. Carga enzimática: 10 $\text{FPU.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 58
- Figura 4.5** – Concentração de glicose (a) e conversão da celulose em glicose (b) em função da carga de sólido (10%, 15% e 20%) após 72 horas de hidrólise do BCA para os complexos enzimáticos Accellerase[®]1500 e Cellic[®]Ctec-2..... 60
- Figura 4.6** – Perfil de concentração de glicose em g.L^{-1} (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para o BCA e a PCA pré-tratados hidrotérmicamente a 195°C-10 min. Carga de sólidos: 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 10 $\text{FPU.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 62
- Figura 4.7**– Perfil da temperatura durante os ensaios de pré-tratamento da biomassa. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante..... 63
- Figura 4.8** – Correlação entre rendimento mássico e fator de severidade ($\log(r_0)$). 65
- Figura 4.9** – Fotografias das amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* (a) e após pré-tratamento hidrotérmico: (b) 170°C/5 min., (c) 170°C/15 min., (d) 195°C/10 min., (e) 220°C/5 min. e (f) 220°C/15 min. 69
- Figura 4.10** – Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 vezes, para palha *in natura* (a), palha pré-tratada hidrotérmicamente nas diferentes condições: 170°C/5 min (b), 170°C/15 min (c), 195°C/10 min (d), 220°C/5 min (e) e 220°C/15 min (f)..... 70
- Figura 4.11** – Concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 $\text{FPU.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 71
- Figura 4.12** – Perfil de concentração de xilose em g.L^{-1} (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 72
- Figura 4.13** – Perfil de concentração de celobiose em g/L em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 73
- Figura 4.14** – Perfil da temperatura durante os ensaios de pré-tratamento da biomassa. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante..... 74
- Figura 4.15** – Perfil de concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH 195°C/10 min, com 5 mesh,

- 3/8 mesh, concentração de substrato: 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 77
- Figura 4.16** – Perfil de concentração de xilose em g.L⁻¹ (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente 195°C/10 min, com 5 mesh, 3/8 mesh, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 78
- Figura 4.17** – Perfil de concentração de celobiose em g.L⁻¹ em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH :195°C/10 min; com 5 mesh, 3/8 mesh, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm. 78
- Figura 4.18** – Perfil de concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 5, 10, 15 e 20% de sólidos e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8. 79
- Figura 4.19** – Concentração de glicose e conversão de celulose em função da carga de sólidos na hidrólise da palha PTH, 50°C, pH 4,8 e 13 FPU/g_{biomassa} 50°C, pH 4,8. 80
- Figura 4.20** – Perfil de concentração de xilose em g.L⁻¹ (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 5, 10, 15 e 20% e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8. 81
- Figura 4.21** – Perfil de concentração de celobiose em g/L em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 10, 15 e 20% de sólidos e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa} 82
- Figura 4.22** – Perfil de concentração de glicose em função do tempo de para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa}, carga de sólidos fixa de 15%, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm. 83
- Figura 4.23** – Perfil de conversão de celulose em glicose de durante as 6 primeiras horas (a) e 72 horas de hidrólise (b) para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa}, carga de sólidos fixa de 15%, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm. 84
- Figura 4.24** – Conversão da celulose em glicose em função da carga de enzima empregada na hidrólise (em 72 h). 84
- Figura 4.25** – Perfil de concentração de xilose em g.L⁻¹ (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa} e carga de sólidos fixa de 15%. 85
- Figura 4.26** – Perfil de concentração de glicose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm. 86
- Figura 4.27** – Perfil de concentração de celobiose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm. 88
- Figura 4.28** – Perfil de concentração de xilose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem

adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g _{biomassa} , 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.	89
Figura 4.29 – Conversão de celulose em função do tempo nos experimentos de hidrólises em Erlenmeyer (HE) e em reator de bancada (HR).	90
Figura 4.30 – Concentração de xilose (a) e celobiose (b) em função do tempo nos experimentos de hidrólises em Erlenmeyer (HE) e em reator de bancada (HR).	91
Figura 4.31 – Perfil de concentração de glicose em g.L ⁻¹ (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (15% e 20%) em Erlenmeyer e reator de 50 mL, carga enzimática: 16 FPU.g _{celulose} ⁻¹ , pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.	92
Figura 4.32 – Perfil de concentração de xilose em g.L ⁻¹ (a) e concentração de celobiose em g.L ⁻¹ (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (15% e 20%) em Erlenmeyer e reator de 50 mL, carga enzimática: 16 FPU.g _{celulose} ⁻¹ , pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Plataformas mais comuns em uma biorrefinaria e suas características principais, adaptado de Carvalheiro <i>et al.</i> (2008).	6
Tabela 2.2 – Composição química (em base seca) de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol.	8
Tabela 2.3 – Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento (Adaptada de NANDA <i>et al.</i> , 2014; SANTOS <i>et al.</i> , 2012 e CANILHA <i>et al.</i> , 2012)	19
Tabela 2.4 – Comparação das diferentes opções para a hidrólise da celulose (adaptado de HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).	23
Tabela 3.1 – Condições experimentais aplicadas nos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico.	39
Tabela 3.2 – Condições experimentais empregadas nos experimentos de hidrólise enzimática.	49
Tabela 4.1 – Valores das diluições das enzimas, suas respectivas concentrações e massa de glicose liberada por 0,5 mL de enzima nas diferentes diluições.....	51
Tabela 4.2 – Caracterização do complexo enzimático Cellic [®] Ctec-2.	55
Tabela 4.3 – Caracterização química do BCA antes e após pré-tratamento e perda/solubilização dos componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.	57
Tabela 4.4 – Caracterização química do BCA e da PCA antes e após pré-tratamento e perda/solubilização dos componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.	61
Tabela 4.5 – Fator de severidade (FS), rendimento mássico (R) e pH da fração líquida, no final do pré-tratamento para cada condição de pré-tratamento estudada.	64
Tabela 4.6 – Concentração de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presente na fração líquida ao final de cada condição de PTH avaliada.	65
Tabela 4.7 – Concentração de açúcares presente na fração líquida ao final do PTH em cada condição avaliada.	66
Tabela 4.8 – Composição química (em porcentagem) da palha <i>in natura</i> e após pré-tratamento hidrotérmico.	67
Tabela 4.9 – Perda/solubilização dos componentes das amostras de palha	68
Tabela 4.10 – Fator de severidade, rendimento mássico e pH da fração líquida, no final do pré-tratamento para cada condição de pré-tratamento estudada.....	75
Tabela 4.11 – Concentração de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presente na fração líquida ao final de cada condição de PTH avaliada.	75
Tabela 4.12 – Concentração de açúcares presente na fração líquida ao final do PTH em cada condição avaliada.	75
Tabela 4.13 – Composição química (em porcentagem) da palha <i>in natura</i> após pré-tratamento hidrotérmico.	76
Tabela 4.14 – Perda/solubilização dos componentes das amostras de palha.	76

NOMENCLATURA

AFEX – expansão da fibra em amônia

ART – açúcar redutor total

BCA – bagaço de cana-de-açúcar

CBU – unidade de celobiose

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

E2G – etanol de segunda geração

FPU – unidade de papel filtro

GEE – gás do efeito estufa

HE – hidrólise em frasco de Erlenmeyer

HMF – hidroximetilfurfural

HR – hidrólise em reator

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

K_{H_2O} – constante de equilíbrio da água

MEV – microscopia eletrônica de varredura

NREL – National Renewable Energy Laboratory

PCA – palha de cana-de-açúcar

PTH – pré-tratamento hidrotérmico

RID – índice de refração

SSF – sacarificação e fermentação simultânea

SHF – sacarificação e fermentação separado

UI – unidade enzimática internacional

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	4
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Biorrefinaria	6
2.2. Biocombustível	7
2.3 Materiais lignocelulósicos.....	8
2.3.1. Celulose	9
2.3.2 Hemicelulose	11
2.3.3 Lignina.....	12
2.3.4 Outros componentes	13
2.4 Cana-de-açúcar.....	13
2.4.1 Palha da cana-de-açúcar	14
2.5 Produção de etanol de segunda geração (E2G).....	16
2.5.1 Pré-tratamento	17
2.5.2 Pré-Tratamento Hidrotérmico	20
2.6 Hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos.....	21
2.6.1 Hidrólise enzimática.....	23
2.6.1.1. Ação das enzimas celulolíticas.....	23
2.6.2 Variáveis que afetam a hidrólise enzimática.....	25
2.6.2.1. Carga de enzimas.....	25
2.6.2.2. Carga de sólidos	26
2.6.2.3. Inibição da atividade da celulase pelo produto	26
2.7 Fermentação	28
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Materiais.....	30
3.1.1 Materiais lignocelulósicos:.....	30
- Bagaço de cana-de-açúcar	30
- Palha de cana-de-açúcar	30
3.1.2 Enzima.....	30
3.2 Procedimentos experimentais.....	31
3.2.1 Caracterização química dos materiais lignocelulósicos	32
3.2.2 Determinação da umidade	33
3.2.3 Cinzas totais	33

3.2.4. Extrativos.....	33
3.2.5 Hidrólise ácida.....	34
3.2.6 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida	35
3.2.7 Determinação da lignina insolúvel.....	37
3.2.8 Determinação da lignina solúvel	37
3.3 Pré-tratamento hidrotérmico	38
3.3.1 Influência da temperatura e tempo de pré-tratamento.....	39
3.3.2 Influência da granulometria no pré-tratamento	39
3.3.3 Determinação do rendimento mássico ou perda ou solubilidade dos componentes macromoleculares no pré-tratamento	40
3.3.4 Determinação da severidade do pré-tratamento hidrotérmico	41
3.3.5 Análise da palha de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	41
3.4 Determinação das atividades enzimáticas.....	42
3.4.1 Determinação da atividade celulase (<i>Filter Paper Activity</i>)	42
3.4.2 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase.....	44
3.4.3 Determinação da atividade enzimática da xilanase.....	46
3.4.4 Determinação de proteínas	47
3.5 Hidrólise enzimática das amostras de palha pré-tratada	47
3.5.1 Hidrólise enzimática em frascos de Erlenmeyers.....	47
3.5.1.1 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes cargas de sólidos: comparação dos complexos enzimáticos Accellerase [®] 1500 e Cellic [®] Ctec-2.	48
3.5.1.2 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.....	48
3.5.1.3 Avaliação do efeito de diferentes cargas de enzima na hidrólise.....	48
3.5.1.4 Avaliação do efeito de diferentes cargas de sólidos.....	48
3.5.1.5 Avaliação do efeito de inibição pelo produto na etapa de hidrólise.....	49
3.6 Hidrólise enzimática em Reator de 50 mL e 3000 mL	49
3.7 Quantificação de açúcares nos experimentos de hidrólise.....	50
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Caracterização do complexo enzimático Cellic [®] Ctec-2	51
4.1.1 Determinação de proteínas	51
4.1.2 Determinação da atividade celulase (<i>Filter Paper Activity</i>).....	51

4.1.3 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase.....	53
4.1.4 Determinação da atividade enzimática da xilanase.....	54
4.2 Estudos preliminares.....	56
4.2.1 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes cargas de sólidos: comparação dos complexos enzimáticos Accellerase [®] 1500 e Cellic [®] Ctec-2 .	56
4.2.2 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.....	60
4.3 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar.....	62
4.3.1 Influência da temperatura e tempo de pré-tratamento.....	63
4.3.2 Hidrólise dos materiais obtidos a partir de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	71
4.3.3 Influência da granulometria no pré-tratamento.....	74
4.3.4 Avaliação da hidrólise dos materiais obtidos a partir de diferentes condições de granulometrias no pré-tratamento hidrotérmico.....	77
4.4 Hidrólise enzimática em frascos de Erlenmeyer.....	79
4.4.1 Avaliação do efeito de diferentes cargas de sólidos na hidrólise.....	79
4.4.2 Avaliação do efeito de diferentes cargas enzimáticas na hidrólise.....	82
4.4.3 Avaliação do efeito de inibição pelo produto na etapa de hidrólise.....	86
4.5. Hidrólise enzimática em reator de 3000 mL.....	89
4.6 Hidrólise enzimática em reator de 50 mL.....	91
5 – CONCLUSÕES.....	94
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1 – INTRODUÇÃO

O aumento das adversidades climáticas, como as mudanças no clima mundial tem sido as principais causas da crescente preocupação com a redução das emissões de CO₂ e consequente diminuição do efeito estufa. Em dezembro de 2015 na Conferência das Nações Unidas sobre mudanças climáticas os 195 países membros da Convenção do Clima da ONU e a União Europeia aprovaram o acordo que tem como objetivo manter o aumento da temperatura média global abaixo de 2°C em relação aos níveis pré-industriais e garantir esforços para limitar o aumento da temperatura a 1,5°C. O aumento da temperatura média global acima de 2°C em razão do acúmulo dos gases do efeito estufa (GEE) na atmosfera acarretará com alto grau de certeza científica, severos prejuízos e danos aos sistemas naturais e socioeconômicos como: elevação das temperaturas e ondas de calor, derretimento das calotas polares, elevação do nível do mar, fortes tempestades entre outros. Os GEE são principalmente derivados da queima de combustíveis fósseis o que tem intensificado o interesse em busca por fontes de energia limpas e renováveis (HEIDARI; PEARCE, 2016). Neste contexto, surge o conceito de biorrefinaria, que são instalações similares a uma refinaria de petróleo, porém que visam a produção biocombustíveis e produtos de valor agregado a partir de um melhor aproveitamento da biomassa e da energia nela contida (RODRIGUES, 2011).

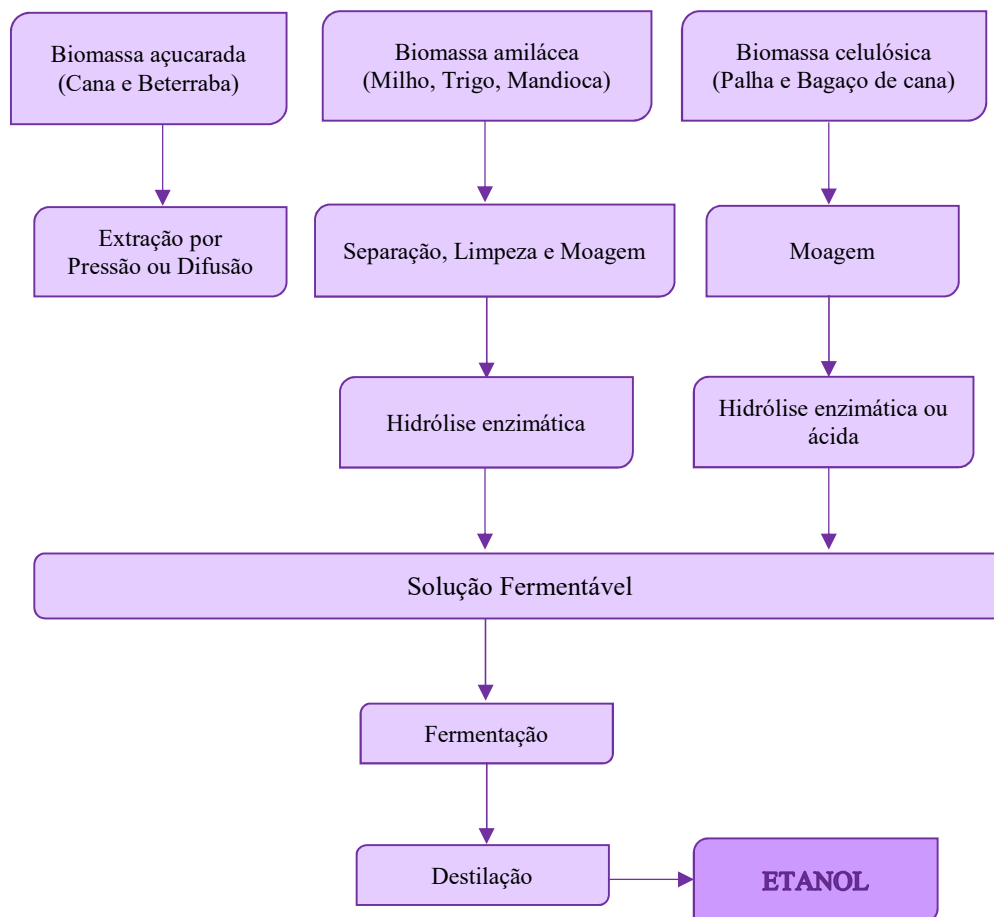
O etanol pode ser produzido a partir de qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido (como trigo, milho e outros grãos), açúcares (como cana-de-açúcar e beterraba), celulose e/ou hemicelulose (resíduos agroindustriais, palha e bagaço de cana, palha de milho, por exemplo). A Figura 1.1 apresenta as rotas tecnológicas para a obtenção do bioetanol a partir de diferentes matérias-primas de interesse (BNDES; CGEE, 2012).

Os materiais lignocelulósicos são a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. Desta forma, a bioconversão desses materiais em combustíveis apresenta-se como uma alternativa atraente e promissora, uma vez que além de reduzir as emissões de gases de efeito estufa e reduzir a dependência de combustíveis fósseis não competem com a produção de alimentos e não levam a um aumento na área cultivada (POPP et al, 2014; VIIKARI et al, 2012).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com produção estimada para 2015/16 colheita de 655,16 milhões de toneladas cultivadas em 8,95 milhões de hectares de terra, com uma produtividade média de 73,16 toneladas/ha (CONAB, 2015). O processamento da cana para produção de etanol gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, como a palha e o bagaço. Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 280 kg de

resíduos, divididos em, aproximadamente, 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (em base seca) (SANTOS et al., 2012). A partir do Decreto Federal nº 2.661/98, que estabeleceu a redução gradual da queima dos canaviais, a quantidade de palha disposta no campo vem aumentando. Quando transportada à usina seu destino é a mistura com o bagaço para queima nas caldeiras, contudo, os excedentes desses resíduos poderiam estar sendo utilizados para aumentar a produção de etanol.

Figura 1.1 – Rotas tecnológicas para a obtenção do bioetanol a partir de diferentes matérias-primas de interesse (adaptado BNDES; CGEE, 2012).



A palha de cana, bem como outros materiais lignocelulósicos, apresenta uma estrutura heterogênea constituída por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. A complexidade de sua estrutura torna difícil a conversão de seus polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol, apesar de ser

considerada uma alternativa promissora e de já existirem tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, ainda esbarra em dificuldades técnicas e econômicas. Em geral, a rota bioquímica para a produção de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica, envolve, principalmente, seis operações principais: pré-condicionamento da biomassa, pré-tratamento (diminuição da cristalinidade e separação das três frações), hidrólise (obtenção de açúcares fermentescíveis), fermentação (conversão do açúcar em etanol), destilação (concentração do etanol) e, finalmente, tratamento dos resíduos (CANILHA et al., 2012; SANTOS et al., 2013; RAMOS et al., 2015).

Dentre essas etapas, o pré-tratamento destaca-se como uma etapa importante na conversão da biomassa em bioetanol, uma vez que essa etapa é responsável por aproximadamente um terço dos custos do processo, além de apresentar grande influência nos custos e eficiências das etapas anteriores e posteriores do processo (hidrólise e fermentação) (CRUZ et al., 2012; PIETROBON, 2008). As principais finalidades do pré-tratamento do material lignocelulósico é a remoção total ou parcial da lignina e hemicelulose, diminuição da cristalinidade da celulose, aumento da porosidade e das áreas superficiais do material para que o coquetel enzimático empregado possa acessar e hidrolisar a celulose aumentando assim o rendimento da conversão em glicose. Nesta etapa, contudo, deseja-se obter a mínima quantidade de compostos tóxicos para a etapa de fermentação e menor consumo de energia e custo (RUIZ et al., 2011; PHITSUWAN et al., 2013).

Outro passo crucial para a obtenção de uma conversão eficiente da biomassa em etanol é a etapa de hidrólise. A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis pode ser feita tanto por via ácida como por via enzimática. Na hidrólise enzimática, o processo é catalisado por enzimas chamadas genericamente de celulases; trata-se de um complexo enzimático que trabalha em sinergia para atacar partes características da fibra de celulose (HAMELINCK et al., 2005). O uso de enzimas apresenta várias vantagens quando comparado à rota química. Citam-se menores custos de equipamento (pelo fato da reação ser realizada em condições mais amenas) e menor formação de subprodutos os quais podem trazer prejuízos na etapa de fermentação (CARA et al., 2007). No entanto, muitos fatores têm contribuído para o elevado custo da hidrólise enzimática, como os efeitos de inibição da enzima, a acessibilidade da enzima ao substrato e ligações não produtivas, exigindo o uso de altas concentrações de enzima e consequentemente tornando a carga de enzima uma importante variável do processo.

Outra variável importante na hidrólise enzimática é a carga de sólidos. A manutenção de uma elevada carga de sólidos durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise é desejável tanto do ponto de vista ambiental como econômico (BINOD et al., 2011). Economias

significativas no processo são obtidas com a minimização do gasto de energia, água e suprimentos de enzimas (IOELOVICH; MORAG, 2012; RAMOS et al., 2015). Por outro lado, a utilização de concentrações elevadas de substrato pode diminuir o rendimento devido a efeitos de resistência à transferência de massa. Além disso, uma alta carga de sólidos tem um grande impacto sobre os custos de operação do processo (CORRÊA et al., 2016). A eficiência da hidrólise enzimática está relacionada com a taxa de formação do produto, que é regulada por três eventos: 1) a taxa de transferência de massa externa da enzima à superfície do substrato; 2) a taxa de adsorção da enzima à superfície do substrato; 3) da taxa de catálise celulase (GAN et al., 2003).

Uma das formas de melhorar o processo de sacarificação enzimática é minimizar os efeitos de resistência à transferência de massa externa, garantindo que o processo não seja limitado por este efeito. O aumento da concentração de substrato, a redução do tempo de residência e da carga de enzima, além da melhoria na atividade do complexo enzimático são fatores que contribuem para a viabilidade da via enzimática (OUYANG et al., 2013). A otimização das condições de hidrólise é necessária para que o processo seja realizado com elevada eficiência.

O aumento da carga de substrato é importante para que se possa obter concentrações mais elevadas de açúcar no hidrolisado (WANG et al., 2012; PURI et al., 2013) o que permite obter na etapa de fermentação vinhos com maior teor de etanol, o que reduz o consumo de energia na etapa de destilação (MODENBACH; NOKES, 2013).

1.1 Objetivos

Diante do que foi apresentado e considerando-se a importância da utilização de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, essa tese propõe-se a estudar as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar.

Para alcançar esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Caracterização química e estrutural (por microscopia de varredura — MEV) da biomassa avaliada antes e após a etapa de pré-tratamento;
- ✓ Submissão das amostras a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas, tempo de reação e granulometrias, com o objetivo de selecionar condições operacionais que resultem em boa remoção da hemicelulose com pequena perda de celulose;

- ✓ Experimentos de hidrólise das biomassas pré-tratadas empregando diferentes cargas de sólidos e de enzima;
- ✓ Realização de experimentos em frascos agitados e em biorreator para avaliar o escalonamento do processo.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorrefinaria

O termo biorrefinaria refere-se ao um processo contínuo e diversificado, em que a biomassa lignocelulósica é convertida em uma gama de produtos rentáveis como combustíveis, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse (de forma semelhante às atuais refinarias de petroquímicas, que produzem uma variedade de combustíveis e produtos químicos a partir do petróleo), através de uma combinação de tecnologias (PEREIRA Jr. et al., 2008; FITZPATRICK et al., 2010; ELMEKAWY et al., 2013).

Dependendo da matéria-prima, processos utilizados e produtos obtidos, a biorrefinaria é classificada em plataformas, denominadas: bioquímica (baseadas em açúcar), plataforma termoquímica (também conhecida como plataforma de gás de síntese, *syngas*), biogás e em cadeias ricas em carbono (óleos e gorduras), das quais as plataformas mais promissoras são as plataformas bioquímica e termoquímica (WRIGHT et al., 2007; CARVALHEIRO et al., 2008). Na Tabela 2.1 são apresentadas as plataformas mais comuns em uma biorrefinaria e suas características principais.

Tabela 2.1 – Plataformas mais comuns em uma biorrefinaria e suas características principais, adaptado de Carvalho *et al.* (2008).

Plataforma	Matéria-prima	Processos principais	Produtos
Bioquímica (açúcar)	Biomassa amilácea e lignocelulósica	- Hidrólise química e enzimática, - Fermentação, - Biotransformação, - Processos químicos e catalíticos.	- Produtos químicos de valor agregado, - Calor e eletricidade (a partir da lignina)
Termoquímica (<i>Syngas</i>)	Biomassa lignocelulósica, plásticos, borracha, etc.	Processos termoquímicos: - Gaseificação, - Pirólise.	- Gás de síntese (<i>syngas</i>), - Bio-óleo (pirólise da biomassa), - Produtos químicos de valor agregado, - Combustíveis líquidos ou gasosos.
Biogás	Efluentes líquidos e dejetos	- Digestão anaeróbia	- Metano e dióxido de carbono (biogás), - Químicos de valor agregado.
Cadeias ricas em carbono (óleos)	Óleos vegetais e gordura animal.	- Transesterificação	- Éster metílico e ácidos graxos (biodiesel), - Glicerina e ácidos graxos.

2.2. Biocombustível

A produção total de petróleo do Brasil em 2014 cresceu 11% em relação ao ano anterior, atingindo a média de 2,25 milhões de barris diários. A produção de derivados de petróleo nas refinarias nacionais apresentou um aumento de 2,4% em 2014 em relação a 2013, atingindo o valor de 110,4 milhões de tep (toneladas equivalentes de petróleo) com destaque para o óleo diesel e a gasolina. Foi registrado um crescimento no consumo de 3,5% de óleo diesel e de 5,3% de gasolina automotiva (BRASIL, 2015).

Se, por um lado, o uso do petróleo contribui para o desenvolvimento como um todo da sociedade, por outro, apresenta limites (limites de suas reservas mundiais), questionamentos e desafio na medida em que gera impactos sobre o meio ambiente, em função das emissões de CO₂, como uma das causas apontadas para o aquecimento global; e os desastres ecológicos a partir da perfuração de poços de petróleo (SCHUTZ; MASSUQUETTI; ALVEZ, 2013). Nesse contexto, a busca por energias renováveis como os biocombustíveis ocupam o centro das atenções nacionais e internacionais.

O etanol tem se destacado pela possibilidade de ser misturado com a gasolina ou usado puro, como combustível automotivo, apresentando vantagens como elevados índices de octanagem e maior calor de vaporização. O bioetanol também se caracteriza por melhorar a combustão de combustíveis em motores, reduzindo as emissões de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e outros gases cancerígenos (SUBHEDAR; GOGATE, 2013). Dependendo da matéria-prima utilizada para a produção do bioetanol este pode reduzir a emissão de gases do efeito estufa em cerca de 30 a 85% em relação a gasolina (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). Santos e Peixoto (2008), mostra que a mistura de etanol 10% em volume (2 % de oxigênio em peso) na gasolina reduz as emissões de CO em 13% e benzeno em 11%.

O Brasil é referência mundial em produção sustentável e eficiente de etanol. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (ÚNICA, 2015) o Brasil é o segundo maior produtor de etanol com uma produção de aproximadamente 28,4 bilhões de litros de etanol na safra de 2014/2015, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. E o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo produzindo mais de 632 milhões de toneladas (safra de 2014/2015) (ÚNICA, 2015). A indústria da cana-de-açúcar gera dois resíduos principais o bagaço (fração fibrosa resultante da extração do suco) e a palha (resíduo da colheita, folhas e partes superiores deixadas no campo). Cerca de 280 milhões de toneladas desses resíduos são produzidos por ano, segundo Del Rio et al., (2015).

Diante do que foi apresentado, a biomassa residual surge como uma alternativa ideal e promissora para a produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de se obter uma maior viabilidade técnico-econômica da produção de etanol a partir de biomassas residual.

2.3 Materiais lignocelulósicos

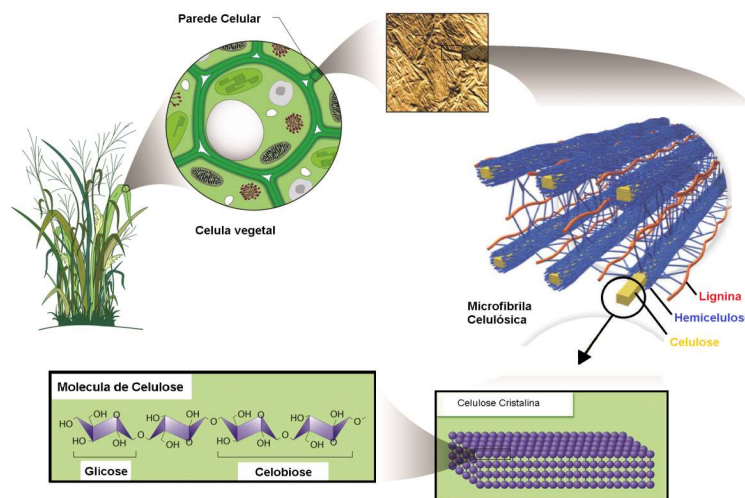
Materiais lignocelulósicos são biomassas vegetais (termo utilizado para designar matéria orgânica produzida, tanto pelas espécies vegetais, como por seus resíduos), constituídas basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, tais como resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e resíduos de milho), resíduos florestais (pó e resto de madeira) e resíduos industriais (indústria de papel) (RUIZ et al, 2011). A composição química da biomassa lignocelulósica em geral é constituída basicamente de 35-50% de celulose, 23-35% de hemicelulose e 14-20% de lignina. Essas composições variam substancialmente em função da variedade da biomassa, condições de crescimento, idade de colheita e parte da planta escolhida (GAN et al., 2003; OGEDA; PETRI, 2010; PARAJULI et al., 2015). Na Tabela 2.2 são apresentadas as composições químicas de algumas biomassas com potencial para produção de bioetanol reportados na literatura.

Tabela 2.2 – Composição química (em base seca) de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol.

Material Lignocelulósico	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	40,0	30,0	25,0	Cruz et al. (2012)
Palha de cana-de-açúcar	33,5	27,1	25,8	Costa et al. (2013)
Palha de milho	37,0	31,3	17,8	Saha et al. (2013)
Palha de trigo	35,2	22,2	22,1	Toquero; Bolado (2014)
Bagaço de sorgo doce	49,8	27,7	10,8	Cao et al. (2012)
Palha de colza	36,6	24,1	17,13	Diaz et al.(2010)
Talo de algodão	36,6	18,1	26,4	Haykir; Bakir (2013)
Bambo	43,4	29,6	27,5	Li et al. (2014)
Resíduos de algodão	57,4	7,9	17,0	Fockink et al. (2015)
Resíduo de papel de jornal	49,3	12,2	19,18	Guerfali et al. (2015)

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma complexa estrutura morfológica. A Figura 2.1 apresenta uma ilustração da estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (SANTOS, 2012).

Figura 2.1 – Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica (Adaptado de US Department of Energy Genome Programs e SANTOS et al. (2012)).

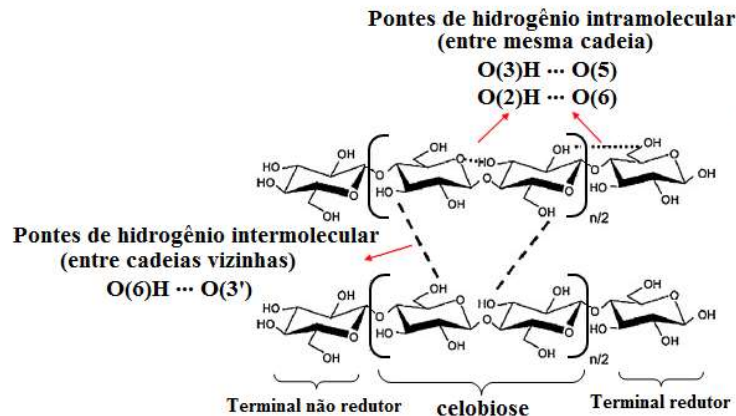


Essas estruturas são responsáveis por criar uma barreira natural contra a ação de microrganismos. Suas características químicas e morfológicas são uma das dificuldades de se converter matérias lignocelulósicas em biocombustíveis ou outros produtos de interesse. Os materiais lignocelulósicos são recalcitrantes a hidrólise enzimática por conta de vários fatores, dentre eles, a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização, o teor de umidade, a área de superfície disponível e o teor de lignina (WU et al., 2016).

2.3.1. Celulose

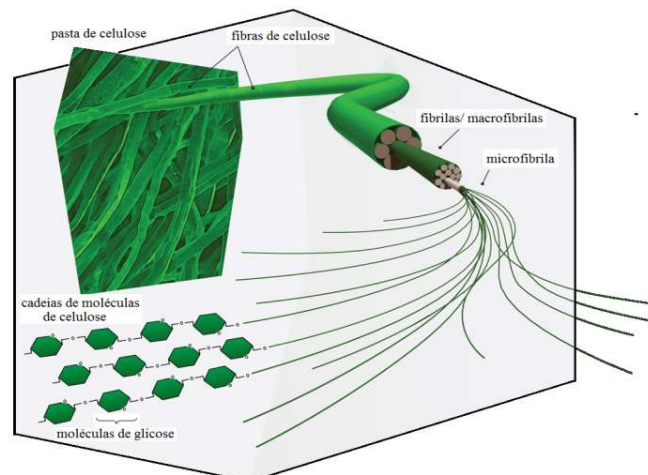
A celulose é o componente principal da biomassa vegetal. Pode ser caracterizada sucintamente como um polímero linear de elevado peso molecular, constituído exclusivamente por unidades β -D-glicose unidas entre si por ligações covalentes β -D (1-4) glicosídicas, através da eliminação de uma molécula de água (FENGEL; WEGENER, 1989). Celobiose é nome da unidade conformacional repetitiva onde cada ligação glicosídica forma um dímero de glicose. Nas extremidades de cada cadeia de celulose são encontrados dois grupos terminais um redutor e um não redutor. A Figura 2.2 mostra a representação esquemática da estrutura da celulose. O tamanho da molécula de celulose é normalmente feito em termos do seu grau de polimerização (DP) e seu grau de polimerização varia dependendo do tipo de matéria-prima em uma gama de 100-20.000 (RAMOS, 2003; MÄKI-ARVELA, 2011).

Figura 2.2 – Estrutura química da celulose (adaptado de ZHANG; LYND, 2004; WANG et al. 2015).



Cadeias de celulose se associam na forma de microfibrilas na qual regiões cristalinas (altamente ordenada, rígida e inflexível) se alternam com regiões amorfas (menos organizadas), cada microfibrila de celulose tem cerca de 36 cadeias de glicose (FESTUCCI-BUSELLI; OTONI; JOSHI, 2007). As microfibrilas por sua vez se agregam formando as fibras celulósicas. A alta resistência à tração e a insolubilidade da celulose na maioria dos solventes é consequência dessa estrutura fibrosa (KLOCK et al., 2005). Quanto maior o grau de polimerização da molécula de celulose menor é a sua solubilidade devido as ligações de hidrogênio intermoleculares (ZHANG; LYND, 2004). A Figura 2.3 mostra a representação dos níveis morfológicos da celulose.

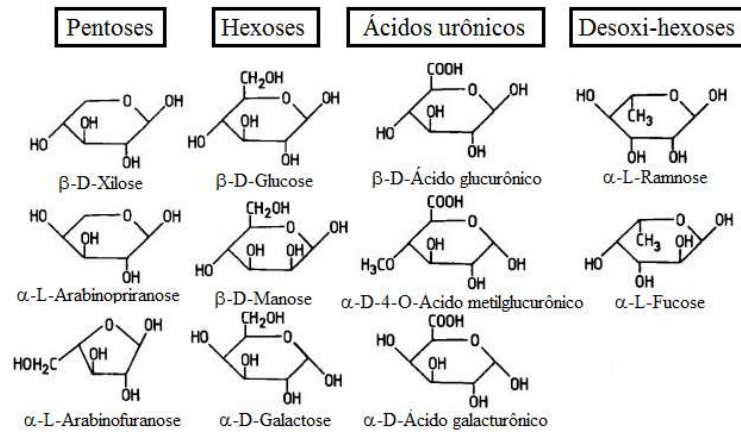
Figura 2.3 – Representação dos vários níveis morfológicos da celulose (adaptado de DAFLORESTAAOPAPEL, 2015).



2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos composto por pentoses, hexoses, ácidos urônicos e desoxihexoses. As fórmulas dos principais açúcares presentes na hemicelulose são apresentadas na Figura 2.4.

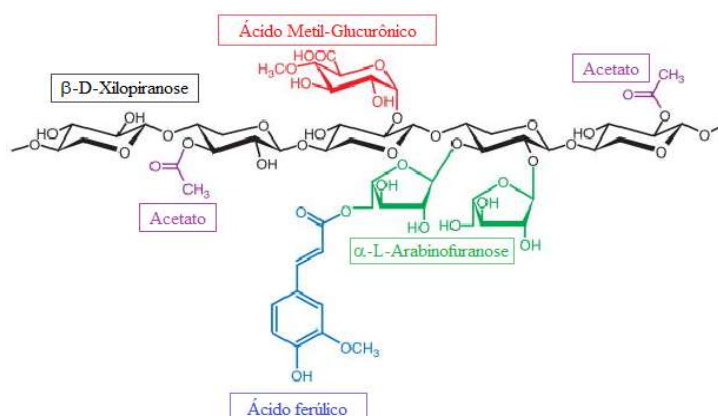
Figura 2.4 – Fórmula dos principais açúcares componentes da hemicelulose (adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989).



Estruturalmente as hemiceluloses são mais semelhantes a celulose do que a lignina. Porém suas cadeias moleculares são mais curtas e apresentam peso molecular mais baixo que a celulose. Sua estrutura apresenta grupos laterais e ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. As hemiceluloses apresentam uma maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores (FENGEL; WEGENER, 1989; SANTOS et al., 2012).

Todas as xilanas de plantas superiores são constituídas de uma cadeia principal de unidades de β-D-xilopirranose unidas por ligações β(1-4) com ramificações de ácido 4-O-metilglucurônico, acetato, ácido ferulínico e α-L-arabinofuranose (Figura 2.5) (SAHA, 2003; DODD; CANN, 2009). A hemicelulose atua como agente ligante entre a lignina e a celulose formando rede celulose-hemicelulose-lignina responsável pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica. A composição da hemicelulose determina sua estabilidade térmica. A solubilização da hemicelulose começa entre 150-180°C em água e geralmente são formados compostos fenólicos em sua decomposição (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 1999; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Figura 2.5 – Estrutura típica da hemicelulose mostrando as várias ligações e compostos encontrados nas ramificações (adaptado de DODD; CANN, 2009).

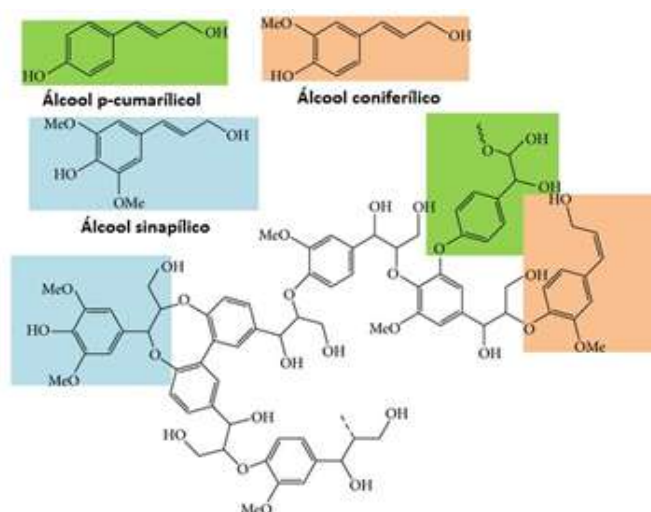


2.3.3 Lignina

A lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza. Está presente na parede celular da biomassa lignocelulósica. A Figura 2.6 apresenta a estrutura química da lignina e seus precursores

As moléculas de lignina têm uma composição bastante diferente dos polissacarídeos, sendo formado pela polimerização de três unidades de fenilpropano: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico (FENGEL; WEGENER, 1989). A composição e organização destes constituintes variam de uma espécie para outra. A lignina tem como sua propriedade mais importante sua rigidez, o que não só dá força para o tecido da planta, como também impede o colapso dos elementos de água-condutores (RAMOS, 2003).

Figura 2.6 – Estrutura química da lignina (álcool coniferílico, e álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico em destaque) (LEE et al. 2014).



A lignina proveniente das biorrefinarias tem sido utilizada para produção de energia pelo processo de combustão ou para conversão em outros bioprodutos de interesse comercial, uma vez devido a sua natureza fenólica essa fração não pode ser diretamente convertida em etanol (FARINAS, 2011).

2.3.4 Outros componentes

Além dos principais componentes da parede celular existem outros numerosos compostos que são chamados de acessórios ou materiais extraíveis. Embora esses compostos integram apenas uma pequena percentagem da massa total da parede vegetal, eles podem ter grande influência sobre as propriedades e qualidades do processamento da biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989).

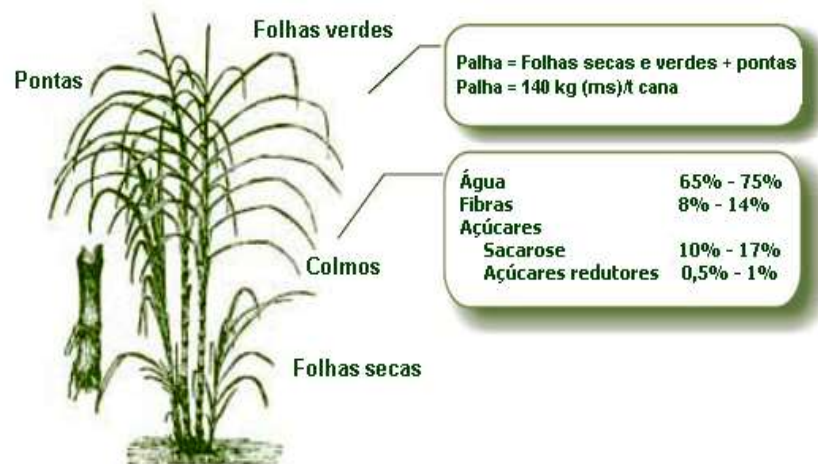
Materiais extraíveis podem ser extraídos a partir da biomassa lignocelulósica com vários solventes. Os principais são os componentes lipofílicos dos extrativos que são solúveis em líquidos de baixa polaridade: gorduras e ácidos graxos, ésteres e esteroides terpenos e compostos fenólicos (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

2.4 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar foi introduzida no período colonial e se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil além de ser o maior produtor de cana do mundo é o primeiro na produção de açúcar e etanol, e cada vez mais conquista o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (AGRICULTURA, 2012).

A cana-de-açúcar é composta essencialmente pelos colmos (nos quais se concentra a sacarose), pelas folhas, pontas e pelas raízes, no subsolo. A Figura 2.7 apresenta uma ilustração das partes da cana-de-açúcar (BNDES; CGEE, 2008).

Figura 2.7 – Estrutura típica da biomassa da cana-de-açúcar. (BNDES; CGEE, 2008).



No Brasil a cana-de-açúcar é a principal fonte de energia renovável respondendo em 2013 por 15,7% da oferta total de energia renovável. O etanol de cana substituiu quase 40% das necessidades de gasolina do país, tornando este um combustível alternativo no Brasil e 3% da gasolina no mundo (SUGARCANE, 2015; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol gera uma grande quantidade de resíduos agrícolas. Em 2014/2015 a safra da cana-de-açúcar na região centro-sul foi estimada em 567 milhões de toneladas (ÚNICA, 2015). A partir dessa informação, estima-se que 136 milhões de toneladas de bagaço foram geradas (50% de umidade). Aproximadamente a metade desse subproduto deve ter sido utilizado na queima direta para geração de calor e energia para suprir a demanda energética do processo. O restante poderia, em tese, ser utilizado para incrementar a produção de etanol, aumentando o volume produzido por tonelada de cana colhida (BISWAS *et al.*, 2014). Outro subproduto do processamento da cana-de-açúcar que vem gerando grande interesse no setor sucroalcooleiro é a palha. Para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço (em base seca), o que corresponde a 5.200 MJ de energia, equivalente a 0,69 barris de petróleo (LABAT; GONÇALVES, 2008; MACEDO, 2004; SANTOS et al., 2012).

2.4.1 Palha da cana-de-açúcar

Muitos autores ainda divergem em relação às definições de palha, palhiço e palhada da cana de acordo com Alves (2011) as definições mais utilizadas no setor agrônomo consideram a palha como sendo a folha seca da cana, palhada como sendo as folhas e ponteiros com baixo teor de umidade, recolhida após a colheita da cana e o palhiço é considerado como sendo a palhada adicionado de frações de colmos deixados na colheita, plantas daninhas e partículas de terra agregadas a esses.

Neste trabalho considera-se a palha como sendo a fração constituída de folhas verdes e folhas secas da cana-de-açúcar que é a denominação mais utilizada no setor industrial sucroalcooleiro.

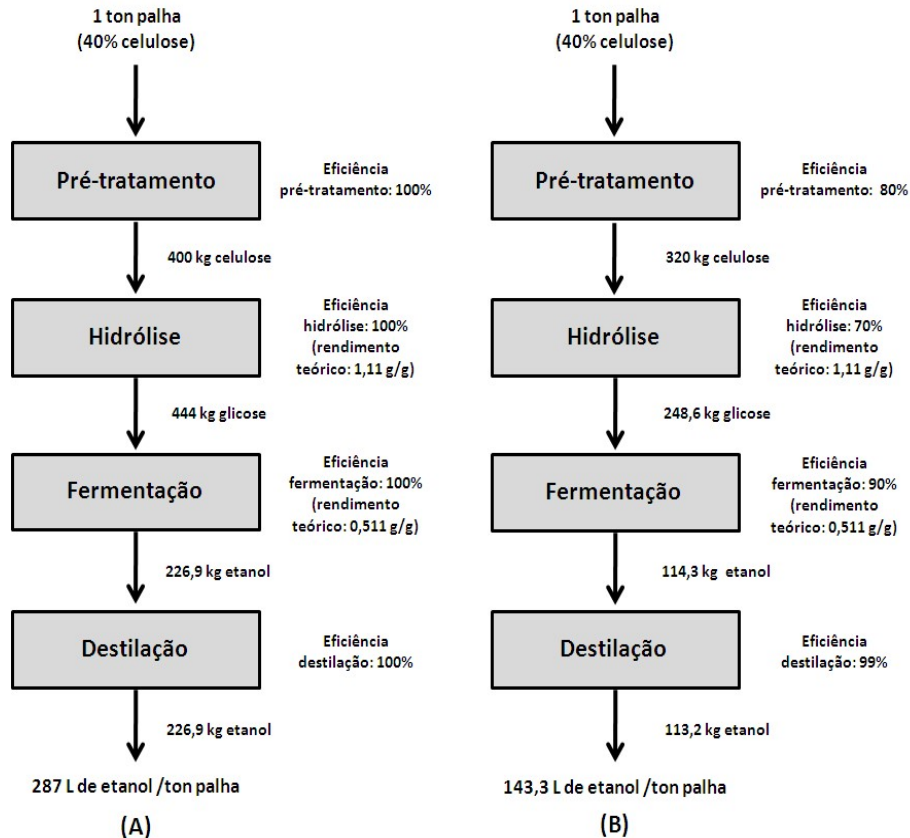
A palha se destaca como fonte energética por apresentar um grande potencial tanto para geração de calor e eletricidade quanto para a produção de etanol (SANTOS et al., 2012). Segundo Ripoli et al. (2000) cada tonelada de palha não queimada equivale a cerca de 1,28 beps (barris equivalentes de petróleo) e ao recolhermos 50% do palhiço de toda a área de cana da região centro-sul do país não considerando a energia do bagaço, pode-se produzir energia para consumo de cerca de nove milhões de pessoas de baixa renda. Com a produção atual de

cana-de-açúcar e o aproveitamento integral da palha seria possível substituir o equivalente a 186 milhões de barris de petróleo (MOUTTA, 2009).

Além da importância do seu uso para fins energéticos a palha deixada no campo pode acarretar em alguns fatores negativos como aumento da incidência de pragas e a ocorrência de incêndios. Contudo é recomendado que uma porcentagem desta palha permaneça no solo para proteção do solo contra erosão, inibição do crescimento de ervas daninhas, reciclagem de nutrientes e redução da perda de água no solo (SORDI, MANECHINI, 2013; LEAL et al., 2013). Seu potencial energético e o fato de existirem leis estaduais que obrigam a suspensão gradual das queimadas da cana, como no Estado de São Paulo, são os principais argumentos para a busca de opções de utilização da palha (SAMANIEGO, 2007).

A Figura 2.8 apresenta estimativas do potencial de incremento na produção de etanol com base nos rendimentos teóricos (Figura 2.8 A) e considerando os rendimentos das várias etapas que compõe o processo (Figura 2.8 B).

Figura 2.8 – Potencial de produção de etanol a partir da palha de cana-de-açúcar (base seca): (A) volume teórico de etanol produzido, adaptado de Santos et al., (2012); (B) volume estimado de etanol produzido com base em rendimentos do processo.



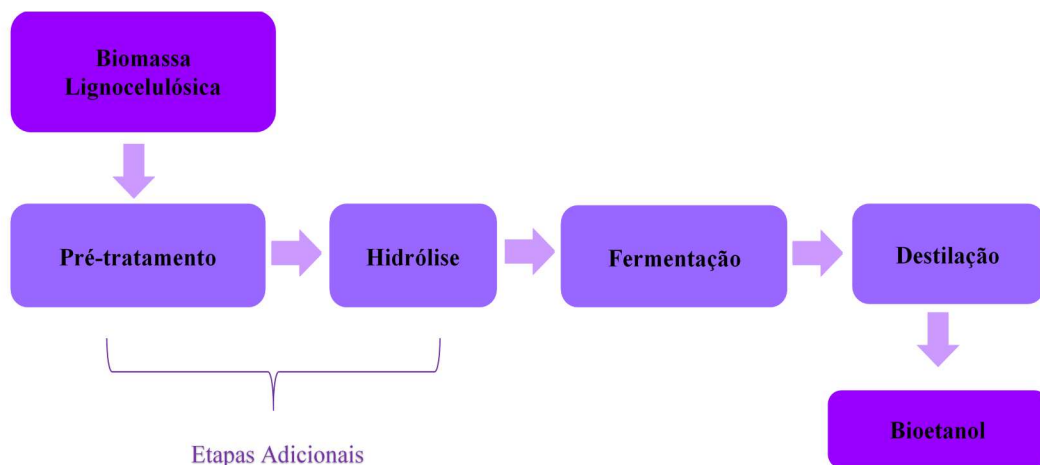
Segundo as estatísticas da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2015), na safra 2013/14 o Brasil processou cerca de 653 milhões de toneladas de cana, produzindo cerca de 91,4 milhões de toneladas de palha e, provavelmente, somente 6% desse material acompanhou os colmos de cana até a indústria. O restante foi queimado ou permaneceu no campo (CTC, 2012). A partir desta informação, estima-se que 13 bilhões de litros de etanol poderiam ter sido produzidos a partir da palha (vide Figura 2.8 B). Contudo, deve-se lembrar de que parte desta palha deverá ser utilizada para geração de energia no próprio processo e uma parte deixada no campo reduzindo este número.

Assim como para as outras biomassas lignocelulósicas a palha também requer, primeiramente, uma etapa de pré-tratamento para desorganizar sua complexa estrutura e remover parte da lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade de celulose e aumentar a porosidade do material (SUN; CHENG, 2002).

2.5 Produção de etanol de segunda geração (E2G)

Diferente da produção de etanol a partir de sacarose (1ª geração) que é um processo bem estabelecido atualmente, a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é um processo ainda em fase de aperfeiçoamento. A conversão de materiais lignocelulósicos em etanol apresenta obstáculos devido sua recalcitrância, que torna necessária duas etapas adicionais em relação ao processo de produção de etanol de primeira geração: pré-tratamento e hidrólise enzimática (SUN; CHENG, (2002). As etapas do processo de produção e etanol de segunda geração é apresentado na Figura 2.9.

Figura 2.9 – Etapas do processo de produção de etanol de segunda geração



2.5.1 Pré-tratamento

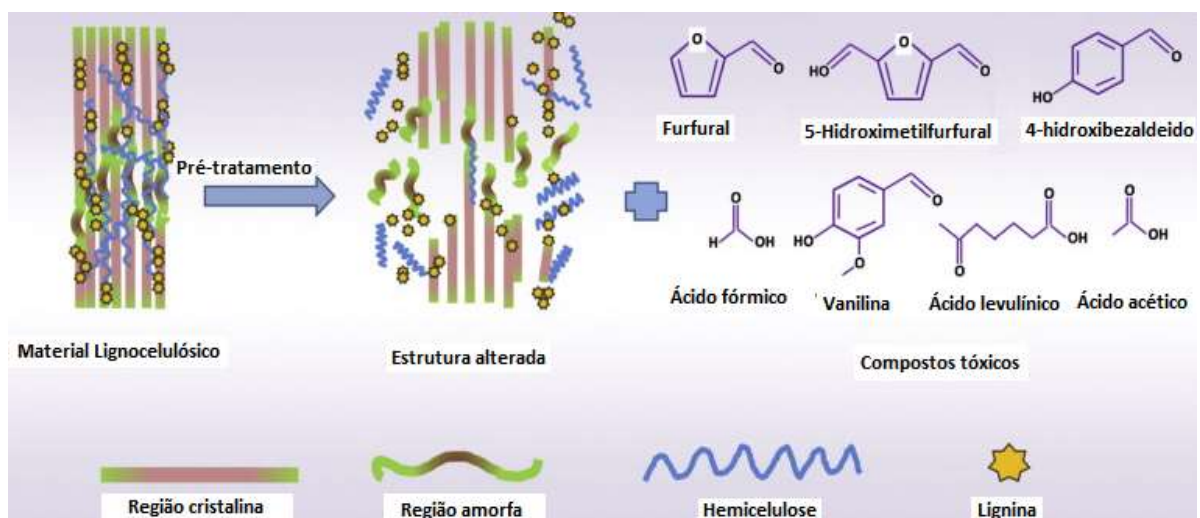
O pré-tratamento é um primeiro passo necessário na bioconversão dos materiais lignocelulósicos em biocombustíveis. Tem por finalidade a redução da recalcitrância da biomassa alterando as características estruturas da parede celular de modo que principalmente a fração celulósica fique mais acessível e susceptível a ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática. Além de ser uma das etapas operacionais mais importantes em termos de custo direto, ela apresenta grande influência nos custos e eficiência das etapas anteriores e subsequentes do processo (PIETROBON, 2008). A hidrólise da celulose sem a realização da etapa de pré-tratamento apresenta rendimentos menores que vinte por cento. Quando precedida por um pré-tratamento, a hidrólise pode, muitas vezes, apresentar rendimentos superiores a noventa por cento (HAMELINCK et al., 2005).

As principais finalidades do pré-tratamento do material lignocelulósico são:

- Remover ou reduzir lignina e hemicelulose,
- Diminuir a cristalinidade da celulose,
- Aumentar a porosidade e as áreas superficiais do material para que o coquetel enzimático empregado possam acessar e hidrolisar a celulose aumentando assim o rendimento desta em glicose

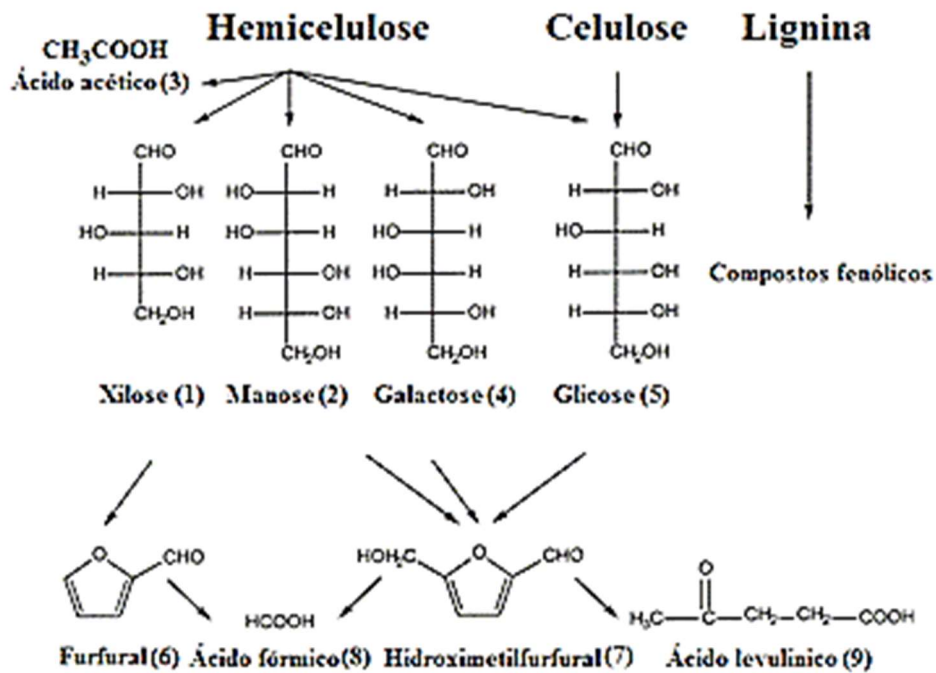
A Figura 2.10 apresenta um esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos e possíveis compostos tóxicos formados durante o processo.

Figura 2.10 – Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos e possíveis compostos tóxicos formados durante o processo (PHITSUWAN, et al. 2013).



Na etapa de pré-tratamento durante a desestruturação da fibra lignocelulósica são formados produtos de degradação, que apresentam efeitos negativos nas etapas subsequentes de hidrólise e fermentação. A concentração e composição destes produtos variam de acordo com o tipo de pré-tratamento e condições aplicadas. Os inibidores são classificados em três grupos com base em sua origem: ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico), furanos (furfural e hidroximetil furfural) e compostos fenólicos. A Figura 2.11 apresenta as principais vias de degradação que podem ser apresentadas na etapa de pré-tratamento (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Figura 2.11 – Vias de degradação que podem ser apresentadas na etapa de pré-tratamento (adaptado de PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).



Nesta etapa, deseja-se obter a mínima quantidade de compostos tóxicos e realizá-la como o menor consumo de energia. (RUIZ et al., 2011; PHITSUWAN et al., 2013).

Diferentes pré-tratamentos têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos físicos (trituração, moagem, microondas e extrusão), químicos (alcalino, ácido, oxidativo, organosolve e líquido iônico), pré-tratamento físico-químico (explosão à vapor, hidrotérmico, explosão de fibra de amônia (AFEX), oxidação úmida e explosão com CO₂) e biológicos (emprego de fungos ou bactérias) ou ainda a combinação dessas técnicas (NITSON; MATIS;

TRIANAFYLLIDIS, 2013; MOOD et al., 2013). A Tabela 2.3 apresenta as vantagens e desvantagens desses pré-tratamentos.

Tabela 2.3 – Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento (Adaptada de NANDA et al., 2014; SANTOS et al., 2012 e CANILHA et al., 2012)

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Pré-tratamentos físico		
Moagem	<ul style="list-style-type: none"> - Aumenta a área de superfície de biomassa - Reduz cristalinidade de celulose - Não produz inibidores 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto consumo de energia
Pré-tratamentos físico-químicos		
Expansão da fibra em amônia (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> - Aumenta a área de superfície acessível - Remove lignina e hemicelulose - Baixa produção de inibidores - Aumenta a taxa de fermentação 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é eficiente para a biomassa com alto teor de lignina - Alto custo da amônia
Pré-tratamento hidrotérmico	<ul style="list-style-type: none"> - Solubilização da hemicelulose - Taxas de recuperação elevadas para pentoses - Não utiliza produtos químicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Formação de inibidores dependendo da severidade do processo
Explosão a vapor	<ul style="list-style-type: none"> - Provoca a remoção de hemicelulose - Promove mudança na estrutura da lignina 	<ul style="list-style-type: none"> - Geração de compostos inibidores para microrganismos derivados das xilanas
Pré-tratamentos químicos		
Pré-tratamento ácido	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrolisa a Hemicelulose - Altera a estrutura de lignina - Facilita a hidrólise 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo - Corrosivo - Formação de substâncias inibidoras
Pré-tratamento alcalino	<ul style="list-style-type: none"> - Remove lignina - Boa solubilização de hemicelulose - Aumenta a área de superfície acessível diminuindo grau de polimerização 	<ul style="list-style-type: none"> - Longos tempos de residência - Sais irrecuperáveis formados e incorporados na biomassa - Alto custo com tratamento residual - Dificuldade na recuperação de bases
Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrolisa lignina e hemicelulose - Alta produção de xilose - Baixa produção de inibidores 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo relacionado a recuperação do solvente
Pré-tratamentos biológicos		
Pré-tratamento biológico	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo consumo de energia - Nenhuma exigência química 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo tempo de incubação

2.5.2 Pré-Tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico também chamado de autocatalítico não requer descompressão rápida e não emprega qualquer catalisador ou produto químico. É considerado uma tecnologia limpa uma vez que utiliza água como reagente principal, o que evita problemas de corrosão e necessidade de tratamento de resíduo (neutralização) (SAHA et al., 2013). A pressão é aplicada para manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas (160-240°C) provocando alteração na estrutura do material lignocelulósico. Esse processo baseia-se na solubilização da hemicelulose através da água quente, tornando a celulose mais acessível e minimiza a formação de inibidores (SILVA et al., 2013). A água a elevadas pressões e temperaturas tem o seu equilíbrio deslocado gerando maior quantidade de íons hidrogênio ($k_{H_2O} = 1,008 \cdot 10^{-14}$ a 25 °C e $k_{H_2O} = 51,3 \cdot 10^{-14}$ a 100 °C), o que acidifica o meio. Os íons hidroxila formados atuam como catalisadores na hidrólise da hemicelulose liberando moléculas de ácido acético e outros ácidos orgânicos que também atuam no processo (IMMAN, 2013).

No pré-tratamento hidrotérmico as principais variáveis que afetam a eficiência dos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática são o tempo de retenção e a temperatura do processo. A intensidade do pré-tratamento é expressa pelo fator de severidade ($\log(r_0)$), que descreve o efeito combinado da temperatura e do tempo sobre o material.

O fator de severidade correspondente a diferentes condições de pré-tratamento é definido por Overend, Chornet (1987). Com o aumento do fator de severidade do pré-tratamento as hexoses e as pentoses liberadas podem ainda serem degradadas em furfural e hidroximetil furfural que por sua vez são degradadas em ácido levulínico e fórmico respectivamente. Estes compostos podem atuar como inibidores nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação (MIN et al., 2015). De acordo com Silva et al. (2013) uma maneira para evitar a formação de inibidores, é manter o pH entre 4-7, pois neste pH os açúcares da fração hemicelulósica são mantidos na forma de oligômeros e a formação de monômeros é minimizada.

O processo hidrotérmico é capaz de remover a hemicelulose e conseqüentemente melhorar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico (MOSIER, et al, 2005). Santos et al. (2013) estudaram o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar que apresentou em sua composição antes do processo celulose (45,3%), hemicelulose (31,51%) e lignina (17,6%). Depois de submetida ao pré-tratamento hidrotérmico (210°C e 15 min) a porcentagem de celulose obtida no resíduo sólido foi de 56,39%, hemicelulose 2,54% e 33,68%.

Observa-se assim que o pré-tratamento hidrotérmico nessas condições solubiliza grande parte da fração hemicelulósica sem afetar consideravelmente a celulose e a lignina.

Zakaria et al., 2015 avaliaram o efeito do pré-tratamento hidrotérmico do óleo de palma em diferentes condições de tempo e temperatura e obtiveram uma solubilização da hemicelulose de 56 e 100% nos pré-tratamento com fator de severidade de 3,85 e 4,54 respectivamente. Os resultados obtidos também revelaram que a eficiência do processo é mais influenciada pela temperatura do que pelo tempo reacional, nenhum aumento significativo na concentração de celulose foi obtido a temperaturas mais baixas (150°C) mesmo com longos tempos reacionais (60-240 min). Por outro lado, fixando-se o tempo em 20 min, foram obtidas concentrações de celulose cerca de 36 e 42% para as temperaturas de 180 e 220°C, respectivamente. Vu-Bach; Tran; Skreiberg (2016) também relataram um efeito mais pronunciado com o aumento da temperatura em relação ao aumento do tempo.

Saha et al., 2013 obtiveram 72% de rendimento na hidrólise enzimática da palha de milho após pré-tratamento hidrotérmico (200°C/ 5 min.) e produção de 0,27 g de etanol por grama de palha na fermentação sem desintoxicação, o que equivale a 68,7% da produção de etanol teórica da palha de milho.

2.6 Hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos

As tecnologias para a obtenção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos desta biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do bioetanol.

Na hidrólise, a celulose é convertida em glicose conforme a Equação 1.

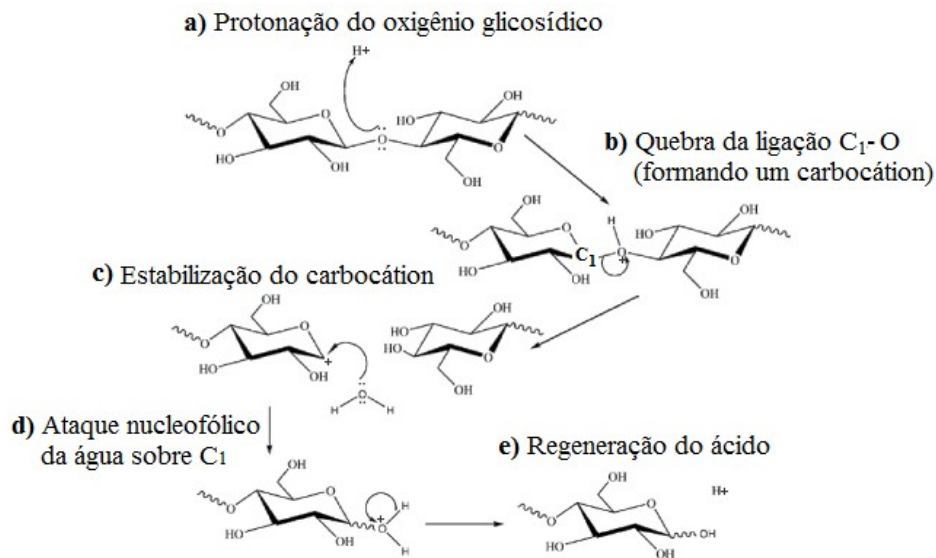


A hidrólise da celulose ocorre espontaneamente em água pura, porém, de forma muito lenta. A conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis pode ser feita por duas rotas tecnológicas: (a) hidrólise ácida, e (b) hidrólise enzimática.

A hidrólise ácida baseia-se na protonação do oxigênio glicosídico (Figura 2.12–a) com posterior quebra da ligação C₁-O. Em seguida o carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente no oxigênio do anel glicosídico, adjacente ao C₁. A etapa de despolimerização (ocorre no interior da cadeia celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais da

cadeia de celulose), encerra com o ataque nucleofílico da água sobre C₁ (Figura 2.12-c) com regeneração do ácido. A etapa de despolimerização é então encerrada (se ocorrer no interior da célula de celulose, gerando novos terminais) ou há produção de glicose (quando a hidrólise ocorre nos terminais da cadeia de celulose) (OGEDA; PETRI, 2010).

Figura 2.12 – Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido (adaptado de OGEDA; PETRI, 2010)



As hidrólises ácidas são relativamente eficientes. No entanto apresentam vários inconvenientes como, formação de subprodutos que afetam seu rendimento e inibem a fermentação, a necessidade de separação e recuperação do ácido, além da necessidade de equipamentos mais caros que sejam resistentes à corrosão (DIPARDO 2000; HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

A via enzimática por sua vez apresenta várias vantagens quando comparada à rota ácida. Citam-se menor consumo de energia, uma vez que opera sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, menores custos de equipamento (pelo fato da reação ser realizada em condições mais amenas) além de ser altamente específica e não formar produtos de degradação, como o furfural e o hidroximetilfurfural. Esses compostos causam efeitos indesejáveis durante a etapa de fermentação (PEREIRA et al., 2011; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Na Tabela 2.4 são apresentadas comparações das condições e os desempenhos dos diferentes processos de hidrólises.

Tabela 2.4 – Comparação das diferentes opções para a hidrólise da celulose (adaptado de HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

	Reagente	Temperatura (°C)	tempo	Sacarificação
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215	3 min.	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 h.	90%
Enzimática	Celulases	70	1,5 dias	75-95%

2.6.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática, se caracteriza pela hidrólise do material lignocelulósico à glicose através do processo catalisado por enzimas altamente específicas chamadas genericamente de celulases. As características do complexo enzimático assim como a do substrato escolhido determinam as condições de temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração de enzima e relação sólido-líquido em que o processo deve ser empregado. As características do processo devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso aplicado (RABELO, 2010)

Vários fatores afetam a hidrólise enzimática da celulose entre eles estão a porosidade (área superficial acessível a celulase), a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose e o teor de lignina e hemicelulose na biomassa (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Apesar dos avanços na tecnologia de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica o custo da produção ainda é relativamente elevado baseado nas tecnologias atuais, assim os principais desafios são o baixo rendimento e o alto custo do processo de hidrólise enzimática (que podem representar até 18% do custo operacional de uma planta). A fim de se melhorar o rendimento e a velocidade desse processo vários estudos tem se centralizado na otimização do processo de hidrólise assim como no aumento da atividade enzimática e redução dos preços da celulase (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2007; CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

2.6.1.1. Ação das enzimas celulolíticas

Embora a celulose seja um homopolímero é necessário um complexo enzimático denominado celulases que se caracteriza por ser um complexo altamente específico que atuam

em sinergia para atacar diferentes partes da fibra de celulose (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; KRISTENSEN; FELBY; JORGENSEN, 2009). O catalisador da hidrólise enzimática é um complexo composto por endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolase I e II) e β -glucosidases.

✓ *Endoglucanases* – Atacam a preferencialmente as cadeias amorfas de celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos insolúveis de diferentes comprimentos com extremidades redutoras e não redutoras (LYND et al., 2002).

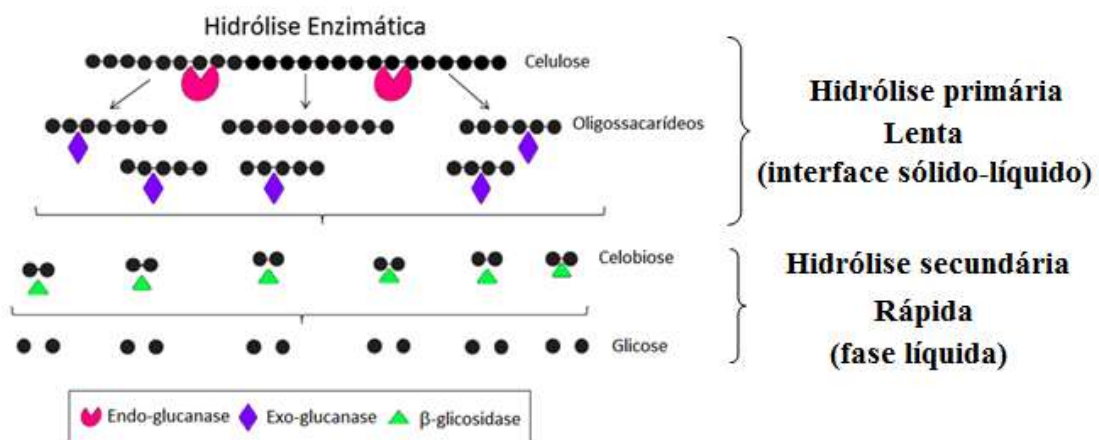
✓ *Exoglucanases* – São divididas em duas categorias celobiohidrolases I que hidrolisa os terminais redutores e a celobiohidrolases II que ataca os terminais não redutores. As exoglucanases também se caracterizam por agirem tanto a hemicelulose cristalina quanto amorfa e os principais produtos de sua ação são glicose e celobiose (LYND et al., 2002; KUMAR; MURTHY, 2013).

✓ *β -glucosidases* – Hidrolisam a celobiose e celodextrinas (trioses e tetraose) em glicose.

Além das celulases os complexos enzimáticos podem conter enzimas auxiliares que atacam a hemicelulose como as xilanase, β -xilosidase, galactomananase, glucomananase, acetilesterase e glucuronidase (SUN; CHENG, 2002)

A Figura 2.13 apresenta a ação catalítica desse complexo (YANG et al., 2011; KUMAR; MURTHY, 2013).

Figura 2.13 – Ilustração do modo de ação do complexo enzimático
(Adaptada de BINOD et al., 2011).



A ação das enzimas celulolíticas em substratos celulósicos insolúveis se caracteriza por ser uma reação heterogênea que pode ser dividida em três etapas que ocorrem simultaneamente (Figura 2.13):

- 1) alterações físicas e químicas na celulose que ainda não foi solubilizada;
- 2) etapa primária que ocorre na interface sólido-líquido através da ação sinérgica da endoglucanase e exoglucanase, promovendo a liberação de oligômeros solúveis;
- 3) etapa secundária que ocorre na fase líquida onde os intermediários solúveis são clivados em glicose pela β -glicosidase (ZHANG; LYND, 2004).

2.6.2 Variáveis que afetam a hidrólise enzimática

Embora a tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis seja considerada uma alternativa promissora para a produção de etanol, o processo ainda esbarra em dificuldades técnicas e econômicas. Muitos fatores têm contribuído para o elevado custo da hidrólise enzimática, como a acessibilidade das enzimas ao substrato, a ligação não produtiva e efeitos de inibição das enzimas exigindo o uso de altas concentrações de enzimas (LEU e ZHU, 2013; MUSSATTO et al., 2008). Para melhorar o rendimento e a velocidade da hidrólise enzimática muitos estudos tem enfatizado na otimização do processo de hidrólise e no aumento da atividade da celulase.

2.6.2.1. Carga de enzimas

Como regra geral, a conversão do substrato aumenta com o aumento da concentração enzimática, entretanto, essa relação não é linear (GODFREY e WEST, 1996; SATTLER et al., 1989). Sattler et al. (1989) observaram um aumento de aproximadamente 50% na formação de produto ao dobrar a carga enzimática de 5 para 10 FPU/g-substrato, após 96 h de hidrólise. No entanto, um aumento posterior de dez vezes na carga enzimática, de 10 para 100 FPU/g-substrato, resultou apenas em aumento de aproximadamente 30% no produto formado.

A hidrólise da celulose se diferencia das outras reações enzimáticas por ser uma reação heterogênea e, para garantir que a reação ocorra, o contato físico entre enzima e substrato, i.e., a adsorção das enzimas ao substrato, é um pré-requisito para a hidrólise (MANSFIELD et al., 1999). Em elevadas concentrações de enzima, pode ocorrer perda de enzimas por adsorção improdutiva no substrato ou em outros componentes, como a lignina (PALONEN et al., 2004).

Devido ao alto custo relacionada ao complexo enzimático é importante a otimização da carga enzimática.

2.6.2.2. Carga de sólidos

Uma variável importante na hidrólise enzimática é a carga de sólidos. Manter altas concentrações de sólidos ao longo do processo de produção de bioetanol é importante do ponto de vista econômico e energético (BINOD et al., 2011) de forma a garantir que se obtenham elevadas concentrações de açúcares. Assim obtém-se economia significativa no processo como diminuição do custo operacional das etapas de hidrólise e fermentação e minimização do consumo de energia nas etapas de evaporação/destilação reduzindo os custos de produção (IOELOVICH; MORAG, 2012). No entanto, o uso de altas concentrações de substratos pode levar a redução da eficiência devido ao aumento da resistência à transferência de massa. A eficiência da hidrólise enzimática está associada à velocidade de formação de produto, que é governada por três eventos em sequência: velocidade de transferência de massa externa da enzima até a superfície do substrato, velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e velocidade da reação enzimática (GAN et al. 2003). Uma das formas de melhorar o processo de sacarificação enzimática é minimizar os efeitos de resistência à transferência de massa, de forma a garantir que o processo não seja limitado por essa etapa.

2.6.2.3. Inibição da atividade da celulase pelo produto

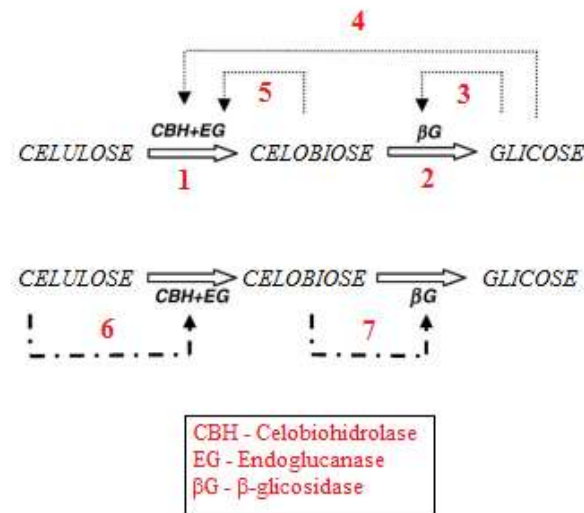
Outro fator que afeta fortemente a velocidade das reações enzimáticas é a inibição da celulase pelo produto final. A eficiência da conversão dos materiais lignocelulósicos é fortemente limitada pela inibição das celulases pelos produtos da hidrólise principalmente celobiose e glicose (SUN; CHENG, 2002; ANDRIC et al., 2010). Holtzaple et al. (1990) resumiu os dados de diferentes autores sobre inibição da celulase pelo produto e observou a ocorrência de inibição competitiva e não competitiva, porém a inibição competitiva foi mais comumente reportada.

A Figura 2.14 ilustra a representação das principais reações na etapa de hidrólise da celulose. A glicose inibe as celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases (Figura 2.14, vias 3 e 4). A celobiose produto resultante da ação das exoglucanases e da ação parcial das endoglucanases inibem as celobiohidrolases, endoglucanases e β -glicosidases (Figura 2.14, vias

5 e 7). Celuloses também exercem inibição em celobiohidrolases e endoglucanases (Figura 2.14, via 6) (ANDRIĆ et al., 2010).

Segundo Holtzaple et al. (1990) a celobiose apresenta um efeito inibidor maior sobre a hidrólise que a glicose. Castro e Pereira Jr, 2010 reportam que para promover a redução da inibição das endo e exoglucanases principalmente pela celobiose é necessário a suplementação dos complexos enzimáticos com β -glicosidase, afim de aumentar a conversão final do substrato em glicose.

Figura 2.14 – Representação das principais vias de inibição da celulase (Adaptada de ANDRIĆ et al., 2010).



Kristensen; Felby; Jørgensen (2009) observaram uma significativa redução da taxa de hidrólise de papel filtro com adição de 50g.L^{-1} de glicose durante as primeiras horas de reação. O efeito de inibição foi mais acentuado nas hidrólises com carga de sólidos de 5% em relação a de 20% uma vez que a relação entre glicose e enzima era maior para as hidrólises com menor carga de sólidos. Xião et al., (2004) determinaram o efeito de inibição da glicose, xilose, celobiose, manose e de galactose na hidrólise de coníferos, e observaram que a glicose apresentou efeito inibitório significativo tanto nas celulases quanto na β -glicosidase. Já os demais açúcares apresentaram maior efeito de inibição nas celulases.

2.7 Fermentação

A fermentação é um processo biológico no qual compostos orgânicos, como açúcares, são convertidos por microrganismos em componentes mais simples. No caso da fermentação alcoólica, etanol é produzido a partir da conversão enzimática da glicose, conforme a Equação 2.



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

Historicamente, o microrganismo mais comumente utilizado neste processo, tem sido leveduras, dentre elas a *Saccharomyces cerevisiae* tem se destacado. Essas leveduras têm sido tradicionalmente utilizadas nas grandes indústrias produtoras de etanol no Brasil, podendo ser leveduras de panificação, prensadas e secas ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (WOLF, 2011).

A hidrólise enzimática e a fermentação podem ocorrer em equipamentos separados e denomina-se Hidrólise e Fermentação Separadas (do inglês SHF, Separated Hydrolysis and Fermentation) ou no mesmo equipamento, denominada Sacarificação e Fermentação Simultâneas, (do inglês SSF, Simultaneous Saccharification and Fermentation). A vantagem do processo SHF é a possibilidade de se otimizar as temperaturas e pHs de cada uma das etapas, hidrólise enzimática e da fermentação. Entretanto pode ocorrer uma redução do rendimento do processo pela inibição das endoglucanases pelo celobiose e das β -glucosidases pela glicose formadas durante a reação.

No processo de hidrólise e fermentação simultâneas (SSF) ambos ocorrem no mesmo reator, assim a glicose liberada na hidrólise pela ação da celulase é convertida diretamente em etanol por fermentação do microrganismo e está remoção contínua de glicose do meio minimiza a inibição do produto final sobre a atividade da enzima, além disso a presença do etanol no meio de cultura evita a contaminação microbiana indesejada. Estas vantagens fazem com que a SSF apresente uma maior taxa de sacarificação e produção de etanol em relação à SHF.

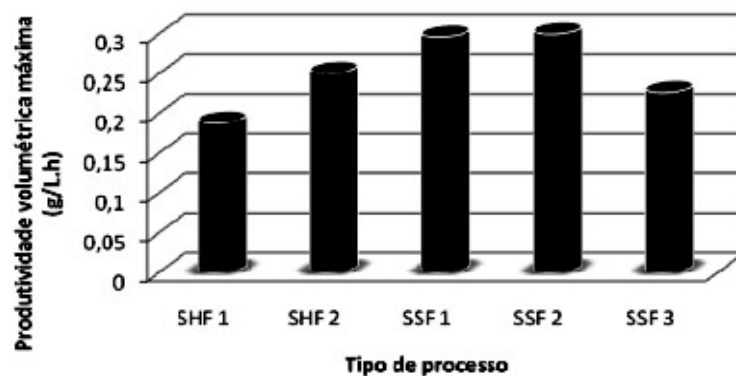
Santos et al. (2010) compararam os processos SSF utilizando bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e o processo SHF utilizando bagaço com e sem deslignificação. A Figura 2.13 apresenta as produtividades volumétricas máximas de etanol obtidas em cada processo para as diferentes condições (SHF 1 – biomassa pré-tratada; SHF 2 – biomassa pré-tratada e deslignificada). Pode-se observar que os maiores valores foram obtidos para os experimentos

em SSF1 e SSF2 nos quais houve uma pré-sacarificação antes da sacarificação e fermentação. Já no experimento SSF 3 onde não foi realizada a pré-sacarificação a produtividade volumétrica máxima pode ser comparada a obtidos no experimento SHF 2 em que se utilizou bagaço deslignificado.

Toma's-Pejo et al. (2008) estudaram a produção de bioetanol, a partir de palha de trigo em configurações SSF e SHF e obtiveram em todos os casos estudados maiores concentrações finais de etanol no processo SSF. Os autores verificaram também que no processo SSF os inibidores furfural e hidroximetilfurfural foram completamente metabolizados pela levedura por reações redox.

O aumento da carga de substrato, a redução da carga enzimática e do tempo de residência associados às melhorias na atividade do complexo enzimático são fatores que contribuem para a viabilidade da rota enzimática (OUYANG et al., 2013). Para o processo de hidrólise enzimática ser realizado com elevada eficiência, é necessária a otimização das condições de hidrólise.

Figura 2.15 – Comparação das produtividades volumétricas máximas dos processos em SHF (*sacarificação e fermentação separadas*) e SSF (*sacarificação e fermentação simultâneas*) (SANTOS et al., 2010).



Para finalizar, fica claro que diante dos aspectos ambientais, da viabilidade e vantagens do uso da palha da cana-de-açúcar na produção de etanol além da importância de uma otimização de cada etapa do processo de produção afim de tornar este um processo viável para uma aplicação em grande escala, esta tese de doutorado procura contribuir para o entendimento e otimização de alguns aspectos da etapa de pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes de laboratório utilizados neste trabalho foram de padrão analítico e não sofreram qualquer tratamento antes de sua utilização, a não ser que seja mencionado o contrário.

3.1.1 Materiais lignocelulósicos:

- Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP). O material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente moído em moinho de faca (modelo MAK 250) a 3/8 mesh.

- Palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar (PCA) *in natura* utilizada neste trabalho foi proveniente da Usina Itapira localizada na cidade de Catanduva, SP. O material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente moído em um moinho de faca (modelo MAK 250) a 3/8 mesh. A palha moída foi então estocada em sacos plásticos com cerca de 250 gramas de massa úmida e armazenadas em freezer a -20 °C para evitar possíveis contaminações.

Neste trabalho considerou-se a palha como sendo a fração constituída de folhas verdes e folhas secas da cana-de-açúcar que é a denominação mais utilizada no setor industrial sucroalcooleiro.

3.1.2 Enzima

Foram utilizados dois coquetéis enzimáticos comerciais a Accellerase[®]1500 gentilmente cedido pela empresa DuPont, Genencor A Danisco Division, EUA e Cellic[®] CTec-2, doado pela empresa Novozymes[®] (Araucária, PR).

A atividade enzimática da Accellerase[®]1500 foi determinada previamente por Silva (2015) obtendo-se o valor de 74 FPU/mL (substrato papel filtro Whatman n^o1).

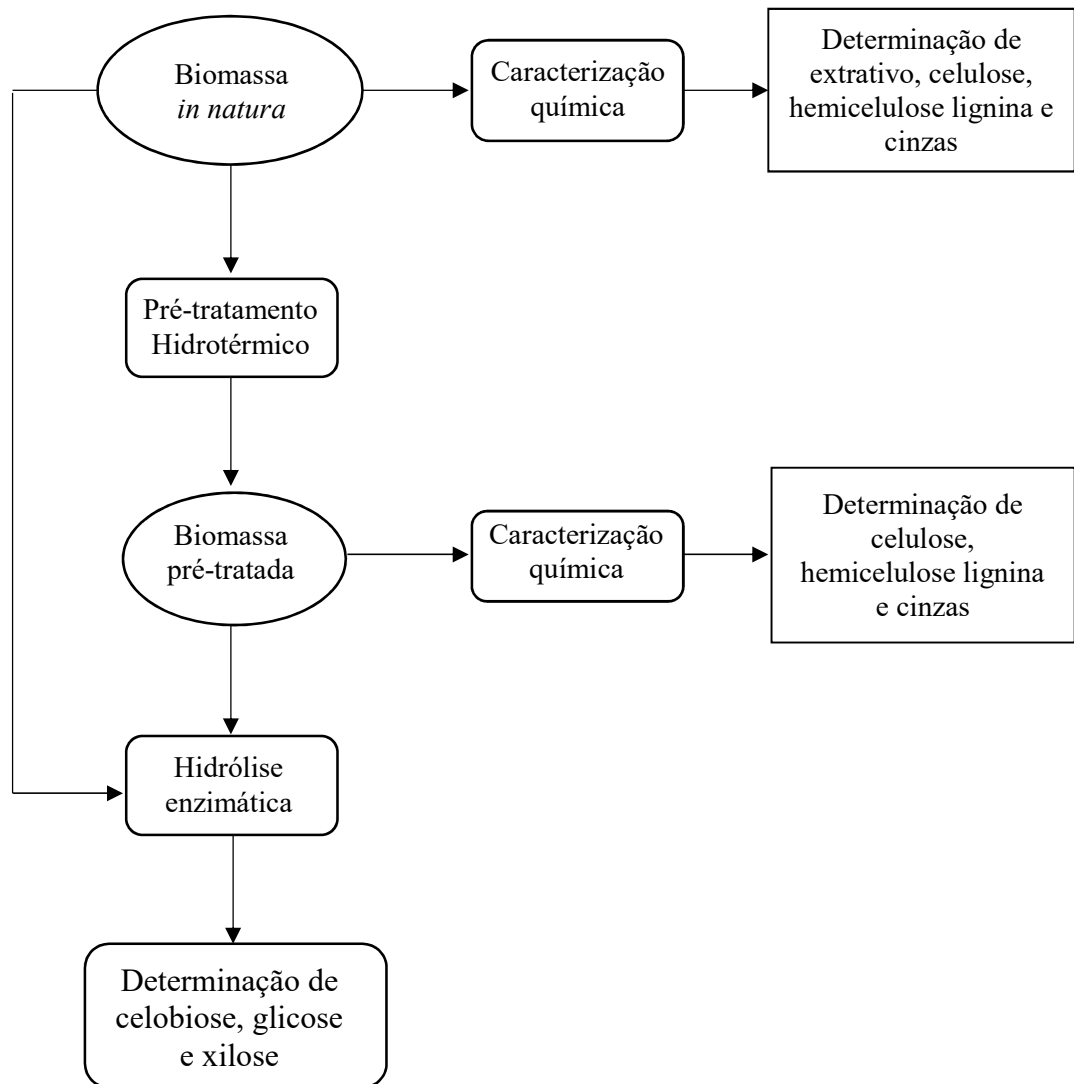
As atividades enzimáticas para o coquetel enzimático Cellic[®] CTec-2 foram determinadas experimentalmente neste trabalho. De acordo com o fabricante o complexo

enzimático Cellic® CTec-2 apresenta alta carga de β -glicosidase com uma maior tolerância a inibição pelo produto, além da adição de xilanase.

3.2 Procedimentos experimentais

A Figura 3.1 apresenta um fluxograma com a sequência dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

Figura 3.1 – Fluxograma das metodologias experimentais utilizada no trabalho.



Fonte: Acervo pessoal

3.2.2 Determinação da umidade

A umidade das amostras de biomassa foi determinada empregando determinador de umidade modelo ID50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda.) a 100°C em modo automático.

3.2.3 Cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais cadinhos de porcelana foram previamente lavados e levados a mufla à 800°C por 30 minutos sendo posteriormente resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados em balança analítica. Amostras de cerca de 2 gramas de amostra moída com teor de umidade previamente determinado foram calcinadas lentamente em mufla a 200°C por 30 minutos e em seguida a 800°C por mais duas horas. Após esse período as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. A determinação do teor de cinzas foi realizada em duplicata para cada amostra e calculada de acordo com a equação 3.

$$\% \text{cinzas} = \left(\frac{m_{\text{cadinho+cinzas}} - m_{\text{cadinho}}}{m_{\text{biomassa seca inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: m_{cadinho} - massa inicial seca do cadinho (g)

$m_{\text{cadinho+cinzas}}$ - massa seca do cadinho + cinzas (g)

$m_{\text{biomassa seca inicial}}$ - massa inicial seca de biomassa

3.2.4. Extrativos

O procedimento de determinação de extrativos seguiu o protocolo proposto pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) “*Determination of Extractives in Biomass*” (SLUITER et al., 2008). Esse procedimento tem como finalidade além da quantificação do teor de extrativos a remoção destes da amostra para uma melhor precisão nos métodos posteriores de quantificação de carboidratos e lignina.

A determinação do teor de extrativos contido na biomassa “*in natura*” foi realizada em um sistema de extração (Soxhlet - Diogolab). Inicialmente 4,0 g (massa seca) de biomassa (*in natura*) foram adicionadas aos cartuchos de extração (celulose), que por sua vez foram introduzidos no tubo de extração do sistema. Foram adicionados 500 mL de etanol 95% (v/v) no balão do extrator que foi previamente tarado e seco em estufa a 105°C por 24 horas e então

foi ligado o aquecimento ajustando-se para que fornecesse um ciclo mínimo de 6 sífões por hora. Após extração por cerca de 24 horas o líquido contendo os extrativos foi rotaevaporado até evaporação total do solvente e os sólidos contidos nos cartuchos foram transferidos quantitativamente para placas de Petri previamente taradas e seco em estufa a 105°C por 24 horas.

A quantificação do conteúdo de extraíveis pode ser calculada de duas maneiras: por diferença de massa dos cartuchos antes e após a extração e por diferença de massa do balão do extrator antes e após a extração conforme descrito nas Equações 4 e 5.

$$\% \text{Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{cartucho final}} - m_{\text{cartucho inicial}}}{m_{\text{biomassa seca inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: $m_{\text{cartucho inicial}}$ – massa do cartucho seco sem amostra (g)

$m_{\text{cartucho final}}$ – massa do cartucho seco + amostra livre de extrativos (g)

$m_{\text{biomassa seca inicial}}$ – massa inicial seca de biomassa

$$\% \text{Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{balão final}} - m_{\text{balão inicial}}}{m_{\text{biomassa seca inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde: $m_{\text{balão inicial}}$ – massa do balão seco (g)

$m_{\text{balão final}}$ – massa do balão + extrativos (g)

$m_{\text{biomassa seca inicial}}$ – massa inicial seca de biomassa

3.2.5 Hidrólise ácida

Essa etapa tem como finalidade o fracionamento da biomassa em estruturas mais facilmente quantificáveis. Para esse fim é realizada uma hidrólise ácida (utilizando ácido sulfúrico) em duas etapas, a primeira concentrada e a segunda diluída. Durante a hidrólise ácida os carboidratos poliméricos são hidrolisados em suas formas monoméricas solúveis no hidrolisado e então medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A lignina é fracionada em lignina insolúvel, que é quantificada por análise gravimétrica e lignina solúvel, quantificada por espectroscopia UV-Vis. É importante ressaltar que as amostras devem ser previamente moídas a 20 mesh e a umidade deve ser igual ou menor que 10% (m/m) para que não ocorram interferências nas quantificações de lignina e carboidratos.

Amostras de 1 grama de amostra (*in natura* e pré-tratada) com até 10% de umidade foram transferidas para béqueres de 100 mL para serem tratadas com 10 mL solução de H₂SO₄ 72% (v/v) sob agitação vigorosa em banho termostaticado à 45°C por 7 minutos. Em seguida a reação foi interrompida com a adição de 50 mL de água destilada ao béquer e a amostra foi transferida quantitativamente para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL onde se adicionou 225 mL de água destilada. Para a completa hidrólise dos oligômeros restantes foi então realizada a hidrólise diluída na qual os frascos de Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos a 121°C (2 bar). Passado o tempo de hidrólise os Erlenmeyers foram resfriados a temperatura ambiente e filtrados em papel de filtro qualitativo (previamente pesado em pesa filtro e seco em estufa a 105°C até massa constante) diretamente em um balão volumétrico de 500 mL que foi completado com água. O filtrado foi então fracionado em duas partes: uma para a determinação da lignina solúvel e a outra para a quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fração sólida retida no papel filtro foi lavada com 2,0 L de água destilada, e em seguida deixada na capela por uma noite para posterior determinação da lignina insolúvel.

3.2.6 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida

As frações líquidas dos hidrolisados ácidos foram aplicadas em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Phenomenex) afim de se remover compostos aromáticos que pudessem interferir na análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se nas análises de carboidratos e ácidos orgânicos a coluna Aminex HPX87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltda.) em cromatógrafo (Shimadzu, modelo LC-10AD) empregando detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-6A). A fase móvel utilizada consistiu de solução de ácido sulfúrico 5 mM. A temperatura do forno foi mantida em 45°C e a vazão do eluente de 0,6 mL.min⁻¹.

Para a construção das curvas de calibração dos carboidratos e ácidos orgânicos, foram injetados no cromatógrafo padrões de concentrações conhecidas que foram correlacionadas com suas respectivas áreas após injeção. Foram preparadas soluções padrões de concentração conhecida de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico e ácido glucurônico.

Na determinação de furfural e hidroximetilfurfural as frações líquidas foram filtradas em membrana de diâmetro de poro de 0,2 µm para total remoção de compostos sólidos da

amostra. Utilizou-se para as análises a coluna μ -Bondapack C-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), empregando como fase móvel solução de acetonitrila com água na proporção de 1:8 e 1% de ácido acético. A vazão empregada foi de 0,8 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno foi mantida a 25°C. Os compostos foram detectados com auxílio de um detector UV-visível (Shimadzu SPD-10) em comprimento de onda de 274 nm. As concentrações foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os padrões de concentrações conhecidas.

Para calcular a quantidade dos açúcares poliméricos contidos na biomassa seca, utilizou-se a equação 6.

$$\% \text{ açúcares} = \left(\frac{C_{\text{CLAE}} \cdot f_c \cdot V_f}{m_{\text{biomassa seca inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde: C_{CLAE} – concentração de açúcar detectada na amostra analisada (g/L)

f_c – fator de conversão de açúcar monomérico em polimérico

V_f – volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L

$m_{\text{biomassa seca inicial}}$ – massa inicial seca de biomassa

De forma similar a mesma equação utilizada para os açúcares foi utilizada na quantificação dos ácidos orgânicos, furfural e HMF. Os fatores de conversão de açúcares monoméricos em anidromônômeros são 0,9 (glicose), 0,95 (celobiose), 0,88 (xilose e arabinose), 0,72 (ácido acético), 0,84 (ácido glucurônico), 3,09 (ácido fórmico), 1,37 (furfural) e 1,2 (hidroximetilfurfural). Esses fatores são calculados baseando-se na adição de água nos monômeros dos polissacarídeos durante a hidrólise ácida.

Desta forma, as concentrações de celulose e hemicelulose foram calculados pelas equações 7 e 8, respectivamente:

$$\text{celulose (\%)} = \text{glicose(\%)} + \text{celobiose(\%)} + \text{ac.formico(\%)} + \text{HMF(\%)} \quad (7)$$

$$\text{hemicelulose (\%)} = \text{xilose(\%)} + \text{ac. glucuronico} + \text{ac.formico(\%)} + \text{furfural(\%)} \quad (8)$$

3.2.7 Determinação da lignina insolúvel

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason, modificado por Rocha et al. (1997). Transferiu-se o papel filtro contendo a fração sólida para um pesa filtro previamente pesado e colocou-o em estufa a 105°C até peso constante. Após secagem o pesa filtro foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado em balança analítica. Em seguida o papel filtro foi transferido para um cadinho de porcelana previamente lavado e pesado e então foram calcinadas lentamente em mufla a 200°C por 30 minutos e em seguida a 800°C por mais duas horas. Após esse período os cadinhos contendo as cinzas foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesadas em balança analítica.

A porcentagem de lignina insolúvel contida na amostra foi calculada pela Equação 9.

$$\%L_{Ki} = \left(\frac{m_K - m_c}{m_{\text{biomassa seca inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

Onde: L_{Ki} – Lignina Klason insolúvel

m_K – massa de lignina insolúvel seca (massa_{pesa filtro+papel filtro+fração sólida} – massa_{pesa filtro+papel filtro})

m_c – massa de cinzas presente na lignina (massa_{cadinho+ cinzas} – massa_{cadinho})

$m_{\text{biomassa seca inicial}}$ – massa inicial seca de biomassa

3.2.8 Determinação da lignina solúvel

Uma alíquota de 5,0 mL da fração líquida do material hidrolisado com ácido sulfúrico 72% foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL onde se adicionou 40 gotas de NaOH 6,5N, completando-se o volume com água destilada. A lignina foi quantificada por espectroscopia na região do UV em espectrofotômetro UV-visível (Ultrospec-2000), por meio da medida de absorbância a 280 nm, em cubeta de quartzo.

As equações (10) e (11) foram utilizadas para o cálculo da concentração de lignina solúvel no hidrolisado.

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \cdot 10^{-2} \cdot (A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (10)$$

$$A_{\text{pd}} = C_1 \cdot \epsilon_1 + C_2 \cdot \epsilon_2 \quad (11)$$

Onde: C_{lig} – concentração de lignina solúvel em (g/L)

A_T – absorvância do hidrolisado em 280 nm

A_{pd} – absorvância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) em 280 nm

C_1 – concentração de furfural determinadas por CLAE (g/L)

C_2 – concentração de hidroximetilfurfural determinadas por CLAE (g/L)

ϵ_1 – absorvância do furfural – 146,85 L. g⁻¹. cm⁻¹

ϵ_2 – absorvância do hidroximetilfurfural – 114,00 L. g⁻¹. cm⁻¹

3.3 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em reator de Parr de 1,5 gal (modelo 4584, Parr Instruments Company, de Moline, Illinois, EUA) equipado com um agitador de hélice, aquecedor, e controlador de temperatura (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Fotografia do reator utilizado na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico



Fonte: Acervo pessoal

Previamente foi determinado o teor de umidade por medida gravimétrica do material lignocelulósico. Em seguida cerca de 200g material em massa seca foi misturado com água destilada na proporção 1:10 (m/v) e agitado constantemente a 200 rpm. O reator foi fechado hermeticamente e ligou-se a camisa de aquecimento sendo a temperatura e o tempo de reação

monitorados. Após completado o tempo de reação, o reator foi resfriado com água à temperatura ambiente até 50 °C. Os sólidos e as frações líquidas foram separados por filtração em filtro de pano. Após as reações de pré-tratamento nas condições estabelecidas o material foi filtrado e separada uma fração líquida para posterior medida do pH e análises de açúcares, ácidos orgânicos, furfural e HMF em cromatografia líquida de alta eficiência conforme descrito no item 4.2.6. A fração de sólidos foi lavada abundantemente com água até pH neutro para remoção de hemicelulose e lignina residuais, além de possíveis inibidores (produtos da degradação das pentoses, hexoses e lignina) que poderiam estar impregnados nas fibras. Amostras de material sólido foram armazenadas em sacos de plástico selados e armazenados em freezer a -20°C. Uma fração da parte sólida foi reservada para a caracterização química do material.

A fim de se otimizar as principais condições operacionais do pré-tratamento hidrotérmico foi feito um estudo da influência do tempo, temperatura e granulometria da palha no pré-tratamento.

3.3.1 Influência da temperatura e tempo de pré-tratamento

Para avaliar a influência da temperatura e do tempo de pré-tratamento foram realizados ensaios em duplicata nas condições operacionais descritas na Tabela 3.1. As condições operacionais foram definidas com base na revisão da literatura.

Tabela 3.1 – Condições experimentais aplicadas nos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	220	5
2	220	15
3	170	5
4	170	15
5	195	10

3.3.2 Influência da granulometria no pré-tratamento

Para avaliar o efeito da granulometria no pré-tratamento hidrotérmico foram realizados ensaios com a melhor condição de tempo e temperatura obtidos na etapa 4.3.1 com biomassa

moída a 3/8 e 5 mesh. Na Figura 3.4 é apresentada a fotografia da palha em cada uma das granulometrias avaliadas.

Figura 3.4 – Fotografia da palha nas das granulometrias avaliadas.



(A) – 3/8 mesh

(B) – 5 mesh

Fonte: Acervo pessoal

3.3.3 Determinação do rendimento mássico ou perda ou solubilidade dos componentes macromoleculares no pré-tratamento

Para determinar os rendimentos mássicos das etapas de pré-tratamento foi utilizada a Equação 12.

$$R = \left(\frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Onde: **R** – rendimento mássico do pré-tratamento (%)

m_i – massa inicial seca de material lignocelulósico (g)

m_f – massa final seca de material lignocelulósico (g)

A perda ou solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulósica e lignina) foi calculada a partir da equação 13.

$$P = 100 \times \left(\frac{M_i \cdot y_i - M_i \cdot y_f \cdot R}{M_i \cdot y_i} \right) = 100 \times \left(1 - R \cdot \frac{y_f}{y_i} \right) \quad (13)$$

Onde: **P** – perda ou solubilização do componente macromolecular (%)
M_i – massa inicial seca de material lignocelulósico (g)
y_i – teor do componente no material lignocelulósico *in natura*
y_f – teor do componente no material lignocelulósico pré-tratado
R – rendimento mássico do pré-tratamento (%)

3.3.4 Determinação da severidade do pré-tratamento hidrotérmico

O fator de severidade é calculado em função da temperatura do pré-tratamento, do tempo de residência (na temperatura constante) e uma temperatura de referência de 100°C, sendo uma medida da intensidade do pré-tratamento. É utilizado para comparar, avaliar e prever a solubilização dos componentes da biomassa durante o processo (OVEREND; CHORNET, 1987). O cálculo do fator de severidade é dado pela equação 14.

$$\log(r_0) = \log \sum_{i=1}^n \left[t * \exp \left(\frac{T_i - T_{ref}}{14,75} \right) \right] \quad (14)$$

Onde: **log(r₀)** – fator de severidade
t – tempo reacional (minutos)
T_i – temperatura (°C) medida em cada instante de tempo
T_{ref} – temperatura de referência = 100°C

3.3.5 Análise da palha de cana-de-açúcar por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratada e pré-tratada seguida de deslignificação foram previamente fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento metálico com ouro em um metalizador (Sputter Coater BAAL-TEC SCD 050). As microscopias foram obtidas em diferentes ampliações (50, 100 e 500 vezes) utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6510 LV) com detector de elétrons secundário, com potência do feixe de elétrons de 10 kV. As análises foram realizadas na Embrapa Instrumentação (São Carlos -SP).

3.4 Determinação das atividades enzimáticas

Antes do início das hidrólises fez-se necessária uma análise de determinação das atividades enzimática do complexo enzimático utilizado. A Cellic[®]CTec2 foi caracterizada pela atividade em papel filtro, atividade em solução de celobiose e em atividade da xilanase.

3.4.1 Determinação da atividade celulase (*Filter Paper Activity*)

Para a determinação da atividade de celulase seguiu o procedimento padrão do NREL *Measurement of Cellulase Activities* (ADNEY e BAKER, 2008), que aplica as diretrizes da IUPAC, descrita por Ghose (1987).

O procedimento mede a atividade de enzimas celulases em papel de filtro, expressando tal atividade como FPU (Filter-paper Units) por volume de enzima. O procedimento baseia-se em encontrar a concentração de uma solução da enzima de interesse que libere 2,0 mg de açúcares redutores a partir de 50 mg de papel de filtro Whatman nº 1 (conversão 4%) durante 60 minutos usando uma alíquota de 0,5 mL da solução de enzima.

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método colorimétrico DNS, descrito por Miller (1959). Este método baseia-se na redução, em meio alcalino, do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar redutor é oxidado a grupo carboxílico. O reagente DNS apresenta uma coloração alaranjada e ao misturar o reagente DNS com uma solução contendo açúcares redutores, ocorre desenvolvimento de uma coloração vermelha-alaranjado na solução, cuja absorbância no comprimento de onda 540 nm apresenta dependência linear com a concentração dos açúcares redutores.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 5g de ácido dinitro-3,5-salicílico em 100 mL de NaOH (2M). Misturou-se 150 g de tartarato de sódio e potássio em 250 mL de água destilada, sendo essa mistura aquecida até completa dissolução. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e completou-se o volume para 500 mL com água destilada. Por fim, aqueceu-se a solução de DNS em banho Maria a 40°C até total dissolução dos sólidos. O reagente foi filtrado e guardado em frasco âmbar para proteger da luz.

Para quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação construiu-se uma curva padrão de glicose vs. absorbância. Para a construção da curva de padrão, foi preparada uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL. Partindo dessa solução, foram produzidas outras 5 soluções padrão por meio de novas diluições em tampão citrato 50 mmol/L pH 4,8,

abrangendo na faixa de concentração 2,0; 3,3; 5,0; e 6,7 g.L⁻¹. As diluições foram feitas em triplicata.

Para a determinação da atividade enzimática FPU, foi preparada uma solução estoque de enzima diluída com tampão de citrato 50 mmol/L pH 4,8 na proporção 1:50. Partindo dessa solução, foram produzidas outras 3 soluções de enzima por meio de novas diluições em tampão citrato. As diluições foram feitas em triplicata.

Na sequência, foram organizados cinco conjuntos de tubos de Folin Wu. No conjunto 1, destinado à construção da curva padrão para quantificar os açúcares redutores, foi adicionado 1,0 mL de tampão de citrato. No conjunto 2, destinado à medida da atividade enzimática de cada solução de enzima, adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato e 0,5 mL de enzima diluída. No conjunto 3, denominado controle de enzima e destinado a identificar interferências advindas da enzima, foi adicionado 1,0 mL de tampão de citrato e 0,5 mL da enzima diluída. Para cada diluição de enzima foi preparado um controle com sua respectiva diluição. No conjunto 4, denominado controle de substrato e destinado a identificar interferências advindas do substrato, adicionaram-se 1,5 mL de tampão de citrato. Por fim, no conjunto 5, denominado branco do espectro e destinado a servir como referência na análise espectrofotométrica, foram adicionados 1,5 mL de tampão de citrato.

Na sequência, os tubos foram colocados em um shaker agitado (Marconi MA-832) a 50 °C e, depois de atingido equilíbrio térmico, foram adicionados 0,5 mL dos padrões de glicose em cada tubo do conjunto 1 e uma tira de papel filtro Whatman nº1, de dimensão equivalente a 50 mg (aproximadamente 1,0 x 6,0 cm), em cada tubo do conjunto 2 de forma que a tira ficasse totalmente submersa em solução.

Em resumo, os conjuntos de tubos foram preparados da seguinte maneira:

Conjunto 1 - Padrões de glicose: 1,0 mL de tampão + 0,5 mL de padrão de glicose.

Conjunto 2 - Amostras: 1,0 mL de tampão + 0,5 mL de solução de enzima + papel de filtro;

Conjunto 3 – Branco da enzima: 1,0 mL de solução tampão + 0,5 mL de solução de enzima;

Conjunto 4 – Branco do substrato: 1,5 mL de solução tampão + papel de filtro;

Conjunto 5 - Branco do espectro: 1,5 mL de solução tampão;

Cada conjunto permaneceu incubado em banho termostático a 50 °C por exatamente 60 min depois de atingido equilíbrio térmico. Após o término do tempo de incubação adicionou-se 3,0 mL de reagente de DNS, agitou-se e colocou os tubos em banho fervente por 5 minutos, para desativação da enzima. Em seguida os tubos foram colocados em banho de gelo até

atingirem temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se água até o menisco de 25mL do tubo e agitou-se até completa homogeneização. As amostras então foram conduzidas para medida de absorvância em comprimento de onda 540 nm em espectrofotômetro (modelo 2000, Pharmacia Biotech).

Com os dados obtidos pela leitura da absorvância da curva padrão de glicose (conjunto1), foi possível traçar um gráfico linear da concentração de açúcar redutor em função da absorvância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas. Com a equação obtida através da curva de padrão de glicose foi possível determinar a concentração de glicose liberada após os ensaios de hidrólise do papel filtro (conjunto 2). Em seguida, estimou-se a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg de glicose relacionando a quantidade de glicose liberada em 0,5 mL vs. logaritmo da concentração volumétrica de enzima ($\text{mL}_{\text{enz}}/\text{mL}$).

Com o valor de concentração e enzima obtido, calculou-se a atividade enzimática de acordo com a equação 15.

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{[\text{concentração de enzima que libera 2,0 mg de glicose}]} \text{ unidades} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (15)$$

O numerador 0,37 na equação 15 é derivado do fator de conversão de exatamente 2,0 mg de glicose (= 2,0/0,18016 mol) por 0,5 mL de solução de enzima diluída em 60 minutos de reação.

3.4.2 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase

Para a determinação da atividade de celobiase, seguiu-se o procedimento recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987). O procedimento tem como objetivo medir a atividade da β -glicosidase em uma solução de celobiose 15 mmol/L, expressando tal atividade como CBU (Cellobiose Units) por volume de enzima.

Para a quantificação de glicose liberada após hidrólise da celobiose, fui utilizado um kit enzimático (GOD-PAP) pronto para uso e também uma solução estoque de glicose 10 g/L. A absorvância produzida pela reação apresenta dependência linear com a concentração de glicose até 500 mg/dL. Assim, para a construção da curva padrão, foi preparada uma solução padrão de glicose 4,0 mg/mL. Partindo dessa solução, diferentes diluições foram realizadas utilizando tampão citrato: 4, 3, 2, 1 g/L. As diluições foram feitas em triplicata. Para a construção da curva padrão de glicose em eppendorfs, foram adicionados 10 uL de amostra e 1

mL de reagente. A mistura foi então aquecida em banho termostático a 37°C durante 10 minutos, para que houvesse a completa reação de oxidação enzimática da glicose (desenvolvimento de coloração rosada). Ao término da reação foi efetuada a leitura da absorbância no espectrofotômetro (modelo 2000, Pharmacia Biotech) a 505 nm. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado como “branco” apenas 1 mL de reagente.

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução do complexo enzimático Cellic[®]CTec-2 de diluição 1:1000 e foram feitas 4 novas diluições em tampão citrato 50 mmol/L pH 4,8. Foram organizados quatro conjuntos de tubos de ensaio. No conjunto 1, destinado à medida da atividade enzimática de cada solução de enzima, adicionou-se 1,0 mL de solução da enzima diluída. No conjunto 2, denominado controle de substrato e destinado a identificar interferências advindas do substrato, adicionou-se 1,0 mL de tampão de citrato. No conjunto 3, denominado controle de enzima e destinado a identificar interferências advindas da enzima, foi adicionado 1,0 mL de solução de enzima diluída e 1,0 mL de tampão citrato. No conjunto 4, denominado branco de reagente e destinado a servir como referência na análise espectrofotométrica, foram adicionados 2,0 mL de tampão de citrato. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50 °C e, depois de atingido o equilíbrio térmico (cerca de 15 min), foi adicionado 1,0 mL da solução de celobiose 15 mmol/L nos tubos dos conjuntos 1 e 2.

Em resumo, o conteúdo dos tubos ficou conforme descrito a seguir:

Conjunto 1 - Tubos de hidrólise: 1,0 mL de enzima diluída + 1,0 mL de solução de celobiose;

Conjunto 2 - Controle de substrato: 1,0 mL de tampão + 1,0 mL de solução de celobiose;

Conjunto 3 - Controle de enzima: 1,0 mL de tampão + 1,0 mL de enzima diluída;

Conjunto 4 - Branco espectro: 2,0 mL de tampão;

Cada conjunto foi incubado em banho termostático a 50 °C por 30 minutos. Após o término da reação, os tubos foram imersos em um banho fervente por exatamente 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo.

Para a determinação da glicose, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada tubo e aclimatadas em banho a 37 °C por 10 minutos. Depois de atingido o equilíbrio térmico, foi adicionado 1,0 mL do reagente GOD-PAP e iniciou-se uma nova incubação, dessa vez por exatamente 10 min. Com o término do tempo de reação, cada tubo foi removido do banho e conduzido para leitura de absorbância no comprimento de onda 505 nm em espectrofotômetro.

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de açúcar redutor (mg/2,0-mL) em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas. Com a equação obtida através da curva de padrão de glicose foi possível determinar a concentração de glicose liberada após os ensaios de hidrólise da celulose (conjunto 1). Em seguida, estimou-se a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose relacionando a quantidade de glicose liberada em 2,0 mL vs. logaritmo da concentração volumétrica de enzima (mLenz/mL).

Com o valor de concentração e enzima obtido, calculou-se a atividade enzimática de acordo com a equação 16:

$$\text{CBU} = \frac{0,0926}{[\text{concentração de enzima que libera 1,0 mg de glicose}]} \text{ unidades} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (16)$$

O numerador 0,0926 na equação 16 é derivado do fator de conversão de exatamente 1,0 mg de glicose (= 0,5/0,18016 mol) por 1,0 mL de solução de enzima diluída em 30 minutos de reação.

3.4.3 Determinação da atividade enzimática da xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada seguindo as diretrizes da IUPAC, descritas por Bailey, Biely e Poutanen (1992), por meio do cálculo da velocidade inicial da hidrólise da xilana catalisada por uma quantidade conhecida de enzima.

Para isso, foi adicionado 9,9 mL de solução 1% (m: v) de xilana de bétula ao reator de 20 mL encamisado a 50°C com agitação mecânica. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL do complexo enzimático diluído em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5 (1:100). As alíquotas foram retiradas a cada 2 minutos a partir do tempo zero até completarem 10 minutos de reação. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método colorimétrico DNS, segundo a metodologia descrita no item 3.4.1. Uma unidade de atividade (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μmol xilose por minuto sob as condições testadas.

3.4.4 Determinação de proteínas

A quantidade de proteína no complexo enzimático Cellic[®]CTec2 foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976). A análise consiste na interação do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 com as macromoléculas de proteína, que estabiliza a forma aniônica do corante, resultando em uma visível mudança de coloração inicialmente castanho para tons de azul, de acordo com a concentração de proteína.

Para a quantificação foi utilizado um reagente comercial de Bradford (Sigma Aldrich). A concentração proteica total presente no complexo enzimático foi expressa utilizando a albumina de soro bovino (Sigma Aldrich) como padrão. Para isso, foi feita a curva analítica de calibração na faixa de concentração entre 0,2 a 1 mg.mL⁻¹. Para as medidas espectrofotométricas, pipetaram-se, em eppendorf, 25 µL de padrão e 1 mL do reagente de Bradford. Após 5 min ± 20 s, a absorbância da solução resultante foi medida no comprimento de onda 595 nm em espectrofotômetro. Após as leituras, obteve-se uma equação relacionando concentração de proteína (mg/mL) e absorbância por meio do ajuste linear dos dados. Com a equação da curva padrão, a quantidade de proteína do complexo enzimático foi determinada seguindo o mesmo procedimento realizado para as curvas padrão.

3.5 Hidrólise enzimática das amostras de palha pré-tratada

3.5.1 Hidrólise enzimática em frascos de Erlenmeyers

Amostras de biomassa pré-tratadas hidrotérmicamente foram submetidas à hidrólise enzimática. A biomassa pré-tratada juntamente com o tampão citrato (50 mM, pH 4,8) foram adicionados a frascos Erlenmeyers de 250 mL e transferidos para o *shaker* (50°C e 250 rpm) onde permaneceram por 30 min para atingir o equilíbrio térmico. Após esse período, as reações de hidrólise foram iniciadas pela adição de enzima. Para obter o perfil de concentração de açúcares em cada condição, foram realizados três ensaios: um ensaio de hidrólise realizado em duplicata, um ensaio como controle de substrato e um ensaio como controle de enzima. Nos ensaios de controle de substrato a massa do material ausente foi substituída pela mesma massa de tampão citrato e nos controles de enzima os volumes de enzima foram substituídos pelo mesmo volume de tampão. No decorrer dos ensaios, alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 1, 2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foram armazenados em NaOH 0,2M, na proporção 300 µL de amostra: 200 µL de NaOH, para inativação da enzima.

3.5.1.1 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes cargas de sólidos: comparação dos complexos enzimáticos Accellerase®1500 e Cellic®Ctec-2.

Nessa etapa foram avaliadas a influência da carga de sólidos na hidrólise enzimática do BCA pré-tratado hidrotérmicamente (195°C, 10 min., 1/10 sól./líq., 200 rpm) e o desempenho de dois complexos enzimáticos comerciais. Para isso foram variadas as cargas de sólidos em 10, 15 e 20% ($m_{\text{bagaço seco}} / V_{\text{reação}}$). Manteve-se fixa a carga enzimática em 10 FPU/g_{bagaço}.

3.5.1.2 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

Para avaliar a eficiência da hidrólise enzimática na conversão de celulose em glicose para diferentes resíduos da cana-de-açúcar foram realizadas hidrólise com BCA e PCA pré-tratados hidrotérmicamente (195°C, 10 min., 1/10 sól./líq., 200 rpm), em concentração de substrato de 15% de sólidos (m/v), carga enzimática de 10 FPU/g_{biomassa}.

3.5.1.3 Avaliação do efeito de diferentes cargas de enzima na hidrólise

Para avaliar a influência da carga enzimática nos ensaios de hidrólise foram realizados experimentos variando a carga de enzima a 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa} mantendo-se uma carga de sólidos fixa em 15% ($m_{\text{palha seca}} / V_{\text{reacional}}$).

3.5.1.4 Avaliação do efeito de diferentes cargas de sólidos

Nessa etapa foi avaliada a influência da carga de sólidos na hidrólise enzimática. Para isso foram variadas as cargas de sólidos em 5, 10, 15 e 20% ($m_{\text{palha seca}} / V_{\text{reação}}$). Manteve-se fixa a carga enzimática tomando como base a melhor resposta obtida no estudo da influência da carga enzimática.

3.5.1.5 Avaliação do efeito de inibição pelo produto na etapa de hidrólise

Nessa etapa foram realizadas hidrólise com a adições de açúcares no início do ensaio. Foram fixadas as melhores condições de carga de enzima e de sólidos obtidas nas etapas anteriores a as adições de açúcares estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Condições experimentais empregadas nos experimentos de hidrólise enzimática.

	Efeito da inibição por produto				
	Carga de Enzima FPU/g_{biomassa}	Carga de sólidos %	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)
Condição 1	13	15	30	-	-
Condição 2	13	15	-	30	-
Condição 3	13	15	-	-	30
Condição 4	13	15	10	-	-
Condição 5	13	15	-	10	-
Condição 6	13	15	-	-	10
Condição 7	13	15	30	30	30
Condição 8	13	15	10	10	10

Tempo amostragem (h) - 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72

Outras condições: T=50°C, pH=4.8, 250 rpm.

3.6 Hidrólise enzimática em Reator de 50 mL e 3000 mL

No processo de hidrólise enzimática a celulose e a hemicelulose encontram-se na forma de substrato, portanto insolúvel em solução aquosa, desta forma as enzimas terão que ser adsorvidas para poderem reagir com a celulose. Assim, o processo enzimático é heterogêneo, portanto, os efeitos difusionais das enzimas são tão importantes quanto os efeitos cinéticos. Nesta etapa foram realizados experimentos com agitação provida por impelidores para verificar o efeito que uma melhor agitação ocasiona na hidrólise enzimática. Foram realizadas hidrólises em reator de vidro encamisado (50 mL de volume útil) com agitação provida por impelido de constituído de três pás planas nas seguintes condições: temperatura de 50°C, pH 4,8 (tampão

citrato de sódio 50 mM), agitação de 200 rpm, por 72 h. A carga de sólidos utilizada foi de 15 e 20% (m/v) e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa}

Foi realizado também um ensaio onde se utilizou reator de tanque agitado (volume útil de 3L), onde a agitação era provida por impelidor conectado ao eixo ligado a motor de indução trifásico de alto rendimento (Voges, modelo ARB71A6 - E2260) montado na tampa do reator. A temperatura da reação foi controlada por banho ultratermostato (Ethik Technology, modelo 521-2D). O impelidor empregado foi do tipo “orelha de elefante” (*elephant ear*), na configuração EEDP – EEUP (*elephant ear down-pumping e up-pumping*). Os ensaios foram realizados em um volume total de 3L de reação, em 470 rpm, solução tampão citrato (50mM, pH 4,8) em temperatura controlada de $(50,0 \pm 1,0)$ °C por período de 72 horas. Os experimentos foram realizados com cargas de sólidos de 10% (mv) e 20 FPU/g_{celulose}.

3.7 Quantificação de açúcares nos experimentos de hidrólise

Nos experimentos de hidrólise as concentrações de glicose, celobiose e xilose ao longo do processo foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se a coluna Aminex HPX87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Technologies Ltd) conforme descrito anteriormente no item 3.2.6.

Para os cálculos da glicose equivalente e conversão dos carboidratos foram utilizadas as equações 17 e 18 respectivamente.

$$\text{Glicose}_{\text{equivalente}} = [\text{Glic}] + 1,0526 \cdot [\text{Celob}] \quad (17)$$

Onde: **[Glic]** – concentração de glicose (g.L⁻¹)

[Celob] – concentração de celobiose (g.L⁻¹)

$$\text{Conversão de carboidratos (\%)} = \left(\frac{\text{Carboidratos no hidrolisado (g)}}{\text{Carboidrato na palha pré-tratada (g)}} \right) \cdot 100\% \quad (18)$$

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2

Antes de iniciar os experimentos de hidrólise, foi realizada a caracterização do complexo enzimático, conforme descrito no item 3.4 (Determinação das Atividades Enzimáticas).

4.1.1 Determinação de proteínas

Primeiramente foi determinada a quantidade de proteína do complexo enzimático, conforme descrito no item 3.4.4 (Determinação de Proteínas).

O valor de proteína obtido pelo método de Bradford para o complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2 foi de 88,82 mg.mL⁻¹.

4.1.2 Determinação da atividade celulase (Filter Paper Activity)

A hidrólise da celulose em seus oligossacarídeos e glicose é catalisada por um complexo de enzimas chamadas celulasas (endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidases), que agem em sinergismo para atacar diferentes partes da fibra de celulose (Ghose, 1987). Nessa etapa foi determinada a atividade enzimática total das celulasas, contidas no complexo enzimático utilizado neste trabalho, conforme descrito no item 3.4.1.

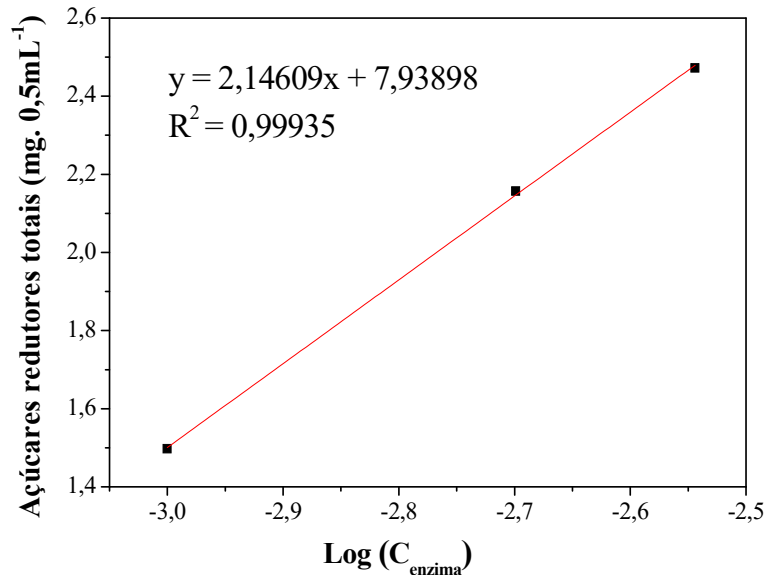
A Tabela 4.1 relaciona as diluições da enzima, suas respectivas concentrações, assim como a massa de glicose liberada durante a reação.

Tabela 4.1 – Valores das diluições das enzimas, suas respectivas concentrações e massa de glicose liberada por 0,5 mL de enzima nas diferentes diluições.

Diluição da enzima (x)	Concentração da enzima (mL _{enzima} /mL _{total})	Concentração de Glicose liberada por 0,5 mL de enzima (mg/0,5mL)
1000	0,00100	1,497 ± 0,028
500	0,00200	2,155 ± 0,001
350	0,00286	2,472 ± 0,049

A Figura 4.1 apresenta o comportamento da enzima celulase para a determinação da atividade enzimática com base nos dados da Tabela 4.1.

Figura 4.1 – Concentração de glicose liberada por 0,5 mL de enzima diluída em função do log da concentração de enzima.



Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade de enzima celulase baseia-se na liberação de 2,0 mg de glicose, isto é, (2,0/0,18016 μmol) por 0,5 mL de solução de enzima diluída em 60 minutos de reação. Desta forma com a equação da reta obtida na Figura 4.1, foi possível determinar a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg de glicose.

$$ART = 2,14609 \cdot \log C_{enz} + 7,93898$$

Onde: ART = açúcares redutores totais (mg/0,5 mL)

C_{enz} = concentração de enzima (mL_{enz}/mL)

$$\text{Logo: } C_{enz} = 10^{\left(\frac{ART - 7,93898}{2,14609}\right)}$$

$$C_{enz} = 0,001709$$

Finalmente com o valor da concentração que libera exatamente 2,0 mg de glicose em 60 minutos, calculou-se a atividade do complexo enzimático a partir da equação 15.

$$FPU = \frac{0,37}{0,001709} \text{ unidades} \cdot \text{mL}^{-1} = 216,55 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Utilizando o valor de obtido de proteína na enzima, determinado previamente, 88,82 mg/mL, obteve-se que a atividade específica do complexo enzimático Cellic®Ctec-2, em unidades de atividade de papel de filtro por massa de proteína é 2,44 FPU/mg_{proteína}.

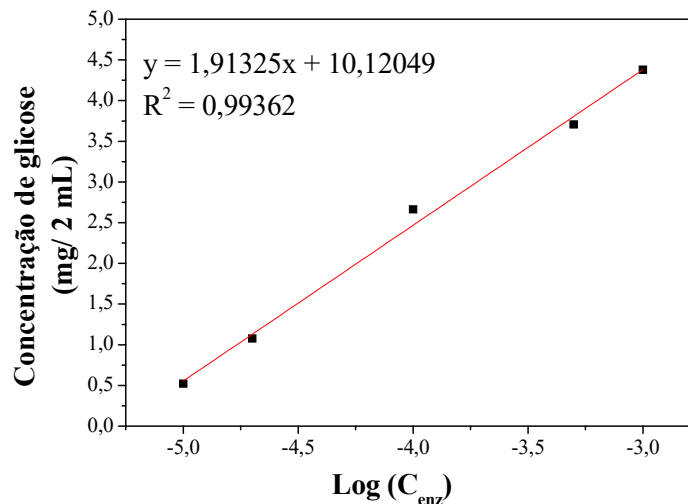
A partir do valor obtido para a atividade do complexo enzimático, foi possível calcular o volume necessário de enzima a ser utilizada nos experimentos de hidrólise.

4.1.3 Determinação da atividade enzimática da β -glicosidase

A atividade da enzima β -glicosidase foi determinada em triplicata de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2. A liberação de glicose em função do logaritmo da concentração de enzima pode ser observada na Figura 4.2.

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade β -glicosidase (CBU) baseia-se na liberação de 0,5 mg de celobiose, isto é, (0,5/0,18016 μ mol) que representa a produção de exatamente 1,0 mg de glicose, por 1 mL de enzima em 30 minutos.

Figura 4.2 – Concentração de glicose liberada por 2 mL de enzima diluída em função do logaritmo da concentração de enzima.



Desta forma com a equação da reta obtida na Figura 4.2, foi possível determinar a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose.

$$\text{Glic} = 1,91325 \cdot \text{Log } C_{\text{enz}} + 10,12049$$

Onde: Glic = glicose liberada (mg/2,0 mL)

C_{enz} = concentração de enzima (mL_{enz}/mL)

$$\text{Logo: } C_{enz} = 10^{\left(\frac{Glic-10,12049}{1,91325}\right)}$$

$$C_{enz} = 1,71 \cdot 10^{-5} \text{ mL}_{enz}/mL$$

Finalmente com o valor da concentração que libera exatamente 1,0 mg de glicose em 30 minutos, calculou-se a atividade do complexo enzimático a partir da equação 16:

$$CBU = \frac{0,0926}{1,71 \cdot 10^{-5}} \text{ unidades} \cdot mL^{-1} = 5415,33 \text{ CBU} \cdot mL^{-1}$$

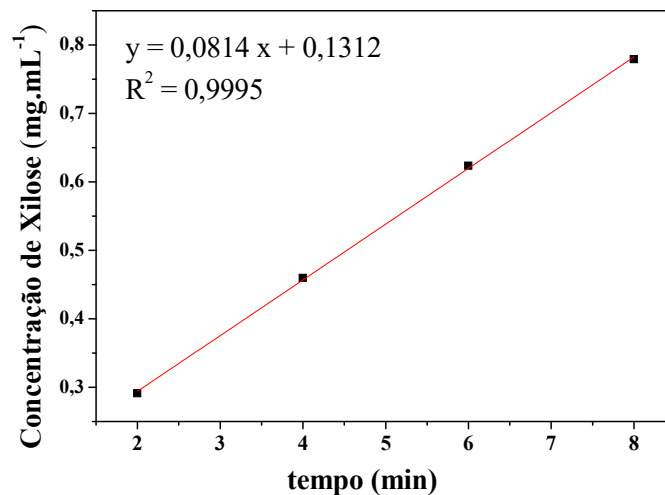
Utilizando o valor de proteína na enzima determinado previamente, 88,82 mg/mL, obteve-se que a atividade específica do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2 em unidades de CBU por massa de proteína é 60,97 CBU/mg_{proteína}.

4.1.4 Determinação da atividade enzimática da xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada em triplicata de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.3. A liberação de xilose em função do tempo pode ser observada na Figura 4.3.

Segundo Ghose (1987), uma (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol xilose por minuto sob as condições testadas.

Figura 4.3 – Concentração de xilose em função do tempo de reação.



A partir da equação da reta obtida na Figura 4.3 foi possível calcular a atividade da xilanase a partir da equação abaixo:

$$UI/mL = \left(\frac{dP}{dt} \cdot dil \cdot V_r \right) / (MM \cdot V_{enz})$$

Onde: $\frac{dP}{dt}$ = coeficiente angular da reta

dil = diluição da amostra

V_r = volume reacional

MM = massa molecular xilose

V_{enz} = volume de enzima

$$UI/mL = \frac{(0,0814 \cdot 100 \cdot 10)}{(0,15013 \cdot 0,1)} = 5421,97 \text{ UI} \cdot mL^{-1}$$

Utilizando o valor de proteína na enzima determinado previamente, 88,82 mg/mL, obteve-se que a atividade específica do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2 em unidades de UI por massa de proteína é 61,04 UI/mg_{proteína}.

A Tabela 4.2 apresentada a caracterização do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2 utilizado neste trabalho.

Tabela 4.2 – Caracterização do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2.

Cellic[®]Ctec-2	
Atividade em papel filtro (FPU.mL ⁻¹)*	216,55
Atividade da β-glicosidase (CBU.mL ⁻¹)**	5415,33
Atividade de xilanase (UI. mL ⁻¹)	5421,97

Expressas segundo definição de Ghose (1987): * 4 mg_{glicose}/mL_{enzima}

** 1 mg_{glicose}/mL_{enzima}

Como era esperado o complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2 apresentou atividade enzimática de celulase alta e similar ao reportado por Mendes et al. (2014). A Cellic[®]Ctec-2 se caracteriza por apresentar um melhor desempenho na hidrólise enzimática com altas concentrações de sólidos, por apresentar em sua constituição enzimas oxidativas, as

monooxigenases líticas de polissacarídeos (celulases AA9, anteriormente conhecidas como GH61), alta carga de β -glicosidase e hemicelulase (SUN et al., 2016; JORGENSEN; CANNELLA, 2013).

4.2 Estudos preliminares

4.2.1 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em diferentes cargas de sólidos: comparação dos complexos enzimáticos Accellerase[®]1500 e Cellic[®]Ctec-2

O objetivo dessa etapa foi fazer uma avaliação preliminar do efeito da carga de sólidos na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e comparar a eficiência de dois complexos enzimáticos comerciais a Cellic[®]Ctec-2 e a Accellerase[®]1500, com atividade 74 FPU.mL⁻¹ (SILVA, 2015). Estudos anteriores investigaram vários complexos enzimáticos comerciais dentre eles a Cellic[®]Ctec-2, Accellerase[®]1500, Cytolase CL e a Novozyme 188[®], utilizando substratos de referência, com características controladas, em geral a Cellic[®]Ctec-2 apresentou capacidade de sacarificação mais elevada em todos os substratos testados na mesma carga de proteína em comparação com os demais complexos (JU et al., 2014).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi submetido inicialmente à um pré-tratamento hidrotérmico (PTH) na proporção 1:10 (m_{palha seca}/m_{água}), sendo submetida a 195°C/10 minutos e 200 rpm. As condições operacionais utilizadas no pré-tratamento hidrotérmico do BCA nesta etapa foram previamente determinadas pelo grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, sendo elas consideradas como as melhores condições de trabalho para o pré-tratamento hidrotérmico do BCA. A Tabela 4.3 apresenta a caracterização química das amostras de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) antes e após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico.

Os resultados após o pré-tratamento como esperado, indicam uma eficiente remoção de hemicelulose (85,5%) com pequena remoção de celulose e lignina de 9,6 e 19,3% respectivamente. O pré-tratamento hidrotérmico se caracteriza por causar alterações estruturais na fração de lignina e celulose além de uma eficiente solubilização de grande parte da hemicelulose, com pouca perda/remoção de celulose e lignina (ALVIRA et al.; 2010) o que contribui para a ação das enzimas celulolíticas uma vez que essas estruturas formam uma barreira física ao redor da celulose dificultando o acesso das enzimas (DIAZ et al., 2010).

Tabela 4.3 – Caracterização química do BCA antes e após pré-tratamento e perda/solubilização dos componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Componente	Bagaço “<i>in natura</i>” (%) **	195°C/10 min (%)	Perda/Remoção (%)
Celulose	40,8	61,2	9,4
Hemicelulose	24,5	5,9	85,5
Lignina	23,2	31,0	19,3
Cinzas	5,4	1,2	86,6
Extrativos	5,7	-	-
Total	99,6	99,3	-

** Fonte: Silva, 2015.

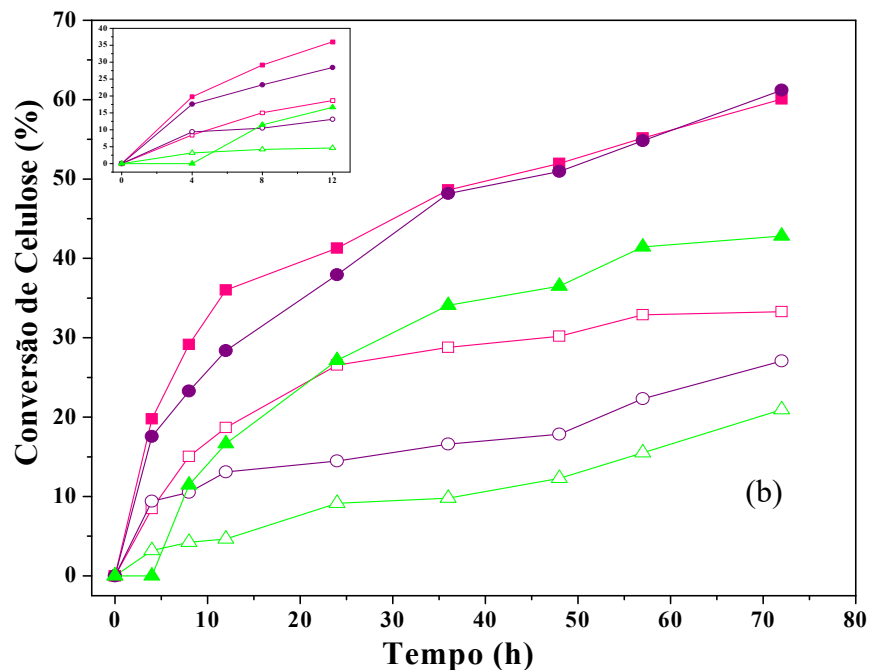
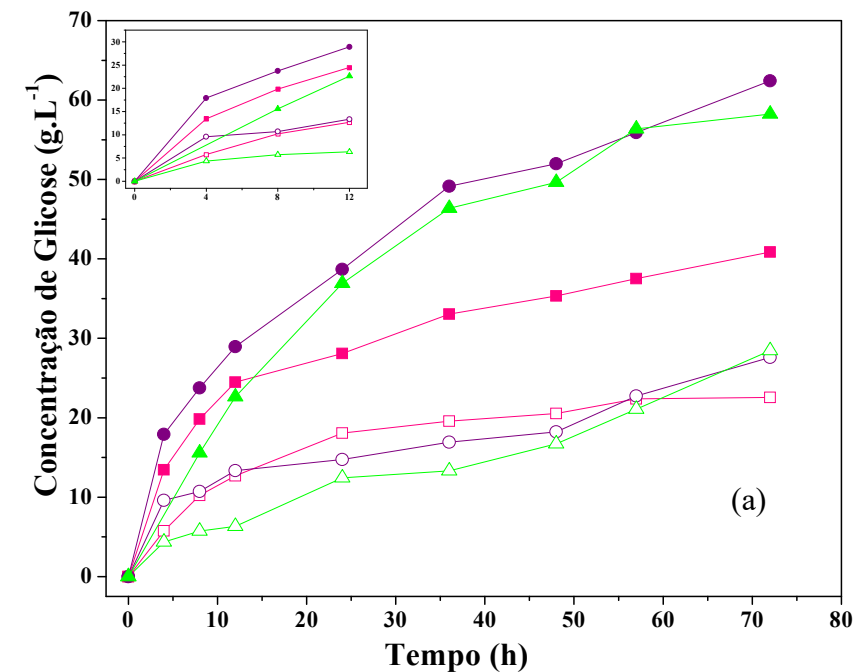
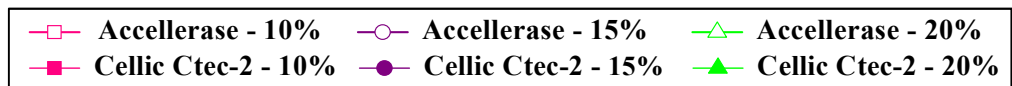
Os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise para as diferentes cargas de sólidos e ambos os complexos enzimáticos avaliados são apresentados na Figura 4.4(a). Observa-se durante a hidrólise enzimática do bagaço PTH um perfil típico de concentração de glicose. Há um rápido aumento da concentração de glicose no início do processo até 10 horas de reação, seguida de uma diminuição da taxa de produção de glicose. A influência da carga de sólidos na velocidade inicial de hidrólise é observada para os dois complexos enzimáticos avaliados. Os experimentos realizados com 15% de carga de sólidos apresentaram maiores velocidades iniciais de reação (observado pelo rápido aumento da concentração de glicose nas primeiras 10 horas de reação) para os dois complexos enzimáticos. Já para os experimentos com carga de sólidos de 20%, observou-se velocidades inferiores as demais cargas nas 10 primeiras horas para ambos complexos enzimáticos.

Foram obtidas para as cargas de sólido de 10%, 15% e 20% as concentrações finais de glicose de 22,6, 27,6, 28,5 g/L, respectivamente, utilizando a Accellerase[®]1500 e 40,9, 62,4 e 58,2 g/L, respectivamente, quando se utilizou a Cellic[®]Ctec-2, demonstrando assim uma melhor eficiência do complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2. Pode-se observar também pelos resultados obtidos que o aumento na carga de sólidos ocasionou um aumento na concentração final de glicose demonstrando um comportamento aproximadamente linear para a Accellerase[®]1500.

Esse comportamento pode ser melhor observado na Figura 4.5(a). Comportamento semelhante foi observado por López-Linares et al. (2014) em experimentos com palha de colza e por Ramachandriya et al. (2013) em experimentos utilizando do como substrato cedro vermelho oriental (espécie de coníferas). Por outro lado, a Cellic[®]Ctec-2 apresentou

comportamento diferente, quando aumentada a carga de sólido de 15 para 20% a concentração de glicose diminuiu

Figura 4.4 – Perfil de concentração de glicose em g.L^{-1} (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (10%, 15% e 20%) de BCA submetido a PTH (195°C-10 min.) utilizando os complexos enzimáticos Accellerase[®] 1500 e Cellic[®] Ctec-2. Carga enzimática: 10 FPU. $\text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



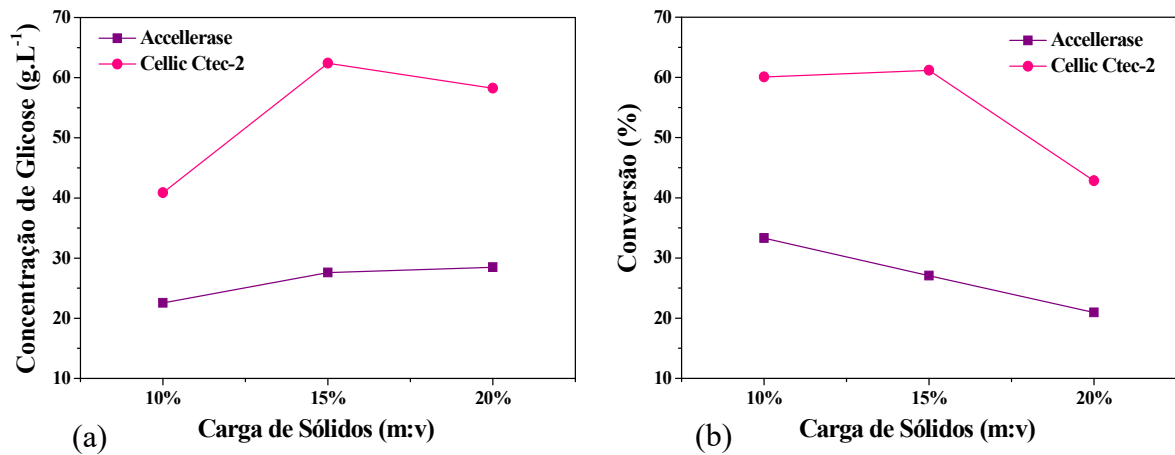
A Figura 4.4(b) ilustra a conversão de celulose em glicose ao longo de 72 horas de hidrólise. Pode se observar uma redução na conversão com o aumento da carga de sólidos. Esse comportamento foi observado por vários autores utilizando diferentes biomassas (López-Linares et al., 2014; Kristensen, et al., 2009; Ramachandriya, et al., 2013 e Cara et al., 2007).

O aumento da carga de sólidos de 10 para 20% (m/v) levou a uma redução na conversão enzimática de 37 e 29% para os complexos enzimáticos Accelerase[®]1500 e Cellic[®]Ctec-2, respectivamente. Vários fatores podem contribuir para redução da capacidade de conversão pela enzima. Citam-se, entre eles, a inibição da enzima pelos produtos formados (glicose e celobiose), as alterações no substrato e as limitações de transferência de massa (Manazares et al., 2011). Porém com a utilização da Cellic[®]Ctec-2 possibilitou uma melhor conversão com o aumento da carga de sólidos de 10 para 15%, com um aumento em relação a concentração de glicose liberada mais expressiva de cerca de 35%. O aumento da carga de substrato é importante a fim de se obter concentrações mais elevadas de açúcares no hidrolisado (Wang et al., 2012; Puri et al., 2013). Esse fator é importante para se obter na etapa de fermentação vinhos com maior teor de etanol, o que reduz o consumo de energia na etapa de destilação (Modenbach e Nokes, 2013).

Uma possível explicação para que o aumento da carga de sólido para 20% não ter apresentado uma maior conversão é que esteja ocorrendo limitação por transferência de massa. Ramachandriya et al. (2013) observaram que a adição de esferas ao meio reacional para uma melhor mistura do meio reacional apresentou uma maior conversão da celulose em glicose em experimentos com cargas de sólidos de 16 e 20% utilizando a Accelerase[®]1500.

O efeito da carga de sólidos na concentração de glicose liberada e na conversão após 72 horas de hidrólise são apresentados na Figura 4.5(a) e (b), respectivamente. De maneira geral observa-se que os melhores valores tanto de concentração de glicose liberada quanto de conversão são obtidos utilizando-se o complexo enzimático Cellic[®]Ctec-2. Os resultados obtidos nesta etapa para a hidrólise do BCA utilizando os dois complexos enzimáticos são semelhantes aos resultados encontrados na literatura para outras biomassas. Mendes et al. (2014) utilizando lodo oriundo do tratamento de efluente de uma indústria de celulose obtiveram uma conversão de celulose em 24 horas de 79% com a Cellic[®]Ctec-2 e de 74% utilizando a Accelerase[®]1500 nas mesmas condições. Kawai et al. (2012) avaliaram a hidrólise de diferentes biomassas lignocelulósicas dentre elas o *Erianthus* (gramínea) após pré-tratamento hidrotérmico e o eucalipto após pré-tratamento com H₂SO₄ e obtiveram conversões cerca de 17% maiores para ambas hidrólises com a Cellic[®]Ctec-2 em relação as hidrólises utilizando Accelerase[®]1500.

Figura 4.5 – Concentração de glicose (a) e conversão da celulose em glicose (b) em função da carga de sólido (10%, 15% e 20%) após 72 horas de hidrólise do BCA para os complexos enzimáticos Accellerase® 1500 e Cellic® Ctec-2.



4.2.2 Estudo preliminar da hidrólise do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

Os resíduos lignocelulósicos apresentam como componentes principais celulose, hemicelulose e lignina. A distribuição destes componentes depende não apenas da natureza do vegetal como também das condições de crescimento, idade de colheita e parte da planta escolhida (OGEDA; PETRI, 2010; GAN et al., 2003). A composição bioquímica da biomassa tem efeito direto no custo de produção do etanol uma vez que influencia nos rendimentos das etapas de produção e no rendimento final de etanol (HAMELINCK et al., 2005). Diante disso foi realizado nessa etapa um estudo preliminar onde se comparou a eficiência da hidrólise enzimática na conversão da celulose em glicose para diferentes resíduos da cana-de-açúcar. As biomassas estudadas nesta etapa foram o BCA e a palha da cana-de-açúcar (PCA) pré-tratadas hidrotérmicamente (PTH) na proporção 1:10 ($m_{\text{palha seca}}/m_{\text{água}}$), sendo submetida a 195°C/10 minutos e 200 rpm.

A Tabela 4.4 apresenta a caracterização química das amostras do BCA e da PCA antes e após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico e a remoção de seus componentes. Com relação a composição “in natura” das biomassas pode-se notar uma maior diferença no teor de celulose obtidos de 40,8 e 33,1% para o BCA e a PCA respectivamente. Por outro lado, o teor de hemicelulose em ambos materiais apresentaram valores semelhantes de 24,5 e 26,2% respectivamente para o BCA e a PCA. Com relação ao teor de lignina obtido foi cerca de 22% maior no BCA em relação a PCA.

Tabela 4.4 – Caracterização química do BCA e da PCA antes e após pré-tratamento e perda/solubilização dos componentes das amostras de bagaço de cana-de-açúcar.

Componente	BCA “ <i>in natura</i> ” ** (%)	BCA PTH (%)	Perda/ Remoção (%)	PCA “ <i>in natura</i> ” (%)	PCA PTH (%)	Perda/ Remoção (%)
Celulose	40,8	61,2	9,4	33,1	58,8	9,8
Hemicelulose	24,5	5,9	85,5	26,2	7,5	85,4
Lignina	23,2	31,0	19,3	18,2	28,9	19,4
Cinzas	5,4	1,2	-	6,2	5,5	-
Extrativos	5,7	-	-	15,3	-	-
Total	99,6	99,3	-	99,1	100,7	-

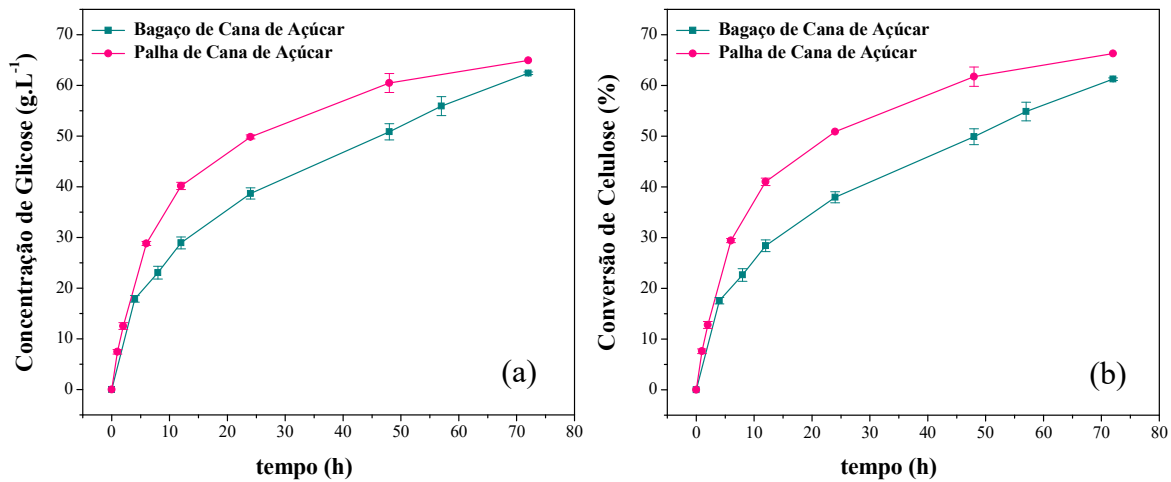
** Fonte: Silva (2015)

Após o PTH as diferenças em relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina foram menores para o BCA e a PCA o que indica que o pré-tratamento hidrotérmico aumentou a semelhança entre os materiais. Podemos observar também nos materiais estudados, um acréscimo da porcentagem de celulose e lignina após PTH, que é explicado pela eficiente remoção de hemicelulose de 85% para ambos materiais, evidenciando que o PTH atua preferencialmente na solubilização da hemicelulose. Levando-se em consideração a perda/remoção após PTH, dados apresentados na Tabela 4.4, observa-se que ambos materiais apresentaram remoções semelhantes de todos componentes, ou seja, tanto o BCA quanto a PCA apresentaram comportamentos semelhantes na etapa de pré-tratamento. A lignina apresentou uma remoção de cerca de 19% para ambos materiais, embora grande parte deste componente ser insolúvel em meio ácido constatou-se que existem fragmentos de lignina que são solubilizados no PTH.

Os resultados obtidos de concentração de glicose e conversão da celulose em glicose em função do tempo para as hidrólises do BCA e da PCA, em concentrações de substrato de 15% de sólidos (m/v), carga enzimática de $10 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8 e agitação de 250 rpm, são apresentados na Figura 4.6 (a) e (b), respectivamente.

Na Figura 4.6 (a) e (b) podemos observar que a PCA durante as primeiras 12 horas de hidrólise já apresentou um melhor rendimento de sacarificação enzimática em relação ao BCA, atingindo uma concentração de glicose de $40,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (conversão de 41,0%) em relação ao BCA que atingiu $28,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glicose (conversão de 28,4%).

Figura 4.6 – Perfil de concentração de glicose em g.L^{-1} (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para o BCA e a PCA pré-tratados hidrotérmicamente a 195°C -10 min. 15% de sólidos (m/v), 10 $\text{FPU.g}_{\text{biomassa}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



Após 72 horas a PCA atingiu $64,9 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose liberada (conversão de 66,3%) e o BCA $62,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (conversão de 61,2%). Estes resultados demonstram uma maior suscetibilidade da palha à conversão de celulose em glicose, quando comparado ao bagaço, visto que a PCA apresentou um menor teor de celulose. Uma possível explicação para maior conversão de celulose da PCA em relação ao BCA é devido a celulose da PCA ser mais acessível que no BCA devido as suas características morfológicas e distribuições das macromoléculas estruturais (celulose, hemicelulose e lignina) nas paredes celulares (MOUTTA et al., 2014).

O desempenho em termos de hidrólise bastante promissor apresentado pela palha de cana-de-açúcar mostrados nos resultados, além do fato de que há poucos trabalhos que avaliam a utilização dessa biomassa na produção de etanol, justifica a continuidade dos estudos com essa biomassa.

4.3 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar

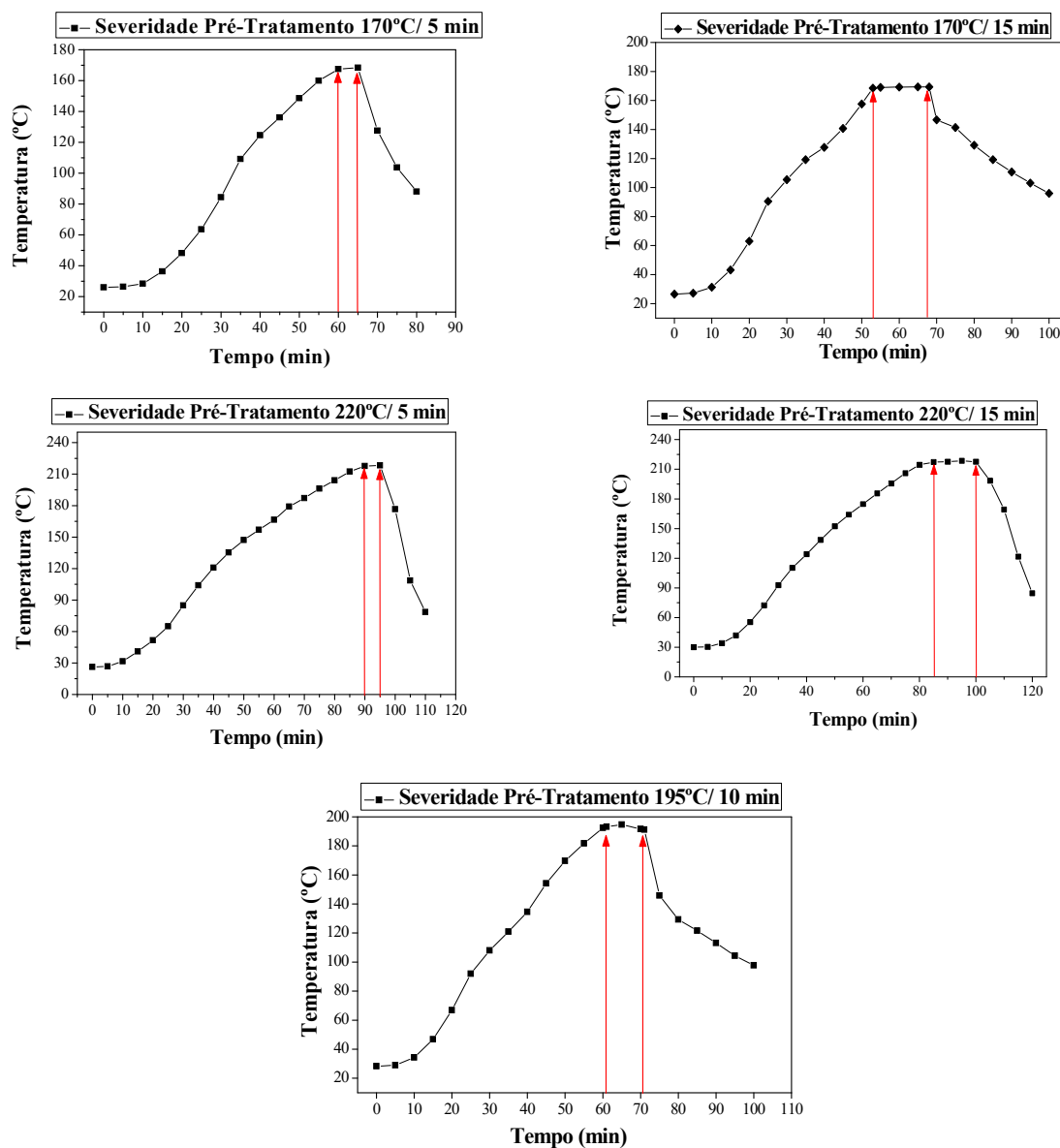
Nesta etapa estudou-se algumas condições de pré-tratamento hidrotérmico para a PCA baseando-se em trabalhos anteriores realizados com o bagaço de cana-de-açúcar (LASER et al., 2002; CRUZ et al., 2012; ZHUANG et al., 2015; SILVA, 2015). O objetivo dessa etapa foi verificar o efeito de algumas variáveis do pré-tratamento sobre a biomassa a fim de se obter um melhor fracionamento da biomassa e posterior eficiência na etapa de conversão enzimática da celulose em glicose.

4.3.1 Influência da temperatura e tempo de pré-tratamento

Nesta etapa foi estudado o efeito da temperatura e tempo durante o pré-tratamento hidrotérmico.

Na Figura 4.7 são mostradas as rampas de aquecimento até a temperatura de tratamento e o posterior resfriamento após o tempo de reação para cada condição estudada, com o propósito de se calcular o fator de severidade de cada condição de pré-tratamento avaliada.

Figura 4.7– Perfil da temperatura durante os ensaios de pré-tratamento da biomassa. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.



Na análise do perfil da rampa de aquecimento e resfriamento observa-se que os tempos de permanência na temperatura de tratamento foram mantidos durante o tempo requerido para as condições estudadas.

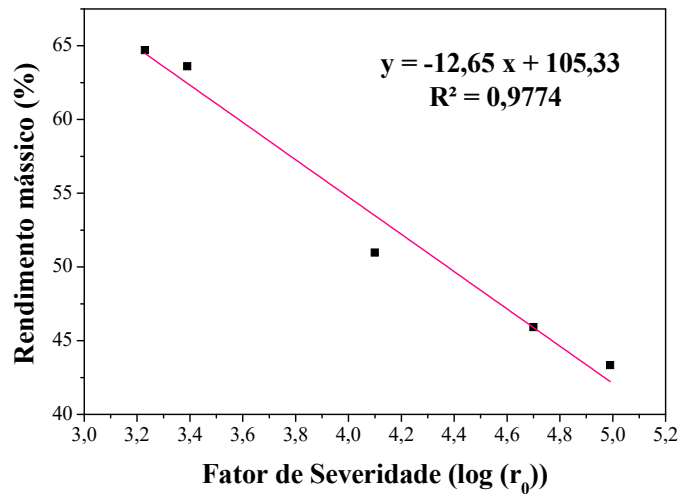
Na Tabela 4.5 são apresentados o fator de severidade (FS), rendimento mássico (R) e pH da fração líquida, no final do pré-tratamento para cada condição de pré-tratamento estudadas.

Tabela 4.5 – Fator de severidade (FS), rendimento mássico (R) e pH da fração líquida, no final do pré-tratamento para cada condição de pré-tratamento estudada.

	FS	R (%)	pH
170°C/ 5 min	3,23 ± 0,06	64,70	4,68 ± 0,08
170°C/ 15 min	3,39 ± 0,01	63,61	4,49 ± 0,00
195°C/ 10 min	4,10 ± 0,01	50,97	3,70 ± 0,14
220°C/ 5 min	4,70 ± 0,05	45,92	3,39 ± 0,01
220°C/ 15 min	4,99 ± 0,07	43,34	3,41 ± 0,02

Como se pode observar o rendimento mássico (massa de sólidos recuperada após o pré-tratamento) diminui com o aumento do grau de severidade. O aumento do grau de severidade de 3,23 para 4,70 apresentou uma diminuição do rendimento mássico de 64,70% para 45,92%. O menor rendimento mássico de 43,34% foi obtido na condição de pré-tratamento mais severa aplicada neste trabalho (FS = 4,99). Em geral pôde-se observar uma relação linear entre o grau de severidade e o rendimento mássico, conforme mostra a Figura 4.8. Esses resultados corroboram com Jiang et al. (2015) que constataram que o aumento no fator de severidade de 2,77 para 4,34 acarretou em uma diminuição do rendimento mássico do PTH em 28%, utilizando haste de algodão.

Pode-se observar ainda pela Tabela 4.5 que a temperatura é um importante fator no PTH, apresentando um maior efeito no rendimento do processo quando comparada ao tempo de reação. O rendimento mássico é alterado de cerca de 64% para 45% com o aumento da temperatura de 170°C para 220°C, porém apresentam semelhanças quando variamos ao tempo de residência de 5 para 15 minutos para temperaturas fixas de 170 e 220°C. A diminuição do pH com o aumento do fator de severidade é explicada pela liberação de ácido acético e ácido fórmico (vide Tabela 4.6) com o aumento da temperatura que por sua vez atuam como catalisador no processo.

Figura 4.8 – Correlação entre rendimento mássico e fator de severidade ($\log(r_0)$).

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presentes na fração líquida ao final do pré-tratamento em cada condição estudada. Pode-se observar que as concentrações de ácido acético apresentaram um aumento significativo como o aumento da temperatura e tempo de residência do PTH. Efeito similar foi obtido por Yu et al. (2010) com palha de arroz variando a temperatura do PTH de 140-240 °C por 10 e 30 minutos e por Xião et al. (2013) aplicando temperaturas de 180-240 °C. O aumento da concentração de ácido acético com o aumento do fator de severidade é explicado pela degradação da hemicelulose uma vez que este é proveniente do grupo acetil da hemicelulose.

Tabela 4.6 – Concentração de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presente na fração líquida ao final de cada condição de PTH avaliada.

	Ácido glucurônico (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)
170°C/5 min	0,75 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,25 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
170°C/15 min	0,66 ± 0,07	0,33 ± 0,13	0,33 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00
195°C/10 min	4,07 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,98 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,86 ± 0,00
220°C/5 min	0,19 ± 0,04	1,09 ± 0,08	1,47 ± 0,15	0,64 ± 0,11	2,95 ± 0,25
220°C/15 min	0,10 ± 0,00	1,24 ± 0,04	1,59 ± 0,03	1,10 ± 0,02	2,43 ± 0,03

O teor de furfural e HMF apresentaram perfil similar ao do ácido acético aumentando com o aumento da temperatura e o tempo de residência. Ambos são provenientes da degradação

dos açúcares sendo o furfural (maiores concentrações) correspondente a degradação da xilose e arabinose e o HMF da glicose e galactose (YU et al., 2010). Segundo Hu e Ragauskas (2012) em condições de fator de severidade baixos a hemicelulose solubilizada é acumulada na fração líquida sob a forma de xilose ao passo que com o aumento do fator de severidade esta é parcialmente convertida em furfural. Desta forma a concentração de furfural tende a aumentar e de xilose tende a diminuir (Tabela 4.6) com o aumento da severidade do pré-tratamento conforme foi observado nos resultados obtidos nesse trabalho.

Com relação a concentração dos açúcares presentes na fração líquida ao final do pré-tratamento apresentados na Tabela 4.7 pode-se observar que de modo geral ela diminuiu com o aumento da temperatura.

Pode-se observar um aumento das concentrações dos açúcares com aumento do tempo de reação na temperatura de 170°C e posterior diminuição das concentrações com o aumento da temperatura e tempo. Esse efeito é explicado pela degradação destes açúcares em temperaturas acima de 170°C.

Tabela 4.7 – Concentração de açúcares presente na fração líquida ao final do PTH em cada condição avaliada.

	Celobiose (g.L⁻¹)	Glicose (g.L⁻¹)	Xilose (g.L⁻¹)	Arabinose (g.L⁻¹)
170°C/5 min	0,88 ± 0,04	2,56 ± 0,07	2,86 ± 0,07	1,07 ± 0,02
170°C/15 min	0,44 ± 0,50	4,25 ± 0,13	4,28 ± 0,20	1,31 ± 0,35
195°C/10 min	3,37 ± 0,01	1,32 ± 0,00	3,70 ± 0,00	1,75 ± 0,00
220°C/5 min	0,34 ± 0,02	0,62 ± 0,07	1,02 ± 0,09	0,12 ± 0,02
220°C/15 min	0,14 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,46 ± 0,17

Efeitos semelhante foram obtidos por Yu et al. (2010) que obtiveram um pico da concentração de xilose e arabinose em cerca de 180 °C seguido de um declínio das concentrações com o aumento da temperatura até 240°C, decorrente da degradação destes açúcares, estando de acordo com os dados obtidos de furfural, HMF e ácido acético obtidos com o aumento da temperatura.

A composição química da palha (fração sólida) para as diferentes condições de temperatura e tempo de residência avaliados é apresentada na Tabela 4.8. Com relação à

composição da palha *in natura* os dados obtidos são consistentes com os apresentados por Costa et al. (2013) e Silva et al. (2010).

Tabela 4.8 – Composição química (em porcentagem) da palha *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.

Componente	Palha “<i>in natura</i>” (%)	170°C/5 min (%)	170°C/15 min (%)	220°C/5 min (%)	220°C/15 min (%)	195°C/10 min (%)
Celulose	33,13 ± 0,37	43,63 ± 0,10	43,57 ± 0,09	56,74 ± 0,67	54,67 ± 0,02	58,84 ± 0,16
Hemicelulose	26,25 ± 0,33	27,24 ± 0,27	21,77 ± 1,21	2,02 ± 0,14	1,81 ± 0,05	7,52 ± 2,12
Lignina	18,21 ± 0,21	28,13 ± 0,96	27,00 ± 0,18	37,02 ± 0,32	36,88 ± 0,35	28,89 ± 0,67
Cinzas	6,21 ± 0,03	1,35 ± 0,08	1,09 ± 0,03	6,37 ± 0,16	8,74 ± 0,36	5,50 ± 0,03
Extrativos	15,31 ± 0,53	-	-	-	-	-
Total	99,11 ± 1,47	100,35 ± 1,41	93,42 ± 1,51	102,15 ± 1,29	102,10 ± 0,78	100,75 ± 2,98

Pode-se observar mais uma vez que a temperatura foi o fator mais relevante no PTH pois as variações na composição química da PCA foi mais acentuada com a variação da temperatura em relação a variação do tempo de residência. De maneira geral observa-se um acréscimo da porcentagem de celulose com o aumento do fator de severidade que pode ser explicado pela dissolução da hemicelulose e rearranjo ou migração da lignina na biomassa pré-tratada (ZAKARIA et al., 2015).

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.8 calculou-se a perda/solubilidade dos componentes das amostras de palha submetidas às diferentes condições de pré-tratamento (Tabela 4.9). O pré-tratamento realizado a 195°C por 10 min. promoveu a maior remoção de hemicelulose (85,58%) em relação aos PTH com 170°C para 5 e 15 minutos (14,8 e 16,4% respectivamente). Nesta condição obteve-se uma boa remoção de lignina (19,4%), com baixa perda de glicose (9,8%) perfil semelhante foi obtido por Oliveira et al. (2014) utilizando mesma condição de pré-tratamento hidrotérmico.

Apesar dos pré-tratamentos a 220°C terem apresentado maiores remoções de hemicelulose de 96 e 97%, respectivamente para 5 e 15 minutos, a perda de celulose foi cerca de 61% maior quando comparada ao pré-tratamento realizado a 195°C por 10 min. O pré-tratamento hidrotérmico caracteriza-se pela eficiente remoção da hemicelulose ao mesmo tempo que mantém a celulose na fração sólida. Com relação a lignina apesar de ocorrer a

alteração da sua estrutura, parte dela ser despolimerizada e solubilizada, ocorre a recondensação de componentes solúveis provenientes da lignina o que impossibilita a deslignificação completa da biomassa por PTH (ALVIRA et al., 2010). A remoção de hemicelulose e desestruturação da lignina facilita a ação das enzimas celulolíticas uma vez que essas estruturas formam uma barreira física ao redor da celulose dificultando o acesso das enzimas (VALLEJOS et al., 2015; DIAZ et al., 2010).

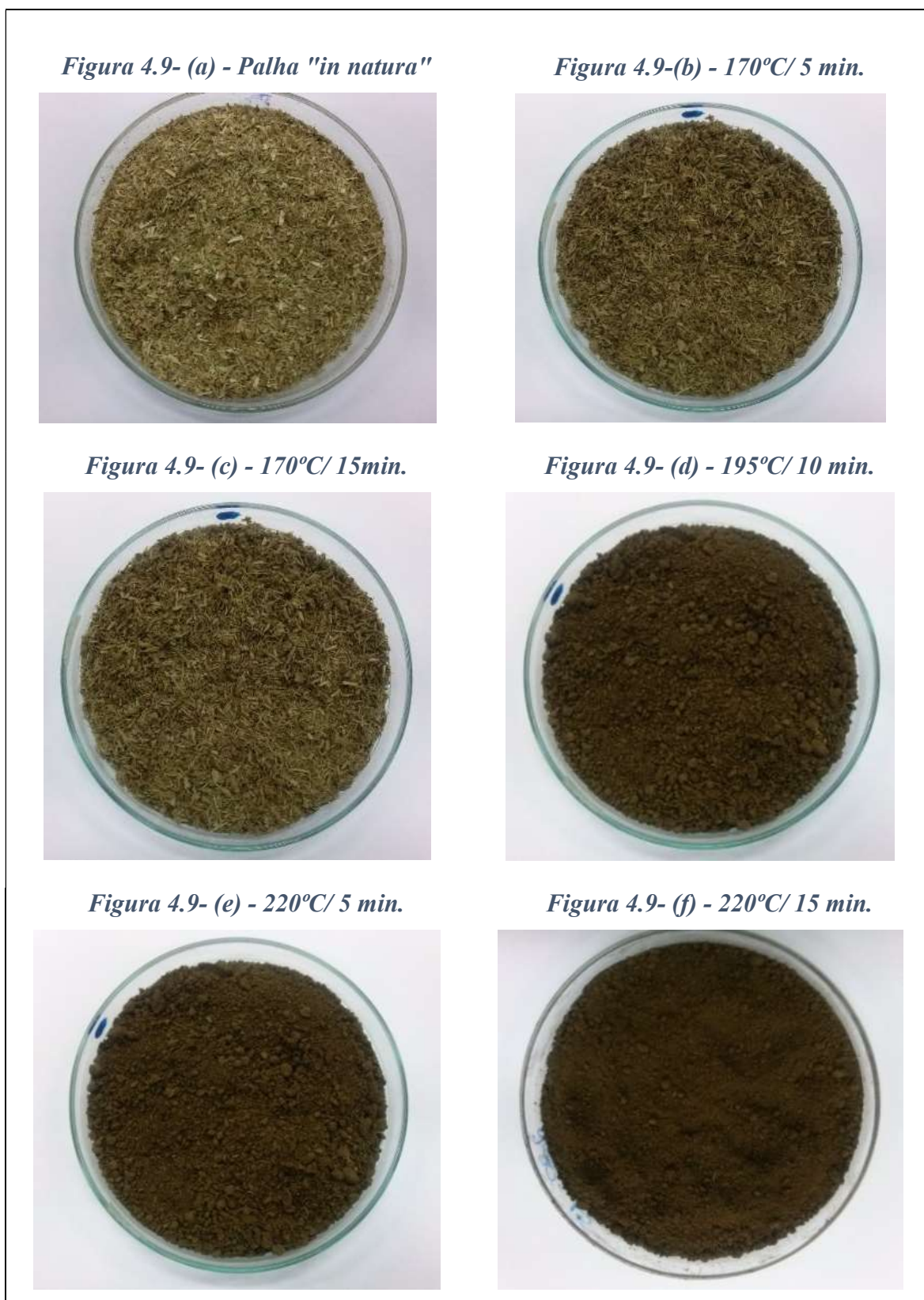
Tabela 4.9 – Perda/solubilização dos componentes das amostras de palha

Componente	170°C/5 min (%)	170°C/15 min (%)	195°C/10 min (%)	220°C/5 min (%)	220°C/15 min (%)
Celulose	14,79%	16,35%	9,80%	21,36%	28,48%
Hemicelulose	32,86%	47,25%	85,45%	96,47%	97,01%
Lignina	0,05%	5,69%	19,42%	6,65%	12,23%

A Figura 4.9 apresenta as fotografias das amostras de PCA após PTH com diferentes condições de temperatura e tempo avaliadas.

Após o pré-tratamento hidrotérmico da PCA observa-se um escurecimento da biomassa com o aumento do fator de severidade como pode ser visualizado nas fotos ilustradas na Figura 4.9. Este escurecimento pode ser atribuído a formação de produtos derivados da degradação de carboidratos em consequência da catalise ácida ou a caramelização dos polissacarídeos (SANTOS et al., 2012). Outra possível explicação para o escurecimento é a recondensação de produtos escuros na superfície da celulose denominado pseudo-lignina (KIM et al., 2013). Pode-se observar também que após PTH o material apresentou um maior fracionamento das fibras com o aumento do grau de severidade, o aumento da área superficial específica provavelmente se deve a maior remoção da hemicelulose e alterações nas estruturas da lignina e celulose (NITSON; MATIS; TRIANTAFYLLIDIS, 2013 e ZAKARIA et al., 2015).

Figura 4.9 – Fotografias das amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* (a) e após pré-tratamento hidrotérmico: (b) 170°C/5 min., (c) 170°C/15 min., (d) 195°C/10 min., (e) 220°C/5 min. e (f) 220°C/15 min.



Fonte: Acervo pessoal

A Figura 4.10 apresenta a microscopia eletrônica de varredura (MEV) da PCA “*in natura*” e pré-tratada nas diferentes condições avaliadas.

Figura 4.10 – Microscopia eletrônica de varredura, em resolução de 100 vezes, para palha *in natura* (a), palha pré-tratada hidrotérmicamente nas diferentes condições: 170°C/5 min (b), 170°C/15 min (c), 195°C/10 min (d), 220°C/5 min (e) e 220°C/15 min (f).

Figura 4.10 - (a) - Palha "in natura"

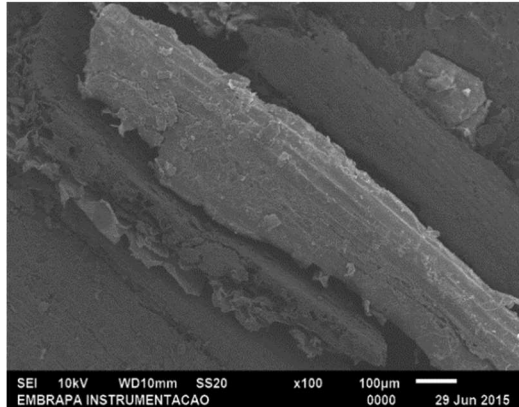


Figura 4.10 - (b) - 170°C/ 5 min.

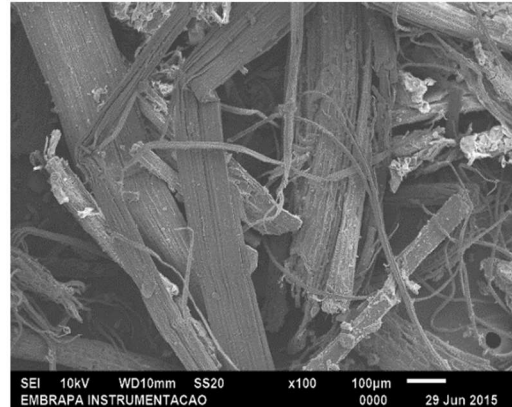


Figura 4.10 - (c) - 170°C/ 15min.

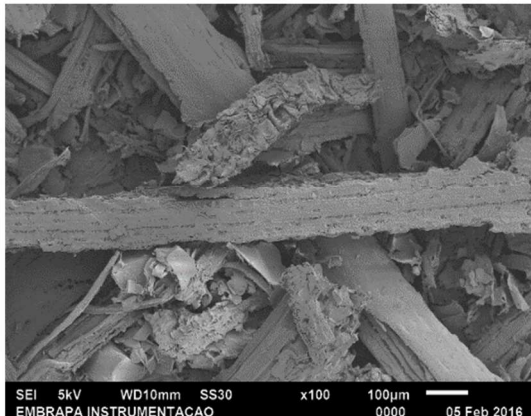


Figura 4.10 - (d) - 195°C/ 10 min.

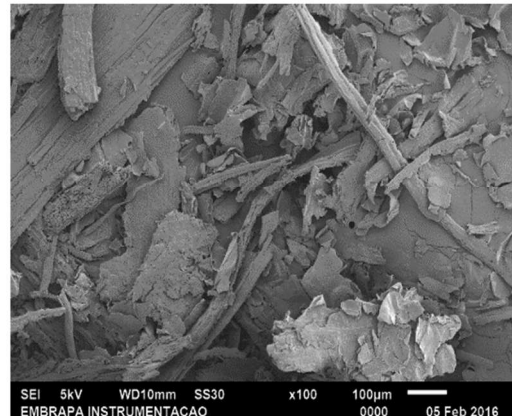


Figura 4.10 - (e) - 220°C/ 5 min.

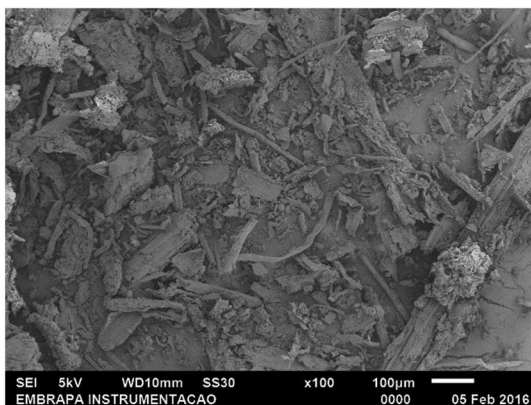
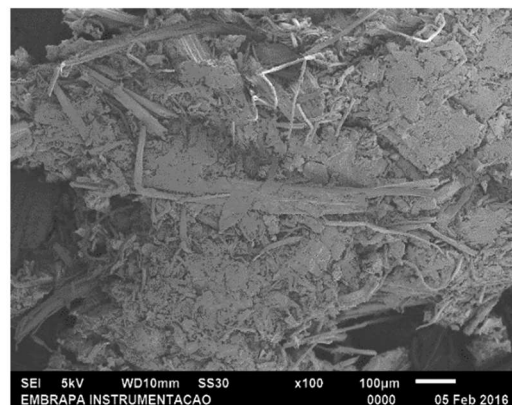


Figura 4.10 - (f) - 220°C/ 15 min.



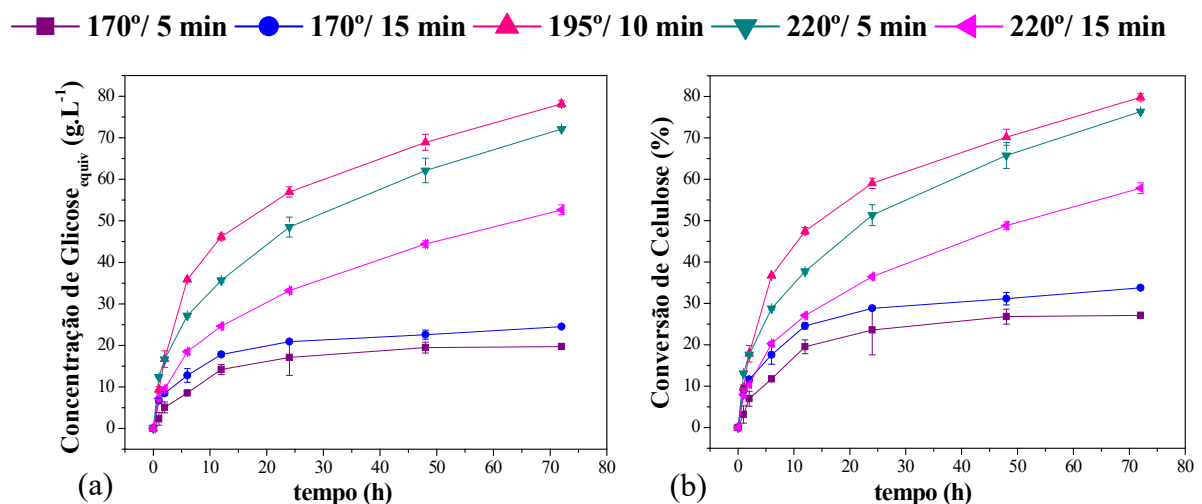
Fonte: Acervo pessoal

A biomassa “*in natura*” apresenta uma estrutura de superfície regular e compacta (Figura 4.10(a)), porem como esperado após o pré-tratamento podemos observar uma maior desorganização da estrutura lignocelulósica, causada pelo aumento do fator de severidade da condição do pré-tratamento, Figura 4.10(b-f).

4.3.2 Hidrólise dos materiais obtidos a partir de diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico

Com o objetivo de avaliar a eficiência do pré-tratamento foram realizados ensaios de hidrólise enzimática por 72 horas, utilizando as frações sólidas obtidas nas diferentes condições de PTH avaliadas. Essa avaliação é importante uma vez que o efeito do PTH sobre a biomassa pode ser diferente para cada condição de pré-tratamento aplicada. As condições de PTH tornam a celulose contida na biomassa mais ou menos acessível às celulasas o que influencia diretamente na conversão da mesma em glicose. As Figuras 4.11 (a) e (b) mostram os valores da concentração de glicose e da conversão de celulose em glicose, respectivamente, durante as 72 horas de experimento.

Figura 4.11 – Concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{biomassa}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



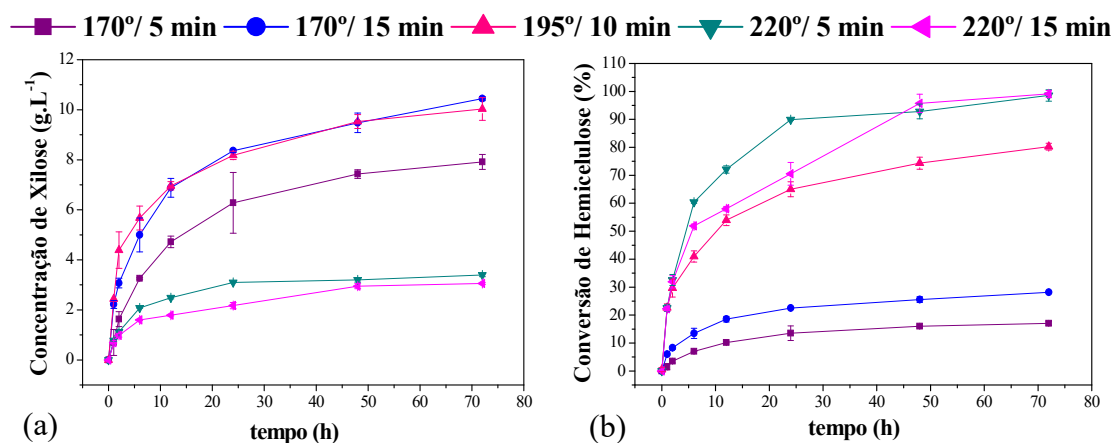
Ao analisar os perfis de concentração pode-se observar que cada condição de PTH o aumento da temperatura de 170 para 220°C, mantendo o tempo de reação em 5 minutos, resultou na obtenção de um licor de glicose 3,7 vezes mais concentrada (72,12 g/L) em 72 h de hidrólise. A conversão obtida foi de 27,1% para a PTH (170 °C/5min) e 76,3% para a PTH (220 °C/5min.).

Essa melhora na hidrólise enzimática com o aumento da temperatura corrobora com o observado por Cara et al. (2007) e Yu et al. (2010) e pode ser atribuído à maior solubilização da hemicelulose a 220°C (97% de remoção). A condição de temperatura 170°C foram as mais brandas aplicadas (menores fatores de severidade) essa temperatura de PTH foi baixa para romper e desestruturar a fibra lignocelulósica, o que é confirmado pela baixa remoção de hemicelulose. Analisando ainda a hidrólise da PTH a 170°C podemos notar uma melhora com o aumento do tempo de 5 para 15 minutos ao contrário, do que foi apresentado na hidrólise da PTH a 220°C que o aumento no tempo ocasionou uma redução na conversão de 76,34 para 57,84%. Uma explicação para a diminuição do rendimento da hidrólise da biomassa PTH em condições severas (fator de severidade igual ou maior que 4,7) é deposição de gotículas de lignina recondensada e depositadas na superfície da biomassa. Os principais efeitos negativos causados pela deposição das gotículas de lignina sob a biomassa na hidrólise pode ser o bloqueio superficial da celulose, as ligações improdutivas de enzima com a lignina (LI et al., 2014).

Dentre as condições de pré-tratamento avaliadas, observa-se na Figura 4.11 que a melhor condição foi a de 195°C por 10 minutos, alcançando 78,3 g.L⁻¹ de glicose o que corresponde a 79,8% de conversão.

A Figura 4.12 é apresenta os resultados de concentração de xilose e da conversão de hemicelulose em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH nas diferentes condições avaliadas.

Figura 4.12 – Perfil de concentração de xilose em g.L⁻¹ (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.

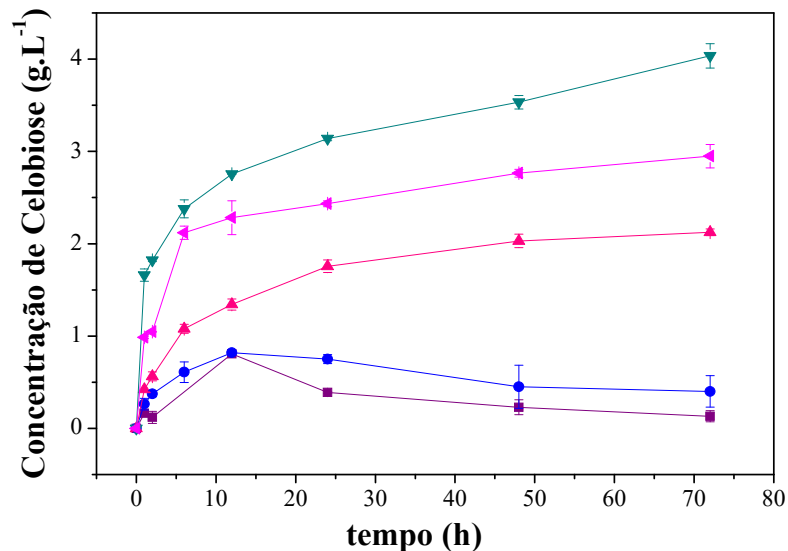


Como esperado as maiores concentrações de xilose obtidas nos experimentos de hidrólise foram para as biomassas pré-tratadas nas temperaturas de 170°C/5 min (~ 10 g/L, 17% de conversão) e 195°C/10min (~ 10 g/L, 80% de conversão) e 170°C/15min (~ 8 g/L, 28% de conversão). As menores conversões observadas para as amostras pré-tratadas a 170°C (5 e 15 min) são justificadas pelos baixos fatores de severidade destes (3,23 e 3,39 respectivamente) o que acarretou em uma pouca perda de hemicelulose em relação as demais condições estudadas. Na temperatura mais elevada (220 °C), em ambos os tempos a concentração de xilose foi da ordem de 3,0 g/L (praticamente 100% de conversão).

A Figura 4.13 mostra um aumento na concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratadas.

Figura 4.13 – Perfil de concentração de celobiose em g/L em função do tempo de hidrólise para as biomassas pré-tratada hidrotérmicamente – 170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min, 195°C/10 min, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.

■ 170°/ 5 min ● 170°/ 15 min ▲ 195°/ 10 min ▼ 220°/ 5 min ◀ 220°/ 15 min



Pode-se observar que o complexo enzimático Cellic[®]CTec2, garantiu baixas concentrações de celobiose. As maiores concentrações de celobiose obtidas ao final das hidrólises foram de 4,03 e 2,95 g.L⁻¹, para as condições de PTH de 220 °C por 5 e 15 min respectivamente. Com relação as concentrações de celobiose obtidas nas hidrólises da palha

PTH à 195°C/10 min estas foram menores que as obtidas pelas pré-tratadas a 220°C, esse fato pode ser atribuído a possível efeito de inibição da enzima β -glicosidase.

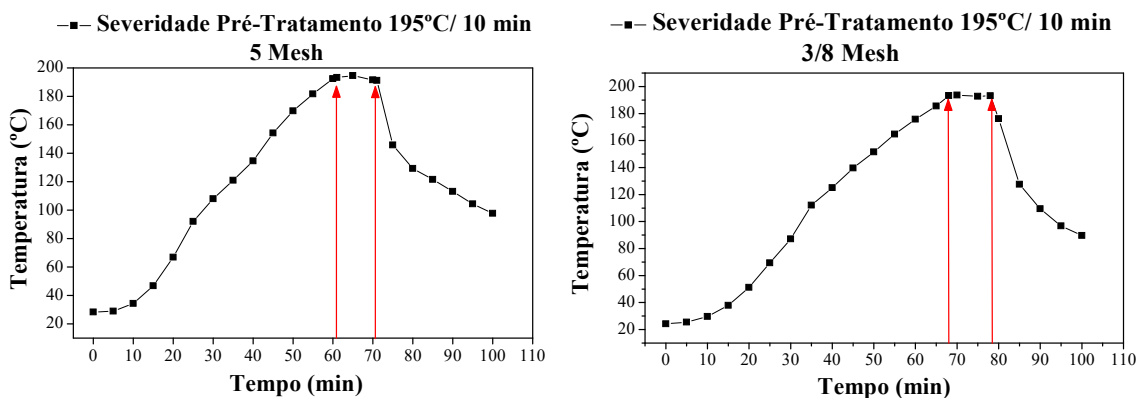
A partir dos resultados obtidos para as diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico a qual a palha de cana-de-açúcar foi submetida, definiu-se como melhor condição aquela realizada a 195 °C e 10 min. Esta condição foi adotada para continuidade do trabalho. Na sequência é apresentado estudo do efeito da granulometria no pré-tratamento hidrotérmico.

4.3.3 Influência da granulometria no pré-tratamento

Outra variável avaliada neste trabalho foi a granulometria da biomassa antes da etapa de pré-tratamento. Foram avaliadas as granulometrias de 5 e 3/8 de mesh equivalentes a 4,00 e 9,51 mm respectivamente.

Na Figura 4.14 são mostradas as rampas de aquecimento até a temperatura de tratamento e o posterior resfriamento após o tempo de reação para cada condição estudada, com o propósito de se calcular o fator de severidade de cada condição de pré-tratamento avaliada. Na análise do perfil da rampa de aquecimento e resfriamento observa-se que os tempos de permanência na temperatura de tratamento foram mantidos durante o tempo requerido para as condições estudadas.

Figura 4.14 – Perfil da temperatura durante os ensaios de pré-tratamento da biomassa. As setas indicam o período em que a temperatura permaneceu constante.



Na Tabela 4.10 são apresentados os resultados obtidos do fator de severidade, rendimento mássico e do pH da fração líquida ao final do processo para cada condição de pré-tratamento estudada.

Tabela 4.10 – Fator de severidade, rendimento mássico e pH da fração líquida, no final do pré-tratamento para cada condição de pré-tratamento estudada.

	Severidade	Rendimento	pH
5 mesh	4,10 ± 0,01	50,97 %	3,70 ± 0,14
3/8 mesh	4,02 ± 0,00	47,58 %	3,41 ± 0,02

O rendimento mássico foi alterado de cerca de 51% para 48% com o aumento da granulometria de 5 para 3/8 de mesh, porém não apresentou diferenças significativas no fator de severidade e pH da fração líquida.

Na Tabela 4.11 são apresentados os valores de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presentes na fração líquida ao final do pré-tratamento em cada condição estudada. Pode-se observar que as concentrações dos produtos de degradação se mantiveram constantes com o aumento da granulometria, não houve nenhuma variação significativa.

Tabela 4.11 – Concentração de ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural presente na fração líquida ao final de cada condição de PTH avaliada.

	Ácido glucurônico (g.L ⁻¹)	Ácido fórmico (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)
5 mesh	4,07 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,98 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,86 ± 0,00
3/8 mesh	4,09 ± 0,00	0,67 ± 0,00	0,98 ± 0,01	0,26 ± 0,00	0,88 ± 0,00

Com relação aos açúcares presentes na fração líquida ao final do pré-tratamento apresentados na Tabela 4.12 pode-se observar que de modo geral eles também se mantiveram constante com o aumento da granulometria. Uma possível explicação é que a diferença de granulometria não está sendo significativa para causar uma variação da caracterização da fração líquida.

Tabela 4.12 – Concentração de açúcares presente na fração líquida ao final do PTH em cada condição avaliada.

	Celobiose (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)	Arabinose (g.L ⁻¹)
5 mesh	3,37 ± 0,01	1,32 ± 0,00	3,70 ± 0,00	1,75 ± 0,00
3/8 mesh	3,38 ± 0,00	1,33 ± 0,00	3,70 ± 0,01	1,75 ± 0,01

A composição química da palha para as diferentes granulometrias avaliadas é apresentada na Tabela 4.13. Pode-se observar que a diminuição da granulometria de 3/8 para 5 mesh apresentou um acréscimo da concentração de celulose de 56 para 59% respectivamente.

Tabela 4.13 – Composição química (em porcentagem) da palha *in natura* após pré-tratamento hidrotérmico.

Componente	Palha “<i>in natura</i>” (%)	5 mesh (%)	3/8 mesh (%)
Celulose	33,13 ± 0,37	58,84 ± 0,16	55,99 ± 0,26
Hemicelulose	26,25 ± 0,33	5,98 ± 0,24	8,75 ± 0,11
Lignina	18,21 ± 0,21	29,04 ± 0,80	30,66 ± 0,27
Cinzas	6,21 ± 0,03	5,50 ± 0,03	1,30 ± 0,67
Extrativos	15,31 ± 0,53	-	-
Total	99,11 ± 1,47	99,36 ± 1,22	96,71 ± 0,67

Com os dados da Tabela 4.13 calculou-se a perda/solubilidade dos componentes das amostras de palha submetidas ao PTH nas diferentes granulometrias Tabela 4.14. Pode observar que a variação da granulometria não apresentou diferenças significativas com relação a remoção de hemicelulose e lignina.

Porém com relação a perda de celulose a palha com maior granulometria (3/8 mesh) apresentou uma maior perda de 19,59% em relação a de 5 mesh 9,80%. Essa maior perda de celulose apresentada pela palha com granulometria de 3/8 mesh se deve ao menor rendimento apresentado por ela após o PTH com relação à de 5 mesh.

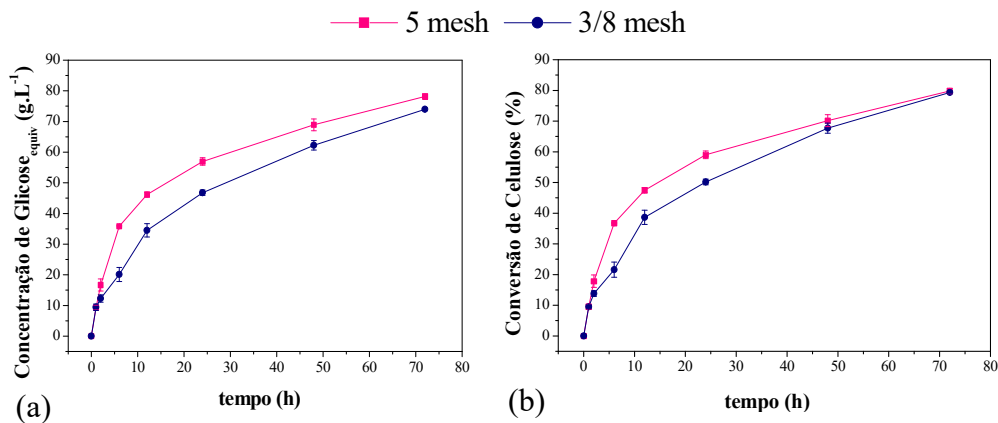
Tabela 4.14 – Perda/solubilização dos componentes das amostras de palha.

Componente	5 mesh (%)	3/8 mesh (%)
Celulose	9,80%	19,59%
Hemicelulose	85,45%	84,14%
Lignina	19,42%	19,89%

4.3.4 Avaliação da hidrólise dos materiais obtidos a partir de diferentes condições de granulometrias no pré-tratamento hidrotérmico

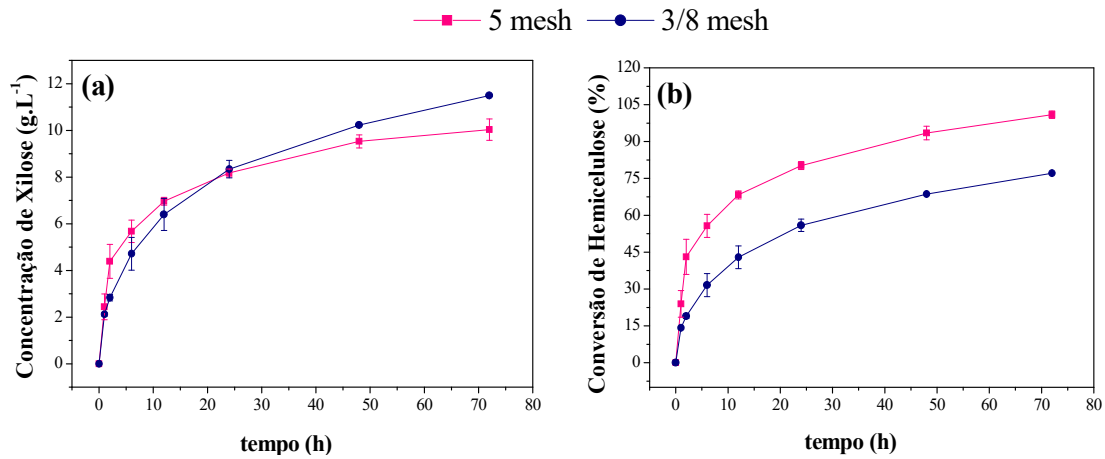
A Figura 4.15 apresenta o perfil de concentração de glicose equivalente (a) e conversão de celulose em função do tempo para as diferentes granulometrias avaliadas. Com relação a concentração de glicose equivalente pode-se observar após as 2 horas iniciais de hidrólise a palha com 5 mesh apresentou maiores concentrações de glicose_{equiv.} em relação a granulometria de 3/8 de mesh. Porém a conversão de celulose em glicose após 72 horas de hidrólise são praticamente iguais para ambas as granulometrias avaliadas.

Figura 4.15 – Perfil de concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH 195°C/10 min, com 5 mesh, 3/8 mesh, concentração de substrato: 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 FPU.g_{celulose}⁻¹, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



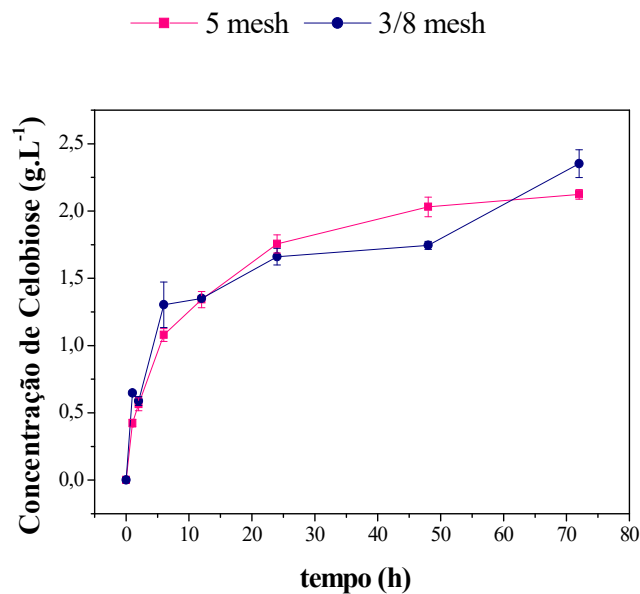
Na Figura 4.16 são apresentados os perfis de concentração de xilose (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para as granulometrias avaliadas. Com relação a concentração de xilose observa-se que a granulometria de 3/8 de mesh após 24 horas apresentou maiores concentrações de xilose liberada. Porém com relação a conversão de hemicelulose a palha com granulometria menor apresentou as maiores conversões durante toda hidrólise.

Figura 4.16 – Perfil de concentração de xilose em g.L^{-1} (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH $195^\circ\text{C}/10$ min, com 5 mesh, 3/8 mesh, 15% de sólidos (m/v), 13 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



Os perfis concentrações de celobiose liberada durante a hidrólise é apresentada na Figura 4.17. Não foram obtidas diferenças significativas com relação a concentração de celobiose durante a hidrólise para as granulometrias avaliadas.

Figura 4.17 – Perfil de concentração de celobiose em g.L^{-1} em função do tempo de hidrólise para as biomassas PTH : $195^\circ\text{C}/10$ min; com 5 mesh, 3/8 mesh, concentração de substrato 15% de sólidos (m/v), carga enzimática: 13 $\text{FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



Diante dos dados apresentados nesta etapa optou-se por utilizar a granulometria de 5 mesh para as próximas etapas.

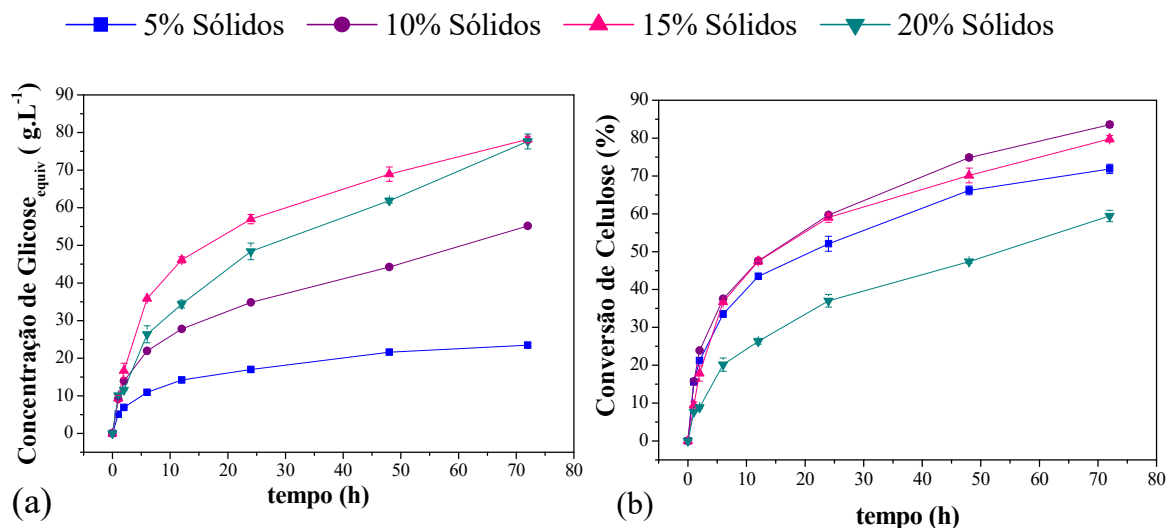
4.4 Hidrólise enzimática em frascos de Erlenmeyer

4.4.1 Avaliação do efeito de diferentes cargas de sólidos na hidrólise

O efeito de diferentes cargas de sólidos foi estudado nesta etapa. Operar o processo com alta carga de sólidos é importante de modo a tornar o processo de conversão de lignocelulósicos viável economicamente. Os perfis da concentração de glicose e da conversão em função do tempo de hidrólise para as cargas de sólidos avaliadas são apresentados na Figura 4.18(a) e (b), respectivamente.

O ensaio realizado com 10 % de sólidos resultou em uma concentração de glicose de 55,18 g/L (em 72 h), conversão de celulose de 83,54%. Quando a carga de sólidos foi aumentada para 20%, a concentração de glicose atingiu 77,64 g/L (em 72 h), cerca de 40% maior que a obtida com 10% de sólidos. Contudo, a conversão de celulose em glicose com 20% sólidos foi 59,44 %. É interessante destacar na Figura 4.18 (a) e (b) que o aumento da carga de sólidos de 10 para 15% acarretou em um aumento na concentração de glicose de cerca de 42% e a conversão caiu apenas 4,5%.

Figura 4.18 – Perfil de concentração de glicose equivalente em g/L (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 5, 10, 15 e 20% de sólidos e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8.

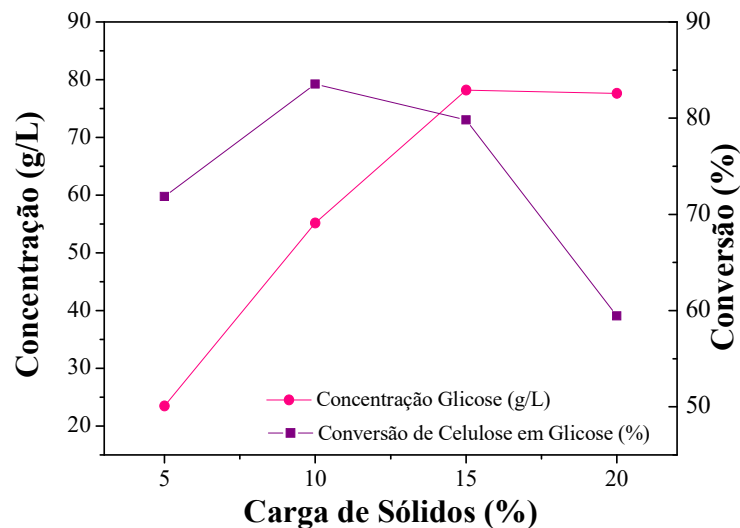


Kristensen et al. (2009) observaram que a conversão diminuiu com o aumento da carga de 10 para 20% de sólidos. Os efeitos responsáveis pela diminuição da conversão com o aumento da carga de sólidos ainda estão incertos. Várias causas são indicadas, tais como

inibição pelo produto e pelo aumento da concentração de compostos derivados da degradação dos açúcares, limitações devido à transferência de massa e adsorção não produtiva das enzimas (KRISTENSEN et al., 2009). A concentração de açúcares no hidrolisado é importante pois tem grande influência no consumo de energia nas operações subsequentes do processo (MIÃO et al. 2012). Segundo Ramachandriya et al. (2013) é importante operar com elevada carga de sólidos a fim de se obter licores com maior concentração de açúcares o que produz vinhos mais concentrados na etapa de fermentação, reduzindo assim o consumo de energia na destilação. Porém é reconhecido que a conversão apresenta comportamento inverso ao da concentração, ou seja, ele diminui com o aumento da carga de sólidos (Figura 4.19).

Na Figura 4.19 são apresentadas as concentrações de glicose e conversão de celulose após 72 horas de hidrólise em função da carga de sólidos. Pode-se observar pelos resultados que o aumento na carga de sólidos até 15% ocasionou um aumento na concentração final de glicose demonstrando um comportamento aproximadamente linear entre a carga de sólidos e a concentração de glicose final.

Figura 4.19 – Concentração de glicose e conversão de celulose em função da carga de sólidos na hidrólise da palha PTH, 50°C, pH 4,8 e 13 FPU/g_{biomassa} 50°C, pH 4,8.

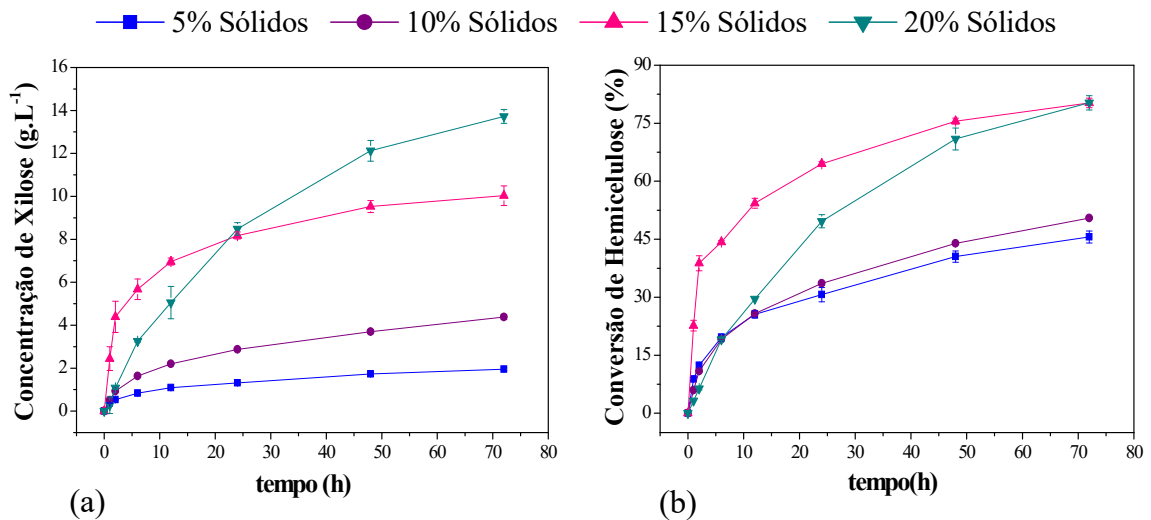


Comportamento semelhante foi observado por López-Linares et al. (2014) na hidrólise da palha de colza com carga de sólidos 7,5, 15 e 20% utilizando o complexo enzimático Cellic[®]CTec3 suplementado com β -glicosidase 15 FPU/g_{substrato}.

Na Figuras 4.20 (a) e (b) são apresentados os perfis de concentração de xilose e conversão em função do tempo de hidrólise para as quatro cargas de sólidos avaliadas.

Verificou-se que as cargas de sólidos de 15 e 20% resultaram nas maiores conversões. No entanto, a carga de sólidos de 15% apresentou uma melhor eficiência na conversão durante todo tempo de hidrólise em relação a carga de 20%.

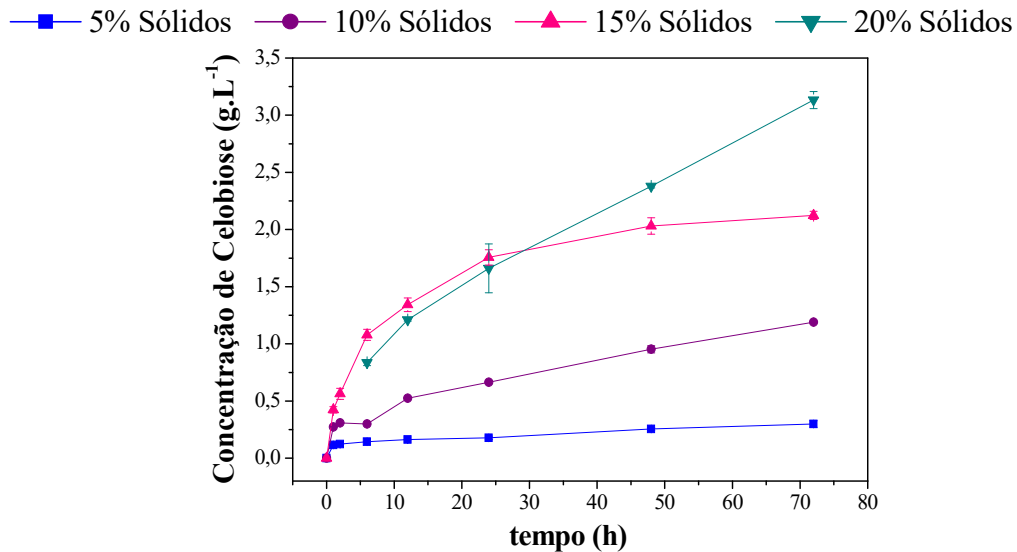
Figura 4.20 – Perfil de concentração de xilose em g.L^{-1} (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 5, 10, 15 e 20% e carga enzimática de 13 FPU/ $\text{g}_{\text{biomassa}}$, 50°C , pH 4,8.



Os perfis obtidos para a concentração de xilose apresentaram um comportamento semelhante ao da concentração de glicose. O aumento da carga de sólidos para 15% de sólidos causou um acréscimo de 80,58% na concentração de xilose em relação à carga de 5% de sólidos. Porém com relação a conversão de hemicelulose observa-se um aumento na carga de sólidos de 15 para 20% apresentou mesma conversão. O aumento da concentração de xilose com o tempo pode ser explicado pela presença de xilanases no complexo enzimático.

Os valores da concentração de celbiose durante a hidrólise são mostrados na Figura 4.21. Pode-se observar que as concentrações de celbiose aumentaram com o aumento da carga de sólidos. Para o experimento com 20% de sólidos durante as primeiras 24 horas a concentração de celbiose foi praticamente a mesma que a alcançada com 15% de sólidos. Após 24h, a concentração de celbiose aumentou no experimento com 20% de sólidos.

Figura 4.21 – Perfil de concentração de celobiose em g/L em função do tempo de hidrólise para cargas de sólidos de 10, 15 e 20% de sólidos e carga enzimática de 13 FPU/g_{biomassa}



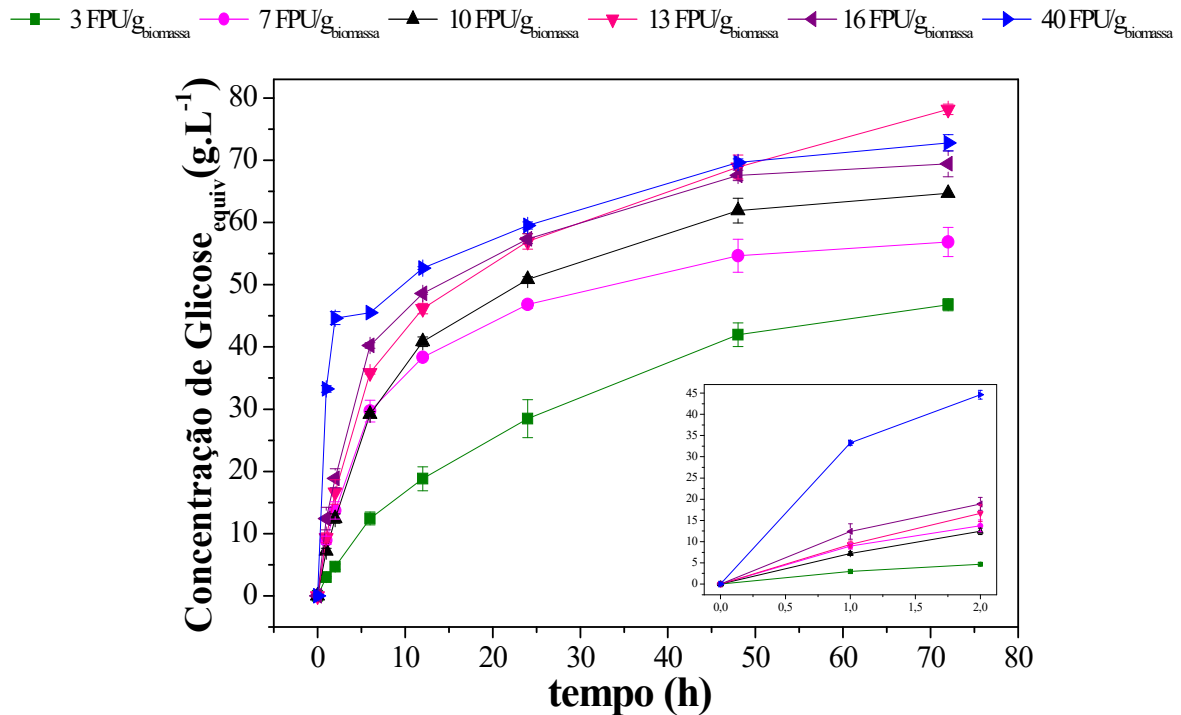
Visto que a hidrólise realizada com 15% de sólidos apresentou concentração de glicose_{equiv.} de 78,18 g.L⁻¹ e conversão de cerca de 34 % maior que a hidrólise com 20% de sólidos decidiu-se por empregar carga de sólidos de 15% para as etapas seguintes.

4.4.2 Avaliação do efeito de diferentes cargas enzimáticas na hidrólise

Nesta etapa analisou-se o efeito da carga de enzimas na hidrólise enzimática. Segundo Kinnarinen e Hakkinen (2014) a etapa de hidrólise juntamente com a de pré-tratamento e produção de enzima são responsáveis por quase metade do custo total da produção do bioetanol. Devido ao alto preço das enzimas é importante reduzir a quantidade de enzima necessária para atingir altos rendimentos a partir da biomassa.

A Figura 4.22 apresenta a concentração de glicose em função do tempo de hidrólise. Pode-se observar que em geral o aumento da carga enzimática resulta em um aumento da concentração de glicose após 72 horas de hidrólise para as cargas aplicadas. No entanto a carga de enzima de 13 FPU/g_{biomassa} apresentou uma maior concentração de glicose_{equiv.} liberada após 72 de hidrólise.

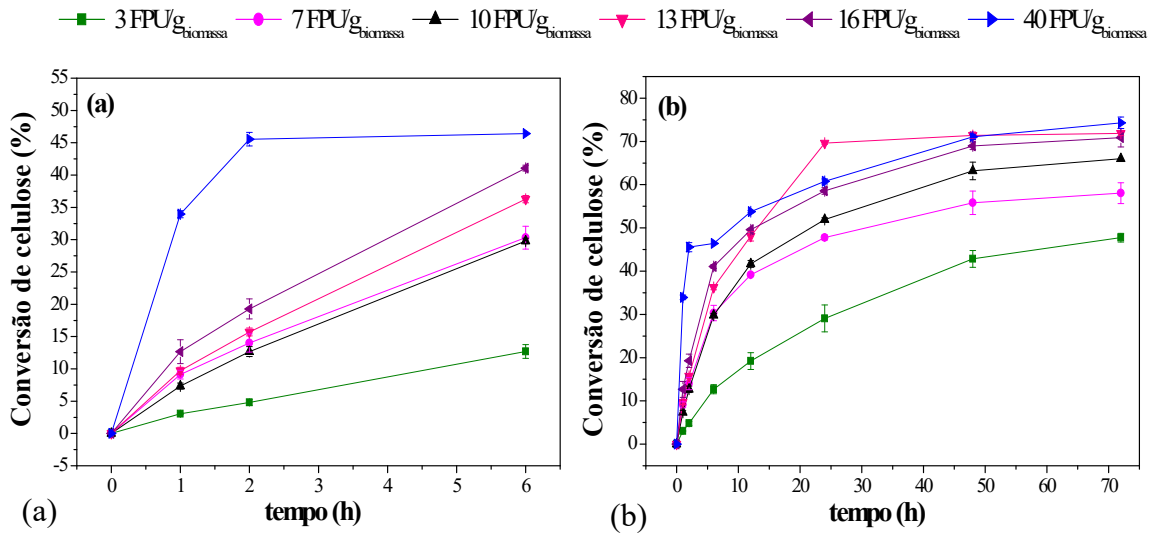
Figura 4.22 – Perfil de concentração de glicose em função do tempo de para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa}, carga de sólidos fixa de 15%, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.



Na Figura 4.23(a) e (b) são mostrados os resultados de conversão de celulose em 6 horas e 72 horas respectivamente durante a hidrólise com diferentes cargas de enzima. Os resultados obtidos demonstram que o aumento da carga de enzima promoveu uma maior eficiência na conversão da celulose ao final da hidrólise, no entanto cargas de enzima acima de 13 FPU/g_{biomassa} não apresentaram uma melhora significativa na conversão de celulose em glicose. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen et al. (2007) utilizando como substrato sabugo de milho, Caspeta et al. (2014) com bagaço de agave e por Mesa et al. (2010) que durante a hidrólise do bagaço de cana a variação das cargas de enzimas de 15 e 25 FPU/g_{celulose} não apresentaram diferença significativa na concentração de glicose liberada no final do ensaio.

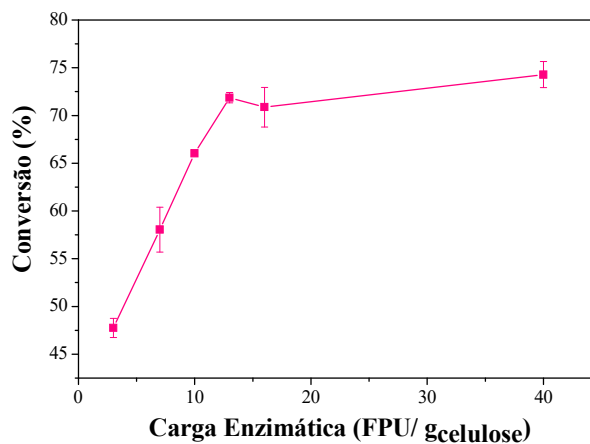
O aumento da carga de enzima de 13 para 16 e 40 FPU/g_{celulose} apresentou um aumento na velocidade inicial da hidrólise apresentando em 2 horas conversões de 36, 41 e 46%, respectivamente (vide Figura 4.23(a)). Contudo, esse fator não compensa o uso de carga maior que 13 FPU/g_{biomassa} visto que após 48h as conversões obtidas nos nestes experimentos foram muito próximas (71,4%, 68,9% e 71,1% de conversão para os experimentos com 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa}, respectivamente) Figura 4.23(b).

Figura 4.23 – Perfil de conversão de celulose em glicose de durante as 6 primeiras horas (a) e 72 horas de hidrólise (b) para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa}, carga de sólidos fixa de 15%, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.



A Figura 4.24 apresenta a conversão de celulose em função da carga de enzima após 72 horas de hidrólise. Em uma comparação geral das conversões de celulose na Figura 4.24 podemos observar um aumento da conversão com o aumento da carga de enzima até 13 FPU/g_{biomassa}, para cargas enzimáticas maiores que 13 FPU/g_{biomassa} praticamente não há aumento na conversão. Uma possível explicação estaria relacionada aos efeitos de inibição devido à elevada concentração de glicose (cerca de 76 g/L) no meio reacional (MUSSATTO et al., 2008). Outra possibilidade relatada por Castro e Pereira Jr (2010) para a redução da conversão com o aumento da carga enzimática é a saturação dos sítios da matriz do substrato pelos biocatalisadores.

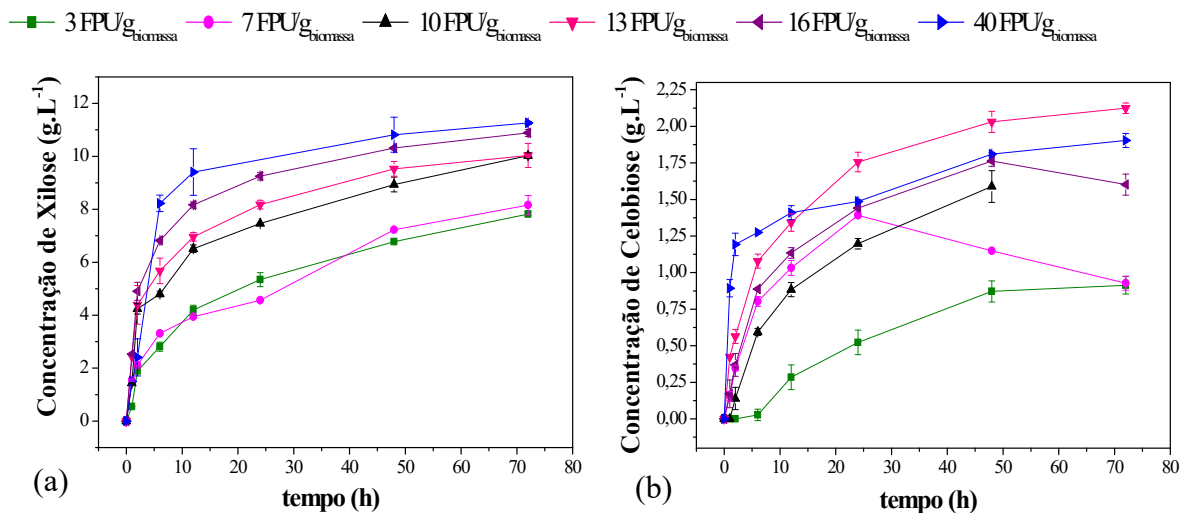
Figura 4.24 – Conversão da celulose em glicose em função da carga de enzima empregada na hidrólise (em 72 h).



Os perfis de concentração de xilose e celobiose em função do tempo de hidrólise são apresentados na Figura 4.25 (a) e (b) respectivamente. Com relação às concentrações de xilose ao longo da hidrólise observa-se um aumento do valor com o aumento da carga enzimática semelhante ao citado anteriormente. Porém, ao contrário do observado para concentrações de glicose em 2h de hidrólise as velocidades iniciais são menores quando aplicadas cargas de 40 e 7 FPU/g_{biomassa}.

As concentrações de celobiose em função do tempo, Figura 4.25 (b), de maneira geral aumenta com o aumento da carga de enzimas como exceção da carga de 13 FPU/g_{biomassa} que apresenta a maior concentração de celobiose de 2,12 g.L⁻¹. Em geral os resultados apresentados implicam que o complexo enzimático utilizado no estudo Cellic[®]Ctec-2 apresenta uma alta dosagem de enzimas responsáveis pela eficiente hidrólise tanto da celulose quanto da hemicelulose fato também observado em estudos anteriores. Kinnarinen e Hakkinen (2014) também observaram atividade significativa de xilanase no complexo o que melhora a hidrólise da celulose pelo efeito sinérgico.

Figura 4.25 – Perfil de concentração de xilose em g.L⁻¹ (a) e conversão da hemicelulose (b) em função do tempo de hidrólise para cargas de enzimas de 3, 7, 10, 13, 16 e 40 FPU/g_{biomassa} e carga de sólidos fixa de 15%.



Diante da importância de se trabalhar com altas concentrações de glicose no hidrolisado afim de se obter altas concentrações de etanol, o que apresenta efeito significativo no custo da destilação, além da importância de minimizar a carga de enzima utilizada visto que o preço da enzima contribui significativamente para o custo total do processo de conversão da biomassa a etanol (Chen et al., 2007). A melhor carga dentre as avaliadas foi a de 13

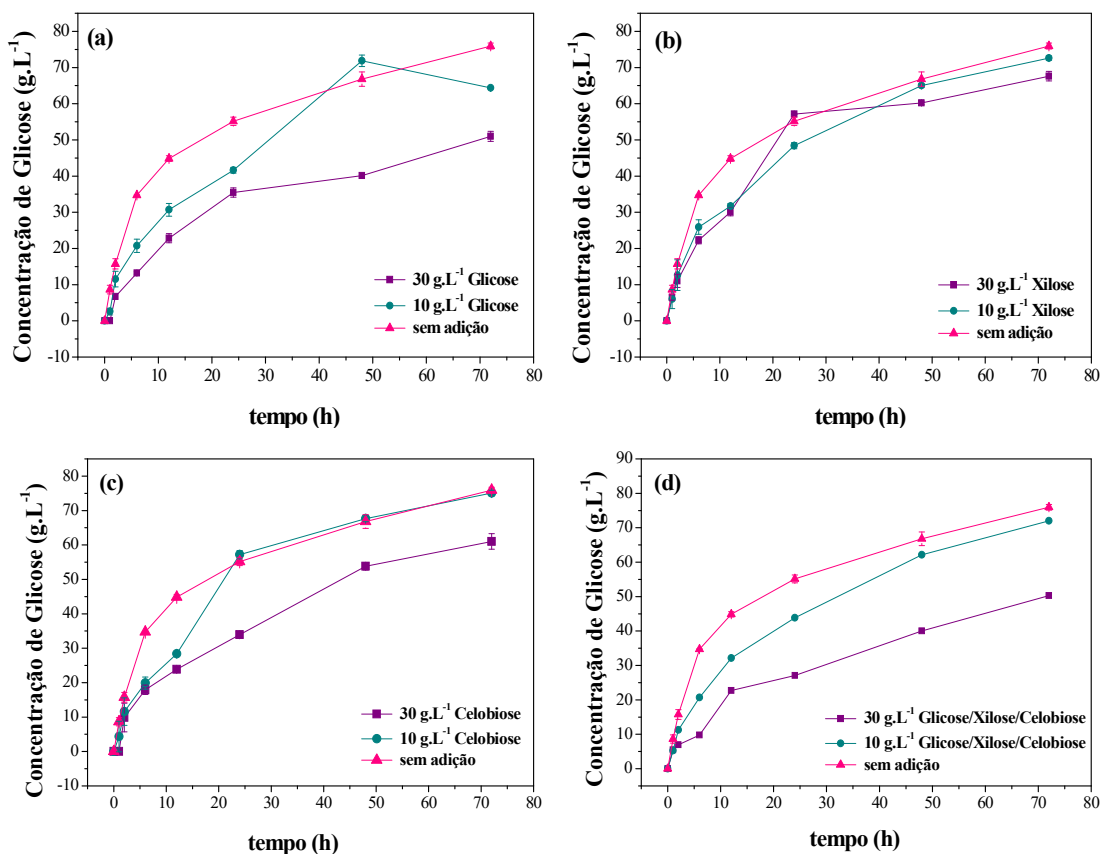
FPU/g_{biomassa}, pois esta apresentou maior concentração de glicose ao final da hidrólise e maiores conversões.

4.4.3 Avaliação do efeito de inibição pelo produto na etapa de hidrólise

Como discutido anteriormente é importante empregar altas cargas de sólidos a fim de se obter altas concentrações de açúcares no hidrolisado. Porém os açúcares podem se comportar como inibidores, diminuindo a conversão da celulose em glicose, principalmente no final da etapa de hidrólise. Diante disso decidiu-se avaliar o efeito de inibição dos principais produtos gerados durante a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.

A Figura 4.26 apresenta os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise para os experimentos com adição de glicose (a), celobiose (b), xilose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações 30, 10 g.L⁻¹ e sem adição de produto. A adição de cada açúcar foi subtraída no seu gráfico respectivo para facilitar a comparação e a análise dos resultados.

Figura 4.26 – Perfil de concentração de glicose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.



Como esperado observa-se uma diminuição da velocidade inicial de hidrólise com a adição de todos os açúcares, porém com maior ênfase nas adições de glicose e celobiose no início dos experimentos.

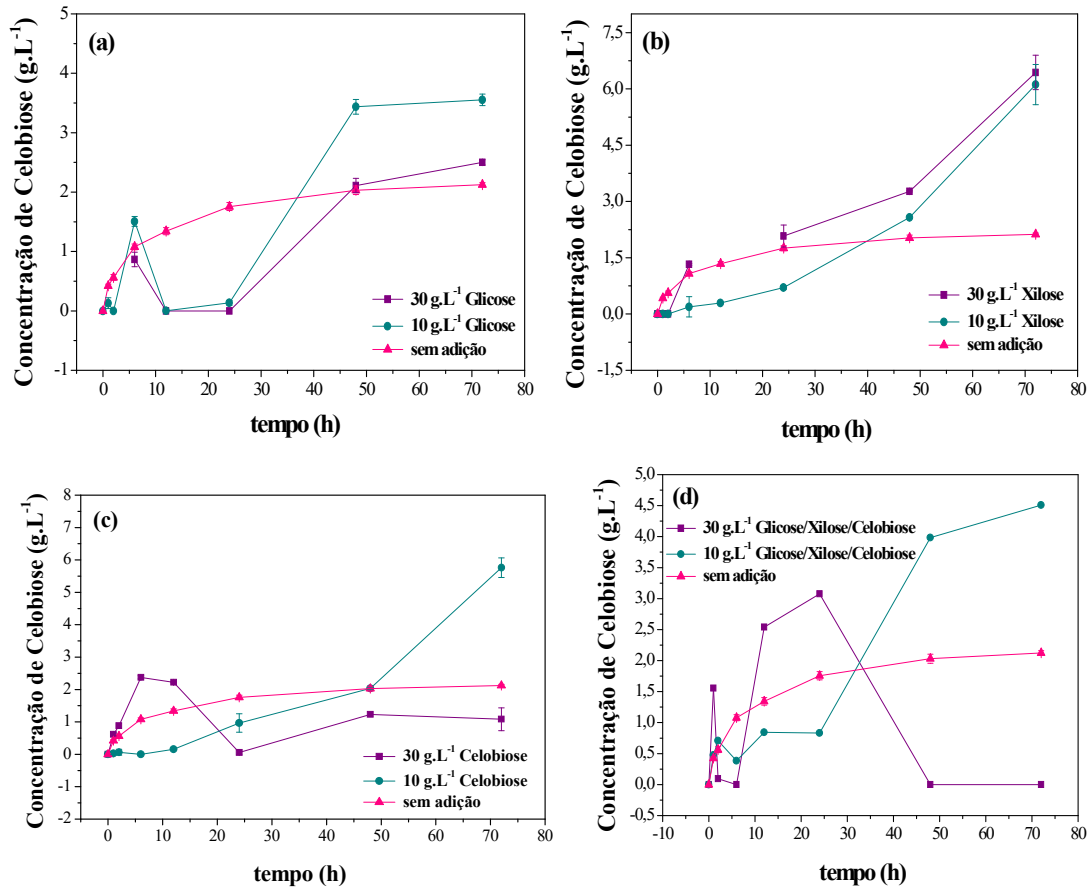
Nos ensaios em que se adicionou glicose no início pode-se observar que a adição das diferentes concentrações de glicose reduziu em diferentes graus a taxa de inicial de formação de glicose, sendo a adição de 30 g/L aquela que mais afetou a produção de glicose durante a hidrólise. Após 72 horas hidrólise observa-se uma redução da concentração final de glicose de 15,27% e 32,88% com a adição de 10 e 30 g/L respectivamente, em relação ao processo sem adição de açúcar.

Ao contrário do descrito por vários autores (ANDRIC et al., 2010; KADAM; RYDHOLM; McMILLAN, 2004), que relatam que a celobiose pode ser um agente inibidor, da ação hidrolítica das enzimas, ainda mais forte que a glicose, nos ensaios com adição de celobiose pode-se observar um efeito de inibição menos pronunciado, onde a adição de 30 g/L de celobiose acarretou em uma diminuição de 19,66% da glicose liberada em relação ao ensaio de referência. Ainda com relação a celobiose quando se adicionou 10 g/L esta concentração não teve influência significativa na glicose final obtida, em relação ao ensaio de referência. Uma possível explicação para o menor efeito inibitório apresentado pela celobiose seria a suplementação do complexo enzimático (Cellic[®]Ctec-2) com β -glicosidase, a fim de promover um maior consumo de celobiose no meio reacional. Apesar de apresentar um efeito inibitório menor em relação a adição de glicose e celobiose, as adições de 10 e 30 g/L de xilose inicial apresentou uma diminuição média de cerca de 11% na concentração final de glicose liberada em relação ao ensaio de referência.

A Figura 4.27 apresenta os perfis de concentração de celobiose em função do tempo de hidrólise para os experimentos com adição de glicose (a), celobiose (b), xilose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações 30, 10 g.L⁻¹ e sem adição de produto.

Pode-se observar que na hidrólise da palha de cana-de-açúcar com relação a concentração de celobiose as adições de açúcares não apresentaram efeito inibidor com exceção para a adição de 30g.L⁻¹ de celobiose em que apresentou uma menor concentração de celobiose ao final do tempo de hidrólise em relação ao controle.

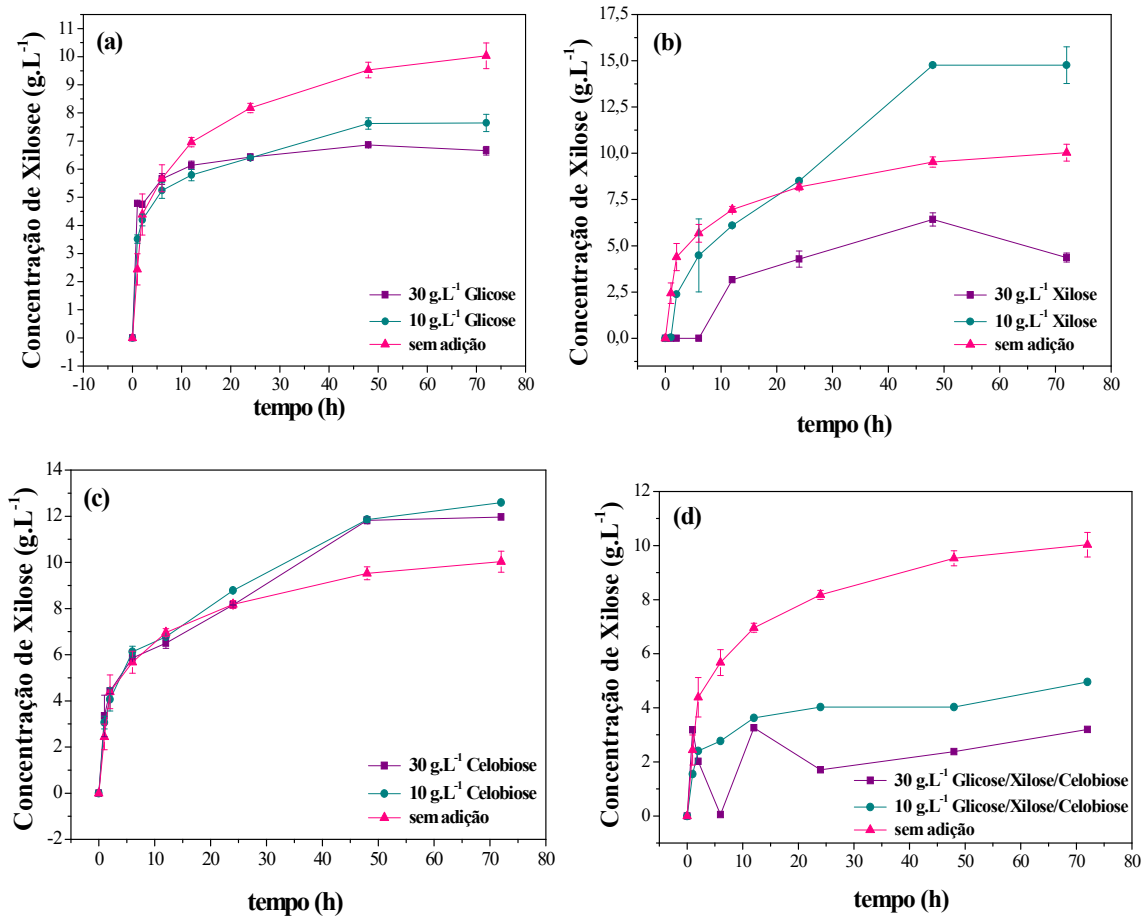
Figura 4.27 – Perfil de concentração de celobiose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.



A Figura 4.28 apresenta os perfis de concentração de xilose em função do tempo de hidrólise para os experimentos com adição de glicose (a), celobiose (b), xilose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações 30, 10 g.L⁻¹ e sem adição de produto.

Com relação a concentração de xilose onde estaria sendo inibida as hemicelulases do complexo a adição de celobiose não apresentou efeito inibidor significativo, sendo obtido um aumento de cerca de 8% na glicose liberada no ponto final da hidrólise. No entanto, a adição dos demais açúcares apresentaram efeitos inibitórios, sendo os efeitos mais pronunciados obtidos com as adições das misturas dos açúcares (glicose, celobiose e xilose) nas concentrações de 10 e 30 g/L.

Figura 4.28 – Perfil de concentração de xilose em função do tempo (72 horas) para palha PTH (195°C/10 min.) com adição de concentração inicial de glicose (a), xilose (b), celobiose (c) e mistura de glicose, xilose e celobiose (d) nas concentrações de 30 e 10 g/L e sem adição de açúcar, carga de sólidos 15%, carga de enzima 13 FPU/g_{biomassa}, 50°C, pH 4,8 e agitação de 250 rpm.



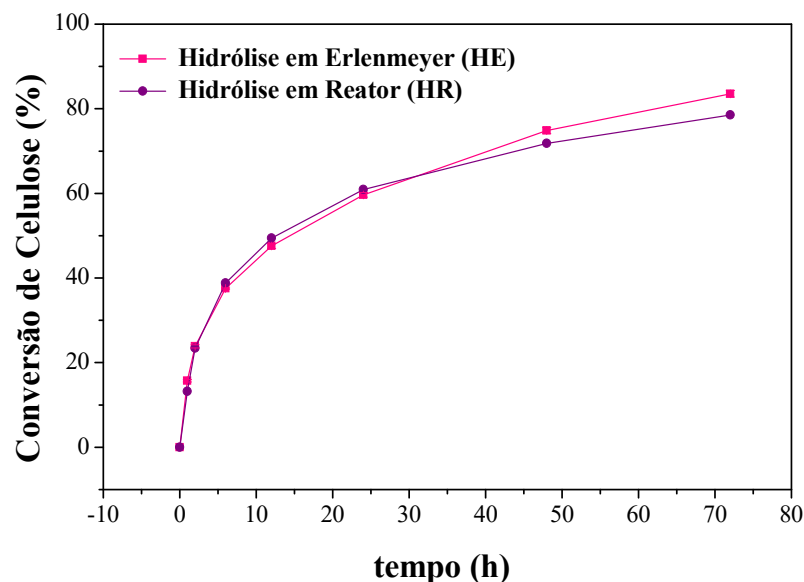
4.5. Hidrólise enzimática em reator de 3000 mL

Manter altas concentrações de sólidos ao longo do processo de produção de bioetanol é importante do ponto de vista econômico e energético, de forma a garantir que se obtenha elevadas concentrações de açúcares. No entanto, o uso de altas concentrações de substratos pode levar a redução da eficiência devido ao aumento da resistência à transferência de massa. A eficiência da hidrólise enzimática está associada à velocidade de formação de produto, que é governada por três eventos em sequência: velocidade de transferência de massa externa da enzima até a superfície do substrato, velocidade de adsorção da enzima na superfície do substrato e velocidade da reação enzimática (Gan et al., 2003). Uma das formas de melhorar o

processo de sacarificação enzimática é minimizar os efeitos de resistência à transferência de massa, de forma a garantir que o processo não seja limitado por essa etapa.

Diante disso nesta etapa comparou-se o desempenho da hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar realizada em frasco de Erlenmeyer e em reator de tanque agitado (3000 mL) após pré-tratamento hidrotérmico (195°C/10min). Os perfis de conversão de celulose em função do tempo de hidrólise para os experimentos realizados em frascos de Erlenmeyer (HE) e em reator de bancada (HR) são apresentados na Figura 4.29.

Figura 4.29 – Conversão de celulose em função do tempo nos experimentos de hidrólises em Erlenmeyer (HE) e em reator de bancada (HR).

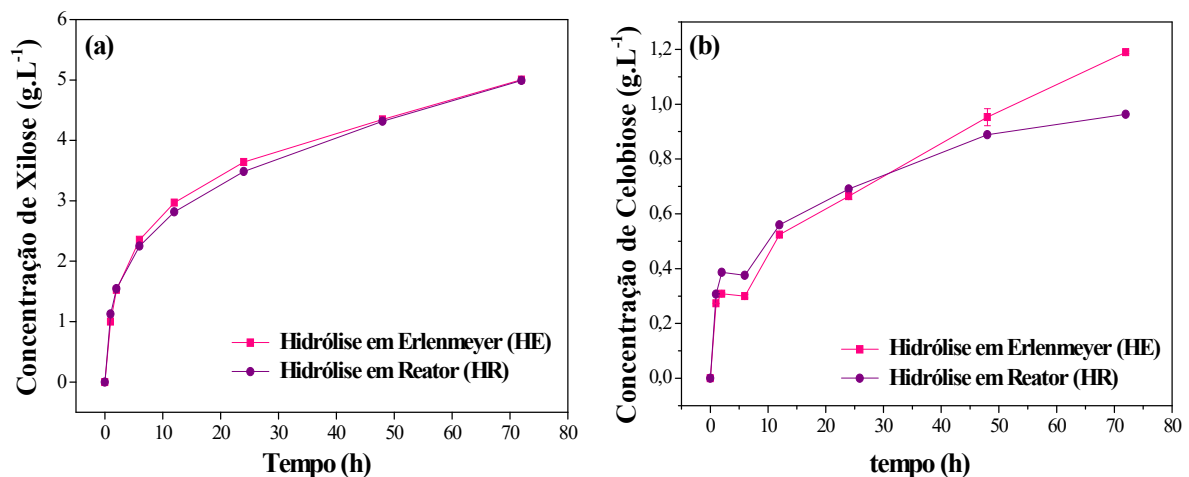


Analisando os perfis de conversão da Figura 4.29 nota-se claramente que os ambos os ensaios de hidrólise apresentaram perfis similares tanto para HE como para HR. Após 72h de hidrólise foram obtidas conversões de 84,82% nos ensaios realizados em Erlenmeyer e 80,16% na hidrólise realizada em reator (valor 5% menor ao anterior). Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang et al. (2009) utilizando como substrato polpa de madeira que durante as hidrólises com 2% de carga de sólidos obteve-se 100% de conversão em 24h tanto para os ensaios em frascos de Erlenmeyer quanto para os realizados em reator utilizando misturador. Oliveira et al. (2013) relatam em seu trabalho conversão de 80% após 72h de hidrólise enzimática (10% sólidos) de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente (200°C/15 min). A partir dos dados obtidos pode-se supor que, nas condições estudadas, o ensaio realizado

em frasco agitado não sofreu limitações devido à transferência de massa, ou seja, a agitação em shaker está sendo suficiente para garantir o contato satisfatório da enzima e o substrato.

Os perfis de concentração de xilose e celobiose em função do tempo de hidrólise são apresentados na Figura 4.30. Com relação aos perfis de concentração de xilose observa-se resultado semelhante aos obtidos pela glicose, apresentando perfis similares tanto para os ensaios realizados HE quanto para HR, demonstrando assim que não está havendo limitação por transferência de massa. Por outro lado, com relação aos perfis de concentração de celobiose observa-se que após 48h de hidrólise maiores concentrações de celobiose foram obtidas em ensaios realizados e frasco de Erlenmeyer.

Figura 4.30 – Concentração de xilose (a) e celobiose (b) em função do tempo nos experimentos de hidrólises em Erlenmeyer (HE) e em reator de bancada (HR).



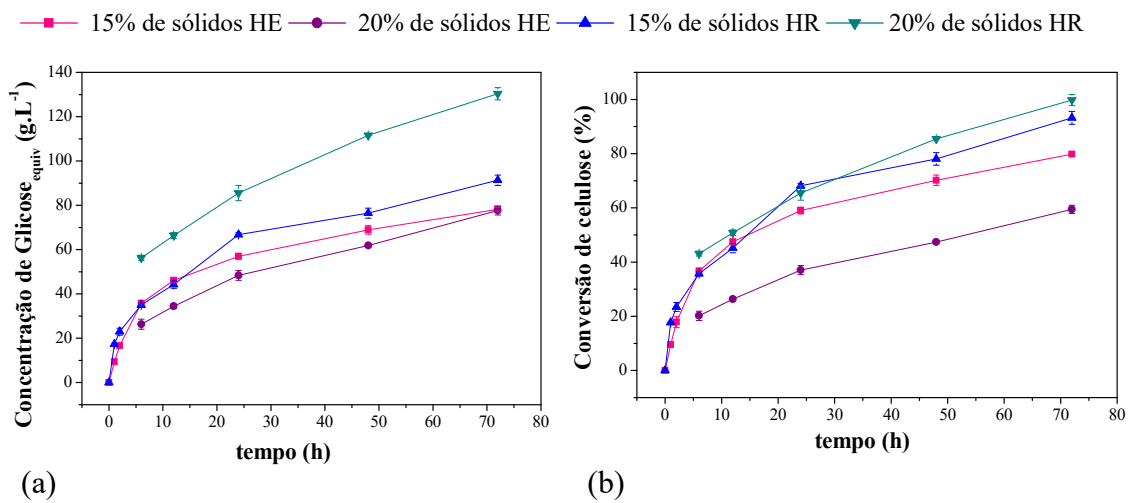
Diante dos resultados obtidos nesta etapa, decidiu-se por realizar hidrólises com maiores cargas de sólidos afim de avaliar o efeito de limitação por transferência de massa em frascos de Erlenmeyer e em reator de bancada, porém em volume de 50 mL.

4.6 Hidrólise enzimática em reator de 50 mL

Na Figura 4.31 são apresentados os perfis de concentração de glicose em g.L⁻¹ (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (15% e 20%) em Erlenmeyer e reator de 50 mL. Observa-se na Figura 4.31 que tanto a concentração de glicose liberada quanto a conversão de celulose foram maiores nas hidrólises realizadas em reator com agitação mecânica. Foram obtidos aumentos de 14% na concentração

de glicose para HR em relação as HE com 15% de sólidos e um aumento de 60% na concentração de glicose liberada ao final para as HR em relação as HE para a carga de 20% de sólidos. Pode-se observar uma acentuada melhora tanto na concentração de glicose liberada como na conversão da celulose ao final das hidrólises em reator com agitação mecânica.

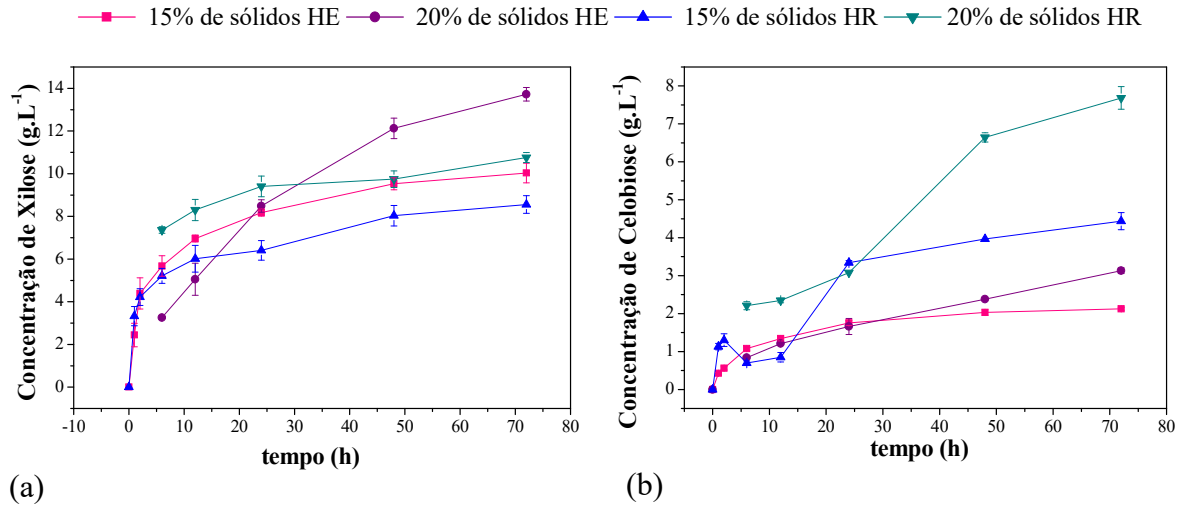
Figura 4.31 – Perfil de concentração de glicose em g.L^{-1} (a) e conversão da celulose (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (15% e 20%) em Erlenmeyer e reator de 50 mL, carga enzimática: $16 \text{ FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



A eficiência da hidrólise enzimática é influenciada por vários fatores relacionados ao substrato e a enzima, incluindo a heterogeneidade dos reagentes (uma enzima líquida atuando sobre um substrato sólido). Desta forma é necessária uma mistura do meio adequado afim de se garantir contato suficiente entre a enzima e o substrato além de promover transferência de massa e de calor no meio. Zhang et al (2009) hidrolisando pasta Kraft de madeira dura, numa concentração de sólidos de 20%, levou uma hora para liquefazer a mistura utilizando um misturador tipo PEG em comparação a 40 horas para liquefazer a mesma condição em frascos agitados.

Na Figura 4.32 são apresentados os perfis de concentração de xilose (a) e celobiose (b) em função do tempo de hidrólise para as cargas de sólidos de 15 e 20% em frascos de Erlenmeyer e reator agitado.

Figura 4.32 – Perfil de concentração de xilose em g.L^{-1} (a) e concentração de celobiose em g.L^{-1} (b) em função do tempo nas hidrólises enzimáticas para diferentes cargas de sólidos (15% e 20%) em Erlenmeyer e reator de 50 mL, carga enzimática: $16 \text{ FPU.g}_{\text{celulose}}^{-1}$, pH 4,8, 50°C e agitação de 250 rpm.



Com relação as concentrações de celobiose verifica-se um comportamento semelhante ao apresentado anteriormente pela glicose, obtendo-se maiores valores nos ensaios realizado em reator agitado. A maior concentração de celobiose liberada foi obtido nos ensaios realizados em reator com carga de sólidos de 20%. Por outro lado, as concentrações de xilose apresentaram comportamento oposto onde as maiores concentrações de xilose foram obtidas nos ensaios realizados em frascos de Erlenmeyer para ambas as cargas de sólidos avaliadas.

5 – CONCLUSÕES

De maneira geral, a utilização de matérias lignocelulósicas para a produção de etanol é uma alternativa promissora, porém o grande desafio ainda consiste em tornar viável economicamente este processo, de modo que a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica torne-se competitiva com as demais rotas de produção de biocombustíveis em larga escala. Neste sentido, procurou-se neste trabalho avaliar as etapas de pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar.

Primeiramente constatou-se que o pré-tratamento hidrotérmico foi eficiente na remoção de grande parte da hemicelulose e parte da lignina sem perda significativa de celulose, elevando a digestibilidade da celulose pelas enzimas celulolíticas. A melhor condição de pré-tratamento hidrotérmico avaliada neste trabalho foi de 195°C/ 10 min. Que proporcionou uma maior solubilização da hemicelulose de 85,58% com perda de apenas 8,02% de celulose.

Na etapa de hidrólise enzimática o complexo enzimático Cellic-CTEC 2 mostrou-se eficiente por possuir enzimas que hidrolisam a hemicelulose, o que contribui para a obtenção de bons valores de conversão da celulose a glicose. A análise da variação carga de sólidos pode-se observar que o aumento dessa variável promoveu uma maior liberação de glicose. Na faixa estudada (5,10, 15 e 20% m/v) o comportamento foi aproximadamente linear, porém acarretou em diminuição na conversão da celulose a glicose. Já com relação a carga de enzima o aumento desta variável promoveu uma maior liberação de glicose e aumento da conversão. No entanto para valores acima de 13 FPU/g_{biomassa} não houve ganhos significativos na conversão, indicando possível efeito de inibição. Desta forma, como é importante obter-se altas concentrações de glicose ao final da etapa de hidrólise, para que se obtenham concentrações mais elevadas de etanol na etapa de fermentação, deve-se encontrar uma boa relação entre a carga de sólidos e de enzima a ser utilizada. A partir dos resultados obtidos neste trabalho concluiu-se que a melhor condição experimental foi obtida para o experimento que utilizou 15% de carga de sólidos e 13 FPU/g_{biomassa} de carga enzimática.

Nos ensaios de verificação do efeito de inibição pelos produtos da hidrólise observou-se que a glicose e a celobiose apresentam um maior efeito inibidor sobre a conversão de celulose quando comparada a xilose. A xilose apresentou um menor efeito inibidor sobre a β -glicosidase uma vez que a celobiose estava sendo efetivamente convertida em glicose quando adicionou-se xilose ao meio.

Os perfis das concentrações de glicose obtidos nos experimentos realizados em frascos de Erlenmeyer e em reator de tanque agitado com carga de sólidos de 10%, foram semelhantes.

Após 72 h de reação foram obtidas conversões de 84,8% (frascos de Erlenmeyer) e 80,2% (reator). A partir dos dados obtidos pode-se supor que, nas condições estudadas, o ensaio realizado em frasco agitado não sofreu limitações devido à transferência de massa. Não foram observadas concentrações significativas de formação de inibidores (HMF e furfural) durante a hidrólise tanto em frascos de Erlenmeyer quanto em reator. No entanto quando se aumentou a carga de sólidos para 15 e 20% observou-se uma acentuada melhora tanto na concentração de glicose liberada como na conversão da celulose ao final das hidrólises em reator com agitação mecânica (50 mL) em relação aos ensaios realizados em frasco agitado. Foram obtidos aumentos de 14% na concentração de glicose para HR em relação as HE com 15% de sólidos e um aumento de 60% na concentração de glicose liberada ao final para as HR em relação as HE para a carga de 20% de sólidos.

Finalmente observou-se que a palha de cana-de-açúcar apresenta um grande potencial para conversão em açúcares fermentáveis.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNEY B.; BAKER J. Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP). **NREL Report No. TP-510-42628**, 2008, 11 p.

AGRICULTURA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>> Acesso em: 02 julho 2012.

ALVES, M. **Estudo de sistema de cogeração em usina de açúcar e álcool, com utilização do bagaço e palha de cana**. 2011. 114 f. (Dissertação), UNICAMP, Campinas, 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANDRIC, P. et al. Reactor design minimizing production inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308-324, 2010.

BACH, Q. V.; TRAN, K. H.; SKREIBERG, O. Hydrothermal pretreatment of fresh forest residues: Effects of feedstock pre-drying. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 76-83, 2016.

BINOD, P. et al. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: PANDEY, A. et al. **Biofuels**, Burlington: Academic Press, 2011, p. 229-250.

BISWAS, R.; UELLEND AHL, H.; AHRING B. K. Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenerg.**, v. 61, p. 104-113, 2014.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org/>> Acesso em: julho 2012.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248–254.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Empresa de pesquisa energética (EPE). **Balço energético nacional**. Brasília, 2015. 289 p.

JORGENSEN, H.; CANNELLA, D. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 59-68, 2013.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, 15p, 2012.

CAO, W. et al. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 215-221, 2012.

CARA C. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, 2006, 41: 423–429.

CARVALHEIRO F.; DUARTE L.C.; GÍRIO F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, 2008, 67: 849-864.

CASPETA, L. et al. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. **Appl Energ**, v. 113, p. 277-286, 2014.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H. F. **Processos Químicos Industriais II: Papel e Celulose**. Lorena: 2009, 30 p. Apostila.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **Int Biodeter biodegr**, v. 59, p. 85-89, 2007

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A Geração Termoeletrica com a Queima do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Brasil - Análise do Desempenho da Safra 2009-2010**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 30 de setembro de 2014.

CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C. ; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 285-294, 2016.

COSTA, S. M. et al. Use of sugarcane straw as a source of cellulose for textile fiber production. **Industrial Crops and Products**. v. 42, pag. 189-194, 2013.

CRUZ, S. H. et al. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, p. 439-447, 2012.

CTC, 2012. Centro de Tecnologia Canavieira, 2012. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=366&Itemid=1315>. Acesso em: 07/06/2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

DEL RIO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322-338, 2015.

DÍAZ, M. J. et al. Hydrothermal pré-treatment of rapeseed straw. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 2428-2435, 2010.

DIPARDO, J. **Outlook for biomass ethanol production and demand**. Washington: Energy Information Administration, Department of Energy, 2000.

DODD, D.; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Bioenergy**. v.1, p. 2-17, 2009.

ELMEKAWY, A. et al. Valorization of Cereal Based Biorefinery Byproducts: Reality and Expectations. **Environmental Science & Technology**. v.47, p. 9014-9027, 2013.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and paper Chemistry and Technology. Wood Chemistry and Wood Biotechnology**. Berlin, GmbH & Co.KG, 2009. 320 p.

FARINAS C. S. **A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação**. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/919344/1/DOC542011.pdf>. Acesso em: dez. 2015.

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

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, p. 65-76, 2010.

FESTUCCI-BUSELLI R.A.; OTONI W.C.; JOSHI C.P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, 19(1): 1–13, 2007,

FITZPATRICK, M. et al. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresources Technology**, v. 101, p. 8915-8922, 2010.

FOCKINK, D. H.; MACENO, M. A. C.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresources Technology**, v. 187, p. 91-96, 2015.

GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. **Process Biochemical**, v. 38, p. 1003-1018, 2003.

GARROTE G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 57, i. 3, p. 191-202, 1999.

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

GODFREY, T.; WEST, S. **Introduction to industrial enzymology**. In *Industrial Enzymology*. 2. ed. London: Macmillan Press, 1996, p. 1-8.

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

GUERFALL, M. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 25-42, 2015.

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

HAYKIR, N.I; BAKIR, U. Ionic liquid pretreatment allows utilization of high substrate loadings in enzymatic hydrolysis of biomass to produce ethanol from cotton stalks. **Industrial Crops and Productions**, v. 51, p. 408-414, 2013.

HEIDARI, N; PEARCE, J.M. A Review of Greenhouse Gas Emission Liabilities as the Value of Renewable Energy for Mitigating Lawsuits for Climate Change Related Damages. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 55C (2016) pp. 899-908. DOI: 10.1016/j.rser.2015.11.025

HENDRIKS A.T.W.M.; ZEEMAN G.; Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol**, 2009, 100: 10–18.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, p. 804-807, 2007.

HOLTZAPPLE, M. et al. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, p. 275-287, 1990.

HU J.; ARANTES V.; SADDLER J.N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect. **Biotechnology for Biofuels**, 2011, 4: 36–49.

HU F.; RAGAUSKA A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **BioEnergy Research** , 2012, 5: 1043-1066.

JU, X. et al. Investigating commercial cellulose performances toward specific biomass recalcitrance factors using reference substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 4409-4420, 2014.

IMMAN, S. et al. Autohydrolysis of Tropical Agricultural Residues by Compressed Liquid Hot Water Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1982-1995, 2013.

IOELOVICH, M.; MORAG, E. High-solids hydrolysis. **BioResources**, v. 7(4), p. 4672-4682, 2012.

JIANG, W. et al. Liquid hot water pretreatment on different parts of cotton stalk to facilitate ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 175-180, 2015.

KADAM, K.L.; RYDHOLM, E.C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 698-705, 2004.

KAWAI, T. et al. Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, p. 1741-1749, 2012.

KIM, D.S. et al. Evaluation of hot compressed water pretreatment and enzymatic saccharification of tulip tree sawdust using severity factors. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 460-466, 2013.

KINNARINEN, T; HAKKINEN, A. Influence of enzyme loading on enzymatic hydrolysis of carboard waste and size distribution of the resulting fiber residue. **Bioresource technology**, v. 159, p. 136-142, 2014.

KLOCK U. et al. **Química da Madeira: manual didático**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels**. 2:11, 2009.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. **Biotechnol Biofuels**, 6:63, 2013. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/63>>. Acesso em: dez. 2015.

LABAT, G.A.; GONÇALVES, A.R. Oxidation in acidic medium of lignins from agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, p.151-161, 2008.

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

LEAL, M. R. L. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 11-19, 2013.

LEE, H.V; HAMID, S.B.A; ZAIN, S.K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-20, 2014.

LEU, S.; ZHU, J. Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: Our recent understanding. **Bioenerg. Res.**, v. 6(2), p. 405-415, 2013.

LI, M. F; CHEN, C.Z; SUN, R.C. Effect of pretreatment severity on the enzymatic hydrolysis of bamboo in hydrothermal deconstruction. **Cellulose**, v. 21, p. 4104-4117, 2014.

LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112-118, 2014.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, n.3, p. 506-577, 2002. YANG et al., 2011;

MACEDO, I. C. As fontes de Energia para GD Gerando energia elétrica com biomassa da cana: início de um ciclo virtuoso. Rio de Janeiro: INEE, 2004. Seminário de Geração Distribuída.

- MÄKI-ARVELA, P. et al. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- A Review. **Chemical Review**, v. 111, p. 5638-5666, 2001.
- MANZANARES, P. et al. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 86, p. 881-887, 2011.
- MANSFIELD, S.D., MOONEY, C., SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p.804-816, 1999.
- MENDES, C.V.T; ROCHA, J.M.S; CARVALHO, M.G.V.S. Valorization of residual streams from pulp and paper mills: Pretreatment and bioconversion of primary sludge to bioethanol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 19398-19404, 2014.
- MESA, L. et al. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. **J Chem Technol Biot**, v. 85, p. 1092-1098, 2010.
- MIÃO, Y. et al. Kinect studies on the product inhibition of enzymatic lignocellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 358-366, 2012.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MIN, D. et al. Minimizing inhibitors during pretreatment while maximizing sugar production in enzymatic hydrolysis through a two-stage hydrothermal pretreatment. **Cellulose**, v.22, n. 2 , p. 1253-1261, 2015.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.
- MOOD, S.H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol**. 2009. 101 f. (Dissertação), Escola de Engenharia de Lorena-USP, Lorena, 2009.
- MUSSATTO, S. I. et al. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711-721, 2008.
- NANDA, S. et al. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conv. Bioref.**, v. 4, p. 157-191, 2014.
- NITSON, C.K; MATIS, K. A.; TRIANTAFYLLIDIS, K.S. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. **ChemSusChem**, v. 6, p. 110-122, 2013.

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

OLIVEIRA, F.M.V. et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168-173, 2013.

OLIVEIRA, L.R.M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Productions**, v. 58, p. 1-7, 2014.

OUYANG, J. et al. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. **Bioresour. Technol.**, v. 146, p. 288-293, 2013.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transaction of the Royal Society A**, v. 321(1561): 523-536, 1987.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. Tese de Doutorado. University of Technology. Finland, 2004.

PARAJULI, R. et al. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 244-263, 2015.

PEREIRA Jr. N.; COUTO M.A.P.G.; SANTA ANNA L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In: Series on **Biotechnology**. Ed. Amiga Digital, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008, v.2, 45 p.

PEREIRA, L. T. C. et al. Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological data as criteria for impeller selection. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 901-907, 2011.

PHITSUWAN, P; SAKKA, K; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 390-405, 2013.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 67 f. (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

POPP J. et al. The effect of bioenergy expansion: Food, energy and environment. **Renew Sust Energ Rev**. 2014; 32: 559-578

PURI, J. D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Improving the performance of enzyme in hydrolysis of high solid paper pulp derived from MSW. **Biotechnol Biofuels**, 6:107, 2013.

RABELO S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 163, 2010.

RAMACHANDRIYA, K. D. et al. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfate pretreated Eastern redcedar. **Bioresource Technol**, v. 147, p. 168-176, 2013.

RAMOS, L. P. A química envolvida no tratamento de vapor de materiais lignocelulósicos. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAMOS, L. P. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technol**, v. 175, p. 195-202, 2015.

RÍPOLI, T. C. C.; MOLINA Jr, W. F.; RÍPOLI, M. L. C. Energy potencial of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia agricola**. v. 57, n.4, p. 677-681, 2000.

ROCHA, G.J.M. et al. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: fifth brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components, 1997, Curitiba. **Proceedings...** Curitiba: Sépia Editora e Gráfica, 1997.

ROBERTS, K. M. et al. The effects of water interactions in cellulose suspension on mass transfer and saccharification efficiency at high solids loadings. **Cellulose**, v. 18, p. 759-773, 2011.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v.34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

RUIZ, H. A. et al. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw-effect of particle size and process conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 88-94, 2011.

SAHA, B. C. et al. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367-372, 2013.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recente developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337-353, 2015.

SAMANIEGO, M. R. P. **Uso de biocombustível da pirólise rápida da palha de cana em um motor de ciclo Otto.** 2007. 100 f. (Dissertação), UNICAMP, Campinas, 2007.

SANTOS, A. C.; PEIXOTO, R. A. Efeito da adição de etanol à gasolina na emissão de gases do efeito estufa. **Science & Engineering Journal**, v. 17, p. 33-41, 2008.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol por *Saccharomices cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, p. 904-908, 2010.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012

SANTOS F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Quím. Nova**, v.37, 56-62, 2013.

SATTLER W. et al. The effect enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnol Bioeng**, 1989, 33: 1221–1234.

SCHUTZ, F.; MASSUQUETTI, A.; ALVES, T. W. D. Semanda e oferta energética: uma perspectiva mundial e nacional para o etanol. **REGET/UFMS**, v. 16 n. 16, p. 3167 – 3186, 2013.

SILVA G.M. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G**. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SILVA, A.S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.

SILVA, A. S. et al. Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production, Sustainable Degradation of Lignocellulosic **Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**, Dr. Anuj Chandel (Ed.), ISBN: 978-953-51-1119-1, InTech, DOI: 10.5772/53378 (2013)

SLUITER, A. et al. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory. Golden: Colorado**, 2008.

SORDI, R. A; MANECHINI, C. Utilization of trash: a view from the agronomic and industrial perspective. **Scientia Agricola**. v. 70, n. 5, 2013.

SUBHEDAR, P.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: A Review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 11816-11828, 2013.

SUGARCANE.ORG – Brazil’ Diverse Energy- Matrix. Disponível em: <<http://sugarcane.org/the-brazilian-experience/brazils-diverse-energy-matrix>> Acesso em: 03/05/2015.

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

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**. v. 199, 49-58, 2016.

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

TOQUERO, C; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, pag. 68-76, 2014.

ÚNICA – **Histórico de Produção e Moagem-Por Safra**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>> Acesso em: 03/05/2015.

US Department of Energy Genome Programs <<http://genomics.energy.gov>>) Acesso em: 20/05/2014.

VALLEJOS, M. E. et al. Kinect study of the extraction of hemicellulosic carbohydrates from sugarcane bagasse by hot water treatment. **Industrial crops and Products**, v. 67, p. 1-6, 2015.

VIKARI, L, VEHMAANPERA J, KOIVULA A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass Bioenerg**. 2012, 46: 13-24.

VU-BACH, Q.; TRAN, K. Q.; SKREIBERG. Hydrothermal pretreatment of fresh forest residues effects of feedstock pre-drying. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 76-83, 2016.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Appl Energy** , v. 99, p. 23-31, 2012.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 147 f. (Dissertação) em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, 2011.

WRIGHT, M. M.; BROWN, R. C. Comparative economics of biorefineries based on the biochemical and thermochemical platforms. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v.1, 0. 49-56, 2007.

WU, M. et al. Integration of mild acid hydrolysis in γ -valerolactone/water system for enhancement of enzymatic saccharification from cotton stalk. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 23-28, 2016.

XIÃO, Z. et al. Effects of sugar inhibition on cellulose and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, p1115-1126, 2004.

XIÃO, L. P. et al. Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 73-81, 2013.

YANG, B. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p.421-450, 2011.

YU, Q. et al. Pretreatment of Rice Straw by a Hot-Compressed Water Process for Enzymatic Hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, p. 539-551, 2010.

YU, X. et al. Measurement of filter paper activities of cellulose with microplate-based assay. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 93-98, 2016.

ZAKARIA, M. R; HIRATA, S; HASSAN, M. A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 142-148, 2015.

ZHUANG, X. et al. Effect of hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse on enzymatic digestibility. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 90, p. 1515-1520, 2015

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

ZHANG, X. et al. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v.100, p. 5890–5897, 2009.