

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GISLENE MOTA DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR
COM AMÔNIA AQUOSA PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL**

SÃO CARLOS – SP

Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GISLENE MOTA DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM
AMÔNIA AQUOSA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL**

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

Orientação: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

Co-Orientação: Profa. Dra. Rosineide Gomes da Silva

SÃO CARLOS – SP

Fevereiro de 2011

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

S586pb

Silva, Gislene Mota da.

Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol / Gislene Mota da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

104 f.

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

1. Engenharia bioquímica. 2. Biomassa. 3. Pré-tratamento alcalino. 4. Amônia aquosa. 5. Hidrólise enzimática. 6. Fermentação alcoólica. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
GISLENE MOTA DA SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 28 DE FEVEREIRO DE 2011.

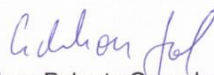
BANCA EXAMINADORA:



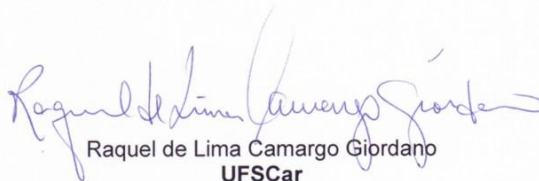
Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar



Rosineide Gomes da Silva
Co-orientadora, UFSCar



Adilson Roberto Gonçalves
USP



Raquel de Lima Camargo Giordano
UFSCar

*Este trabalho é dedicado a
Deus e a toda minha família
que sempre me apoiou.
Muito Obrigada.*

Na hora de resolver um problema, não descreia da solução, como quem começa a viajar sem esperança de atingir o destino.

Descrença é mente fraca.

Seja forte e reaja.

Sobretudo, acredite que o problema não existe, existindo apenas um conjunto de idéias que, se achar difícil, é um problema e, se achar fácil, nada é.

Seguro os pensamentos para não caírem na dúvida.

Reconheça-se com a força de um gigante e nada veja como imodificável.

Reduza o problema.

Uma pessoa é pequena frente ao mar, mas grande frente a um pingô.

AGRADECIMENTOS

A minha família Mãe, Pai e Irmã, que sempre me incentivaram e me apoiaram ao longo da realização desse trabalho.

Aos Professores Antonio José Gonçalves da Cruz e Rosineide Gomes da Silva pela orientação, conselhos e apoio.

Aos amigos dos Laboratórios Geral, Controle, Tecnologia Enzimática e Simulação.
Agradeço a todos, pelo grande companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar por tornar possível a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro para a realização do curso de mestrado.

Ao projeto temático BIOEN-FAPESP pelo apoio financeiro.

À empresa Genencor pelo fornecimento das enzimas utilizadas neste trabalho.

E a todas as outras pessoas que, de maneira direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Sumário	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivos específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Cana de açúcar	5
2.2 Leveduras	6
2.3 Metabolismo da glicose	7
2.4 Produção de etanol	10
2.5 Materiais lignocelulósicos	12
2.5.1 Estruturas das fibras e fibrilas	13
2.5.2 Celulose	14
2.5.3 Hemicelulose	16
2.5.4 Lignina	18
2.5.5 Extrativos	20
2.6 Pré-tratamento	20
2.6.1 Amônia aquosa	23

2.7 Hidrólise	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Bagaço de cana de açúcar	32
3.2 Enzimas	33
3.3 Microorganismos	33
3.4 Pré-tratamento do bagaço de cana	33
3.4.1 Pré-tratamento com amônia aquosa a temperatura ambiente	35
3.4.2 Pré-tratamento do bagaço explodido com amônia aquosa a 50°C	35
3.4.3 Pré-tratamento do bagaço <i>in natura</i> com amônia aquosa a 100°C	35
3.4.4 Pré-tratamento do bagaço explodido com amônia aquosa a 100°C	36
3.5 Caracterização química dos bagaços de cana de açúcar	37
3.5.1 Hidrólise ácida	37
3.5.2 Determinação da lignina solúvel	38
3.5.3 Determinação de lignina insolúvel	38
3.5.4 Determinação de cinzas da lignina e do bagaço	39
3.5.5 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos	40
3.5.6 Determinação de hidroximetilfurfural e de furfural	40
3.6 Hidrólise enzimática	41
3.6.1 Determinação da concentração de glicose	41
3.6.2 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 50°C	42
3.6.3 Bagaço <i>in natura</i> pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	42
3.6.4 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	42
3.6.5 Bagaço <i>in natura</i> e explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	43
3.7 Fermentação alcoólica	44
3.7.1 Determinação da concentração de etanol	44
3.7.2 Preparo do inóculo e do meio de fermentação alcoólica	44
3.7.3 Bagaço <i>in natura</i> e explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	47
3.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Caracterização dos bagaços <i>in natura</i> e explodido	50
4.1.1 Caracterização dos bagaços pré-tratados a temperatura ambiente 24 ± 3 °C	54
4.1.2 Caracterização dos bagaços pré-tratados a 50°C	63
4.1.3 Caracterização do bagaço <i>in natura</i> pré-tratado a 100°C	68
4.1.4 Caracterização do bagaço explodido pré-tratados a 100°C	71
4.2 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica	75
4.2.1 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 50°C	75
4.2.2 Bagaço <i>in natura</i> pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	81
4.2.3 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C	83
4.2.4 Bagaço <i>in natura</i> e explodido pré-tratados com amônia aquosa a 100°C	85
5. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE A: Cromatogramas das análises dos hidrolisados para o bagaço explodido não tratado com NH ₄ OH e pré-tratados a 50°C	101

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa da produção de cana de açúcar	6
Figura 2. Diagrama do catabolismo da glicose em células de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal	13
Figura 4. Unidade de celobiose	14
Figura 5. Cadeias com extremidades não redutora e redutora do polímero de celulose	15
Figura 6. Posição das ligações inter e intramoleculares	16
Figura 7. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses	17
Figura 8. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de <i>Fagus sp</i>	19
Figura 9. Estrutura dos precursores da lignina	19
Figura 10. Regiões específicas da celulose	28
Figura 11. Modo de ação do complexo celulásico de <i>T. reesei</i>	29
Figura 12. Fluxograma das etapas envolvidas no estudo do pré-tratamento das amostras de bagaço de cana de açúcar <i>in natura</i> e explodido não lavado	31
Figura 13. Fotografia ilustrando amostra de bagaço <i>in natura</i> (matéria-prima proveniente da Usina Iracema, gentilmente cedida pelo CTC, Piracicaba, SP)	32

- Figura 14. Fotografia ilustrando amostra de bagaço explodido. Condições de pré-tratamento: explosão a vapor a 17 kgf, 205°C, tempo de reação 20 minutos (matéria-prima gentilmente cedida pelo CTC, Piracicaba, SP) 32
- Figura 15. Fotografia ilustrando reator de aço inoxidável (autoclave) utilizado nos experimentos de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar 34
- Figura 16. Planejamento dos experimentos de fermentação a partir dos hidrolisados provenientes do bagaço *in natura* 47
- Figura 17. Planejamento dos experimentos de fermentação a partir dos hidrolisados provenientes do bagaço explodido 47
- Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos bagaços *in natura* (A) e explodido (B) 53
- Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* (A) não tratado com amônia aquosa, (B) *in natura* tratado por 7 dias, (C) *in natura* tratado por 15 dias e (D) *in natura* tratado por 30 dias 55
- Figura 20. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente) 56
- Figura 21. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente) 57
- Figura 22. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente) 57
- Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado: (A) não tratado, (B) explodido tratado por 7 dias, (C) explodido tratado por 15 dias e (D) explodido tratado por 30 dias 59

- Figura 24. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente) 60
- Figura 25. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente) 61
- Figura 26. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente) 61
- Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado (A) não tratado, (B) tratado com solução de NH_4OH por 30 min, (C) tratado com solução de NH_4OH por 60 min e (D) tratado com solução de NH_4OH por 90 min 64
- Figura 28. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C) 65
- Figura 29. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C) 66
- Figura 30. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C) 66
- Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço *in natura*: (A) não tratado, (B) tratada com solução 4% (m/m) de NH_4OH , (C) tratada com solução 10% (m/m) de NH_4OH e (D) tratada com solução 15% (m/m) de NH_4OH 70
- Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado (A) não tratado com solução de NH_4OH , (B) explodido tratado com 5% NH_4OH , (C) explodido tratado com 10% NH_4OH e (D) explodido tratado com 15% NH_4OH 73
- Figura 33. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 30 minutos 75

Figura 34. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado por 30 minutos	76
Figura 35. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 60 minutos	77
Figura 36. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado por 60 minutos	77
Figura 37. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 90 minutos	78
Figura 38. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado 90 minutos	78
Figura 39. Concentração de glicose ao longo de experimento de hidrólise enzimática do bagaço explodido (cominuído a 20 mesh)	79
Figura 40. Conversão em glicose do bagaço explodido (cominuído a 20 mesh)	79
Figura 41. Concentração de glicose ao longo dos experimentos empregando bagaço <i>in natura</i> não tratado com amônia aquosa e bagaço <i>in natura</i> pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 4, 10 e 15% (m/m)	81
Figura 42. Concentração de etanol dos bagaços <i>in natura</i> não tratado e pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 4, 10 e 15% (m/m)	82
Figura 43. Concentração de glicose ao longo dos experimentos empregando bagaço explodido não tratado e explodido pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/m)	83
Figura 44. Concentração de etanol do bagaço explodido não tratado e pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/m)	84

Figura 45. Concentração de glicose do bagaço *in natura* pré-tratado com solução de NH_4OH 10% (m/m) 85

Figura 46. Concentração de etanol do bagaço *in natura* em várias condições de preparo de inóculo 86

Figura 47. Concentração de glicose do bagaço explodido pré-tratado com 15% de solução de NH_4OH 87

Figura 48. Concentração de etanol do bagaço explodido em várias condições de preparo de inóculo 88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Proporção da mistura de álcool anidro à gasolina	11
Tabela 2. Composição média do bagaço de cana de açúcar.	12
Tabela 3. Comparações das condições e desempenho das hidrólises	27
Tabela 4. Condições de pré-tratamentos estudados neste trabalho	34
Tabela 5. Condições experimentais empregadas nos experimentos de hidrólise enzimática	41
Tabela 6. Composição do meio de inoculação	45
Tabela 7. Composição dos meios de fermentação	46
Tabela 8. Composição dos meios de inoculação (inóculos denominados de “rico” e “pobre”)	48
Tabela 9. Composição dos meios de fermentações “rico” e “pobre”	49
Tabela 10. Composição química das amostras de bagaço <i>in natura</i> e explodido não lavado	50
Tabela 11. Fatores de conversão para a celulose	51
Tabela 12. Fatores de conversão para a hemicelulose	51
Tabela 13. Composição química do bagaço de cana <i>in natura</i>	51
Tabela 14. Composição química do bagaço de cana explodido não lavado	52

Tabela 15. Composição do bagaço <i>in natura</i> e explodido (Gouveia <i>et al.</i> , 2009)	52
Tabela 16. Composição química das amostras de bagaço <i>in natura</i> tratadas por 7, 15 e 30 dias a temperatura ambiente 24 ± 3 °C	54
Tabela 17. Razões das principais frações do bagaço em função do tempo de reação para os experimentos realizados com amostras de bagaço <i>in natura</i> tratadas com solução de hidróxido de amônio (28% m/m) a 24 ± 3 °C	56
Tabela 18. Composição química do bagaço explodido não lavado tratado por 7, 15 e 30 dias a temperatura ambiente, 24 ± 3 °C	58
Tabela 19. Razões das principais frações do bagaço em função do tempo de reação para os experimentos realizados com amostras de bagaço explodido não lavado tratadas com solução de hidróxido de amônio (28% m/m) a 24 ± 3 °C	60
Tabela 20. Composição química do bagaço explodido tratado por 30, 60 e 90 minutos	63
Tabela 21. Resumo das correlações de todos os experimentos utilizando bagaço explodido tratado com 15% de solução de amônia aquosa a 50°C	65
Tabela 22. Composição química do bagaço <i>in natura</i> tratado com solução de NH ₄ OH 4, 10 e 15%	68
Tabela 23. Valores corrigidos da caracterização química das amostras de bagaço <i>in natura</i> tratadas com 4, 10 e 15% de solução de NH ₄ OH	69
Tabela 24. Composição química das amostras de bagaço explodido tratadas com solução de NH ₄ OH 5, 10 e 15%	71
Tabela 25. Valores corrigidos da composição das amostras de bagaço explodido tratadas com 5, 10 e 15% de solução de NH ₄ OH	72

Tabela 26. Resultados obtidos nos pré-tratamentos realizados a temperatura de 100°C para os bagaços <i>in natura</i> e explodido	74
Tabela 27. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação das amostras de bagaço explodido não tratado e pré-tratados com solução de NH ₄ OH 15% (m/m)	80
Tabela 28. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica das amostras do bagaço <i>in natura</i> não tratado e pré-tratados a 100°C	82
Tabela 29. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação das amostras do bagaço explodido não lavado e pré-tratados a 100°C	84
Tabela 30. Influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica do hidrolisado proveniente da amostra de bagaço <i>in natura</i>	86
Tabela 31. Influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica do hidrolisado proveniente da amostra de bagaço explodido	88
Tabela 32. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica das amostras dos bagaços <i>in natura</i> e explodido pré-tratados	89

Lista de Abreviaturas

AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATP	Adenosina Trifosfato
BIOEN	Programa FAPESP de Pesquisa em Bioenergia
BG	β -glucosidase
CBU/g	Cellobiase Unit per gram (Unidade de Celobiase por grama)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EG	Endoglucanase
FPU/g	Filter Paper Unit per gram (Unidade de Papel de Filtro por grama)
GP	Grau de Polimerização
HMF	Hidroximetilfurfural
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NADH	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
RID	Índice de Refração
SAA	Soaking in Aqueous Ammonia
SCB	Sugar Cane Bagasse
SEAA	Soaking in Ethanol and Aqueous Ammonia
SFS	Sacarificação e Fermentação Separadas
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
UV/VIS	Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta e Visível

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a etapa de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar empregando amônia aquosa, um método alcalino. Amostras de bagaço (*in natura* e explodido a vapor não lavado) foram tratadas na proporção 1:5 (massa de bagaço seco por massa de solução de NH_4OH), em escala de bancada. Ensaios preliminares foram realizados empregando solução 28% (m/m) de NH_4OH , a temperatura ambiente 24 ± 3 °C por 7, 15 e 30 dias em recipiente fechado. Nestes experimentos verificou-se que o pré-tratamento foi seletivo na remoção de lignina e hemicelulose. Novos experimentos foram realizados fixando-se a temperatura em 50°C e a concentração de NH_4OH em 15%. Avaliaram-se tempos de reação de 30, 60 e 90 min. Nestes pré-tratamentos o mesmo comportamento foi observado. Nos próximos ensaios o tempo de reação foi fixado em 60 min e a temperatura em 100°C. Amostras de bagaço foram pré-tratadas em soluções de NH_4OH (4 a 15%). Experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos de Erlenmeyer (50°C, pH 4,8 e 250 rpm) empregando 30 FPU/g bagaço (Accellerase 1500, Genencor) e 5 CBU/g bagaço (BG, Genencor). Na hidrólise das amostras de bagaço *in natura* (pré-tratadas com soluções de NH_4OH 4, 10 e 15%, 60 min, 100°C) com carga de sólidos de 3% a melhor conversão em glicose foi de 64,2% (amostra tratada NH_4OH 10%). Na hidrólise da amostra de bagaço explodido (pré-tratadas com NH_4OH 5, 10 e 15%, 60 min e 100°C) com carga de sólidos de 7% a melhor conversão em glicose foi de 79,9% (amostra tratada com NH_4OH 15 %). Hidrólises com maior carga de sólidos, 5% (bagaço *in natura*) e 10% (bagaço explodido), utilizando 30 FPU/g celulose (Accellerase 1500, Genencor) foram realizadas. Nestes ensaios obteve-se conversão em glicose de 69,6% (bagaço *in natura*) e 82,2% (bagaço explodido). Experimentos de fermentação alcoólica (250 rpm, 30°C) foram realizados empregando levedura *Saccharomyces cerevisiae* (comercial e industrial) em meios de cultivo denominados “rico” e “pobre”. A eficiência na conversão da glicose em etanol nos experimentos foi acima de 78% (meio “pobre”) e da ordem de 88% (meio “rico”). A levedura industrial apresentou eficiência um pouco superior à comercial. As amostras de bagaço (antes e após o pré-tratamento) foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Palavras-chave: Biomassa, pré-tratamento alcalino, amônia aquosa, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The aim of this work was evaluated the sugarcane bagasse (SCB) pretreatment by aqueous ammonia, an alkaline method. Samples of SCB (*in natura* and steam exploded unwashed) were pretreated with ammonium hydroxide solution (NH₄OH) at 1:5 solid-liquid ratio (by weight), in a bench scale. Preliminary assays were carried out employing NH₄OH solution (28% w/w) at room temperature 24 ± 3 °C by 7, 15 and 30 days. In these experiments, it was observed that the pretreatment was selective in removing lignin and hemicellulose. New experiments were carried out using at 50°C and NH₄OH 15% during 30, 60 and 90 minutes. In these pretreatments the same behavior was observed. In the next assays, it decided to fix the reaction time in 60 minutes and the temperature in 100°C. Samples of *in natura* and steam exploded SCB were pretreated at different NH₄OH concentrations (4 to 15%). Enzymatic hydrolysis assays were carried out in Erlenmeyers flasks (50°C, pH 4.8 and 250 rpm) using 30 FPU/g bagasse (Accellerase 1500, Genencor) and 5 CBU/g bagasse (BG, Genencor). Experiments were carried out employing *in natura* SCB (pretreated conditions 4, 10 and 15% NH₄OH solution, 60 min., 100°C) with 3% of solid loading. A glucose conversion of 64.2% was reached in the best condition (10% NH₄OH solution). Experiments were carried out employing steam exploded SCB (5, 10 e 15% NH₄OH solution, 60 min. and 100°C) with 5% of solid loading. A glucose conversion of 79.9% was reached in the best condition (15% NH₄OH solution). Hydrolysis experiments using higher solid loading (5% for *in natura* and 10% for steam exploded) and 30 FPU/g cellulose (Accellerase 1500) were carried out. A glucose conversion of 69.6% for *in natura* and 82.2% for steam exploded SCB were obtained. Fermentation assays (250 rpm, 30°C) employing commercial and industrial *Saccharomyces cerevisiae* were conducted, in a “rich” and “poor” medium. A theoretical fermentation yield up to 78% was found for the “poor” medium and around 88% for the “rich” medium. The industrial *S. cerevisiae* shows a value of yield slightly superior to those of commercial strain. Samples of SCB (before and after pretreatment) were analyzed by scanning electron micrograph (SEM).

Key-words: Biomass, alkaline pre-treatment, aqueous ammonia, enzymatic hydrolyzes and alcoholic fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são uma fonte de energia não renovável e demoram milhões de anos para se formarem, por isso, nas últimas décadas grandes esforços foram feitos para o desenvolvimento dos biocombustíveis. Ao contrário dos combustíveis fósseis, os biocombustíveis são fontes de energias renováveis produzidos a partir de matérias orgânicas, como a cana de açúcar. Existem vários tipos de biocombustíveis, tais como o bioetanol, o biodiesel, a biomassa e o biogás (Bioetanol, 2008).

No Brasil a produção de bioetanol a partir da cana de açúcar é o principal combustível substituto da gasolina, sendo empregado na forma hidratada para motores movidos a álcool e na forma anidra quando misturado na gasolina (Martins, 2009). Novas tecnologias foram empregadas nas últimas décadas com perspectiva de evolução no setor com novos produtos obtidos a partir da cana de açúcar.

O etanol celulósico é uma das alternativas sustentáveis para obtenção de combustível renovável, pois utiliza resíduos lignocelulósicos como fonte de energia sendo, portanto, de grande importância para o meio ambiente, pois diminui a emissão de gases poluentes para a atmosfera.

Os materiais lignocelulósicos são muito abundantes no Brasil e podem ser obtidos de vários processos agro-industriais, tais como as usinas de açúcar e álcool. Estes resíduos agro-industriais contêm grandes quantidades de açúcares fermentescíveis que podem ser hidrolisados e fermentados para a produção de etanol de segunda geração.

O bagaço de cana de açúcar é constituído basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser quebrada. A sua hidrólise completa gera glicose (açúcar de seis carbonos fermentescível). A hemicelulose é constituída de cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose entre outras, a sua hidrólise é mais fácil que a da celulose, mas a fermentação das pentoses (açúcar de cinco carbonos) não é tão desenvolvida como a da glicose. Para se produzir o etanol celulósico é necessário a deslignificação do bagaço, tratamento das pentoses que estão contidas na hemicelulose e hidrólise da celulose. Por fim, a lignina não está relacionada às moléculas de açúcares simples, portanto não é relacionada à produção de bioetanol por rotas fermentativas (Bioetanol, 2008).

As etapas para a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica se resumem em pré-tratamento do bagaço, deslignificação, hidrólise e fermentação. No pré-tratamento se faz a quebra do material lignocelulósico a fim de torná-lo mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos. A etapa seguinte consiste na hidrólise da celulose, também denominada de pré-tratamento, e na remoção da lignina (Bioetanol, 2008).

A fermentação dos açúcares redutores hidrolisados da biomassa segue o mesmo princípio da produção com base em açúcares e amido. O ponto crucial é ter uma conversão máxima dos açúcares com o menor custo possível (Baudel, 2006).

Novas tecnologias estão sendo apontadas na literatura para aumentar o rendimento no processo de produção do etanol celulósico como a Fermentação Simultânea das Pentoses e Hexoses que utiliza a fração solúvel e insolúvel do material produzido no pré-tratamento sem separação da lignina-carboidrato, visando maximizar a sacarificação e a concentração de açúcares no hidrolisado (Baudel, 2006).

As hidrólises enzimáticas da produção de bioetanol a partir do bagaço de cana de açúcar levam vantagens (temperaturas moderadas, rendimentos elevados e possibilidade de Sacarificação e Fermentação Simultâneas - SSF) frente às hidrólises químicas. Porém, as rotas enzimáticas têm um custo ainda elevado o que inviabiliza a sua aplicação em escala industrial.

Os processos de hidrólise enzimática devem ser concebidos em função do tipo de substrato produzido, do pré-tratamento utilizado, assim como a estratégia de fermentação utilizada: Hidrólise e Fermentação Simultânea, Hidrólise e Fermentação Consecutiva e Hidrólise e co-Fermentação Simultâneas (Baudel, 2006).

Existe uma grande quantidade de processos de pré-tratamento disponíveis, podendo ser físicos (redução do tamanho das partículas), químicos (ácidos, alcalinos ou oxidativos), biológicos (empregando fungos e algumas bactérias) ou de fracionamento por solvente.

O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa (solução de hidróxido de amônio) tem sido descrito na literatura e apresenta algumas vantagens em relação aos demais tratamentos. Neste pré-tratamento a amônia é utilizada como um reagente para remover a lignina. Em baixas concentrações a amônia não é poluente, não é corrosiva e é de fácil manuseio.

Este trabalho se insere no projeto temático “Bioprocess System Engineering (BSE) applied to the production of bioethanol from sugar cane bagasse” que vem sendo

desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) do Departamento de Engenharia Química da UFSCar (DEQ/UFSCar) com apoio financeiro do programa de bionergia (BIOEN) da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). O trabalho estudou o pré-tratamento alcalino empregando solução de hidróxido de amônio (amônia aquosa) em diferentes condições operacionais. O objetivo foi identificar condição que conduzisse, na fração sólida, a máximos rendimentos de glicose, na etapa de hidrólise, e de etanol, na etapa de fermentação.

1.1 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar a etapa de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar empregando solução de hidróxido de amônio (amônia aquosa). Foram empregadas amostras de bagaço *in-natura* e explodido não lavado. As amostras dos materiais pré-tratados foram submetidas à hidrólise enzimática com o objetivo de avaliar a conversão em glicose. Os hidrolisados obtidos foram utilizados em experimentos para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1.1 Objetivos específicos

- ❖ Realizar experimentos de pré-tratamento empregando amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado estudando variáveis como a concentração da solução de NH_4OH , a temperatura e o tempo de reação;
- ❖ Caracterizar quimicamente e fisicamente (MEV) as amostras do bagaço de cana de açúcar *in-natura* e explodido a vapor não lavado, antes e após a etapa de pré-tratamento, determinando os teores dos seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina total;
- ❖ Realizar experimentos de hidrólise enzimática empregando as diferentes amostras pré-tratadas de bagaço *in natura* e explodido a vapor não lavado em diferentes cargas de sólido e de enzimas. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* (rotação de 200/250 rpm, pH 4,8 da solução e temperatura da hidrólise enzimática 50°C);
- ❖ Realizar experimentos de fermentação alcoólica utilizando os hidrolisados obtidos a partir das amostras pré-tratadas nas diferentes condições experimentais. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* (rotação de 250 rpm e temperatura da fermentação alcoólica 30°C) empregando levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana de Açúcar

A cana de açúcar tem sua origem no sudeste asiático e pertence a família das angiospermas, a *Poaceae*. São herbáceas, perene, com nós (de onde saem gemas) e entrenós, epiderme característica, raiz fasciculada e flores monóclinas. As folhas da cana de açúcar são alternas ou opostas, possuem nervuras paralelinérvias e bainhas largas, são lineares e podem chegar a 140 centímetros de comprimento. O seu fruto é bem pequeno, do tipo cariopse. Dentre seus constituintes estão a sacarose, as fibras, o ácido ascórbico, o ácido hidrocianico e sais minerais (Moreira *et al.*, 2008).

A exploração canavieira no início foi sobre a espécie *S. officinarum*, mas com o surgimento de doenças houve a necessidade do cruzamento da *S. officinarum* com as quatro outras espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, através de recruzamento com as ascendentes. A cana de açúcar tem inúmeras aplicações podendo ser empregada in natura, sob a forma de forragem, para alimentação animal ou como matéria-prima para a fabricação de aguardente, melaço, açúcar e álcool.

No Brasil a cana de açúcar foi trazida pelos portugueses na primeira década do século XVI, sendo desenvolvida com sucesso no nordeste brasileiro, principalmente em faixas litorânea. O Brasil se tornou o principal produtor e exportador de açúcar nos séculos XVI e XVII. A Figura 1 apresenta um mapa das regiões produtoras de cana de açúcar em 2008.

Atualmente no Brasil, a produção de cana de açúcar se concentra na região Centro-Sul, principalmente no interior do estado de São Paulo que se destaca pelo volume produzido (UNICA, 2008).

Na produção de bioetanol pelas usinas brasileiras a cana é processada com a retirada do colmo (caule), que é esmagado, liberando o caldo. Este é concentrado, resultando no mel, a partir do qual se obtém o açúcar (por cristalização). O subproduto deste processo, o melaço, ou mel final, é então combinado com o caldo de segunda e encaminhado para dornas de fermentação, onde se obtém o etanol.

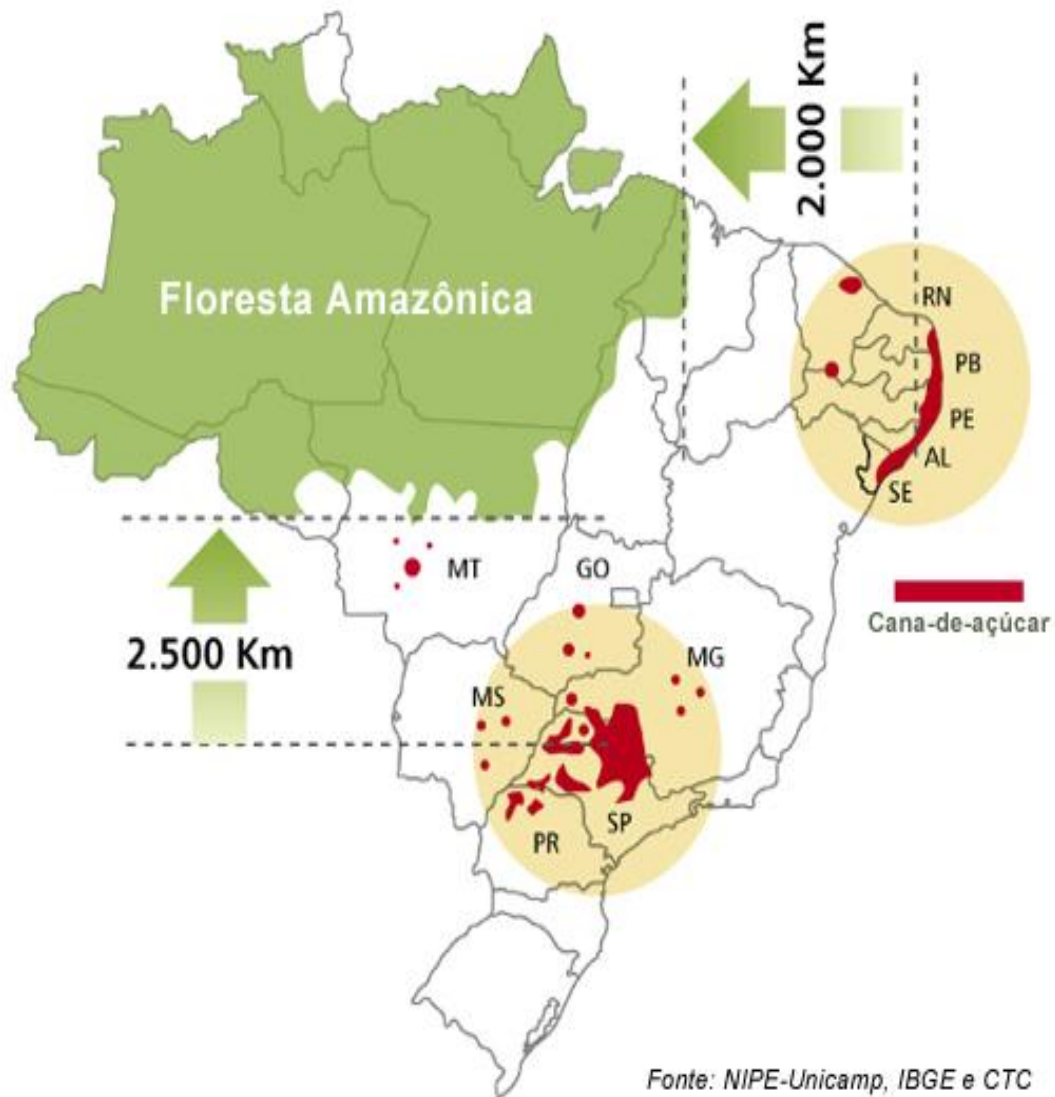


Figura 1. Mapa da produção de cana de açúcar. Nas áreas em vermelho concentram-se as plantações e usinas produtoras de álcool, açúcar e co-geração de energia elétrica (UNICA, 2008).

2.2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricas ou ovais, são amplamente encontradas na natureza. As leveduras de brotamento, como *Saccharomyces*, reproduzem-se formando células desiguais de forma

assexuada. No brotamento a célula parental forma uma protuberância na sua superfície externa e à medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. A membrana celular é sintetizada entre a célula parental e o broto. E assim, o broto se separa da célula parental. Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células filhas por brotamento (Lehninger, 2002).

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo. Podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Isto permite que os fungos sobrevivam em vários ambientes. Se o meio tiver oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono (Lehninger, 2002).

A levedura mais utilizada na produção do etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura apresenta duas vias de utilização de sacarose bem definidas: a hidrólise extracelular pela ação da invertase periplasmática (produzindo glicose e frutose que são captadas e fermentadas pela célula), e outra envolvendo o transporte ativo da sacarose com posterior hidrólise intracelular do açúcar. Porém, a hidrólise extracelular do dissacarídeo é indesejada na produção de etanol combustível, pois contribui para incrementar o estresse osmótico sofrido pelas células, gerado pelos elevados níveis de açúcares redutores formados, e os monossacarídeos liberados no meio podem servir de fonte de carbono para microorganismos contaminantes de processo fermentativo (Dário *et al.*, 2008).

2.3 Metabolismo da Glicose

Glicólise é o processo de quebra e oxidação da glicose que ocorre na ausência de oxigênio (processo anaeróbico), também chamado de via da hexose difosfato.

A glicose é o principal substrato oxidável utilizada pela maioria dos organismos (fonte energética universal). A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é dividida em duas moléculas de piruvato na via glicolítica (Lehninger, 2002).

A glicólise consiste em 10 reações enzimáticas que ocorrem no citosol das células, e utiliza 10% do potencial energético da glicose. A primeira fase da glicólise é chamada de *fase preparatória* que consiste nas cinco primeiras etapas, em que a energia

do ATP (trifosfato de adenosina) é investida para aumentar o conteúdo da energia livre dos intermediários para a formação do produto final, o gliceraldeído 3-fosfato e o seu isômero diidroxiacetona fosfato (Lehninger, 2002).

Na segunda fase da glicólise se tem um ganho líquido de duas moléculas de ATP por molécula de glicose. E a energia também é conservada na formação de duas moléculas de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) para cada molécula de glicose (Lehninger, 2002).

Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado com perda de carboxilato na forma de CO₂, para liberar o Acetil-CoA que no ciclo do ácido cítrico será totalmente oxidado a CO₂ (Lehninger, 2002).

Outra rota para o metabolismo do piruvato é a sua redução a lactato por meio da chamada via da fermentação do ácido láctico. E a terceira grande rota do metabolismo do piruvato leva a produção de **etanol**, em condições anaeróbicas nas leveduras, denominada de fermentação alcoólica (Lehninger, 2002).

A glicólise libera apenas uma pequena fração da energia total disponível na molécula da glicose, as duas moléculas de piruvato formadas pela glicólise ainda retém a maior parte da energia potencial química existente na molécula da glicose (Lehninger, 2002).

A glicose é catabolisada pela *Saccharomyces cerevisiae* pela *via aeróbica* ou *anaeróbica*, para produzir ATP. Na ausência de O₂ a única possibilidade é a via anaeróbica, mas mesmo na presença de oxigênio, a via anaeróbica também é escolhida se a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado *concentração crítica* (C_{crit}) (Barnett, 1976; Entian e Barnett, 1992; Alexander e Jeffries, 1990). A *S. cerevisiae* faz uso exclusivo da via aeróbica somente em concentrações abaixo da concentração crítica (C_{crit}) (Rettori e Volpe, 2000).

A explicação deste comportamento está no fenômeno chamado de *repressão por glicose*. Na presença de concentrações acima da C_{crit}, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do *ciclo de Krebs*, enzimas da *cadeia respiratória* e *estruturas mitocondriais* (Barnett, 1976; Porro *et al.*, 1994). Portanto, atividade mitocondrial reduzida leva o piruvato para *via anaeróbica*, ou seja, para a produção de etanol. Por outro lado, em concentrações de glicose abaixo da C_{crit} e na presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica, porque ao não se encontrarem reprimidos os genes em questão, a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial (Rettori e Volpe, 2000). A Figura 2 ilustra um diagrama do catabolismo da glicose em *Saccharomyces cerevisiae*.

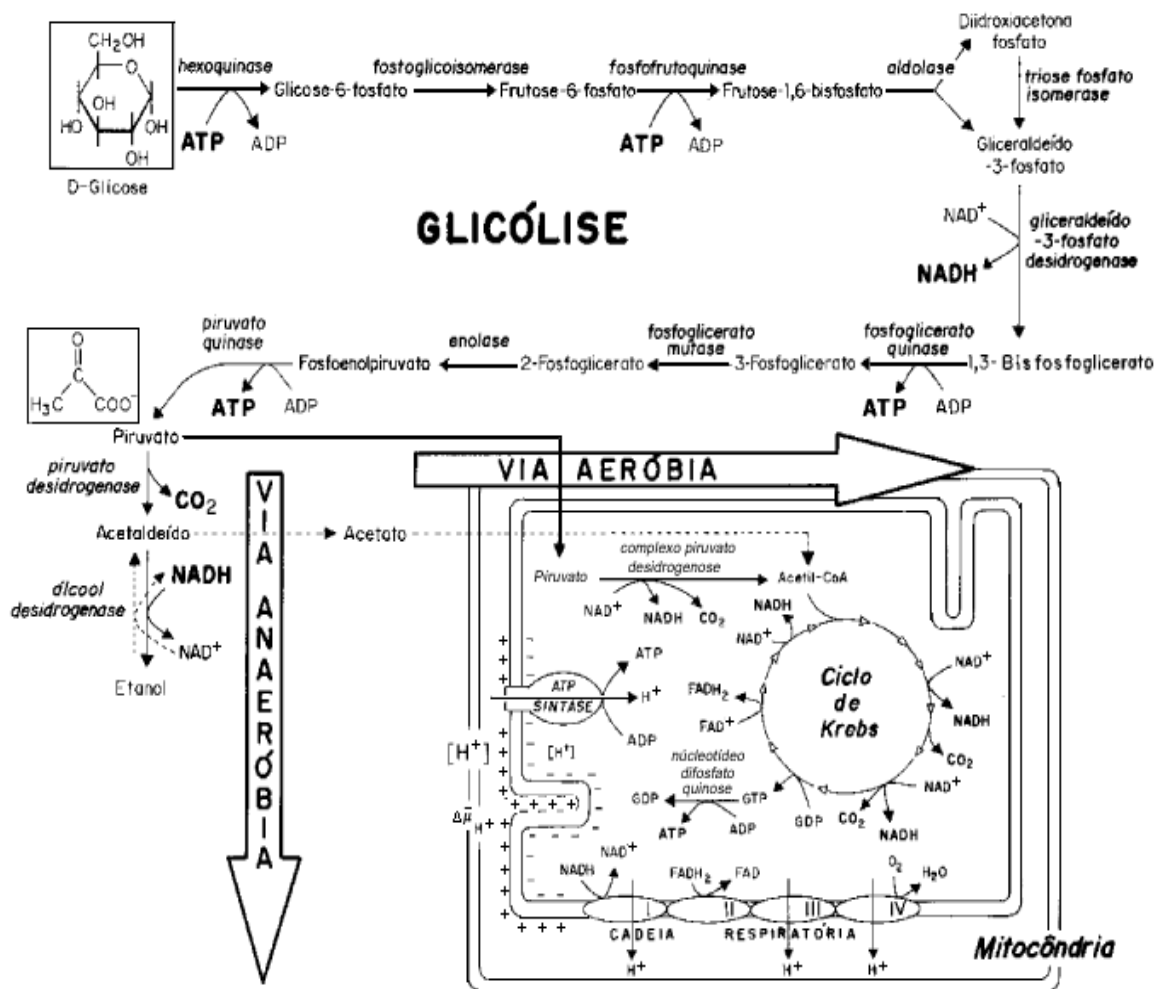


Figura 2. Diagrama do catabolismo da glicose em células de *S. cerevisiae* (Rettori e Volpe, 2000).

A fermentação alcoólica é um processo de baixo rendimento energético no qual o etanol permanece com a maior parte da energia contida na molécula de glicose, energia esta que será utilizada quando o etanol queimar como combustível (Rettori e Volpe, 2000).

Para a produção de etanol, a maioria das usinas emprega o processo de “batelada alimentada” com recirculação e tratamento da levedura (processo Melle-Boinot). Este processo é o mais seguro quando se tem problemas de assepsia e manutenção, pois ao final de cada batelada a dorna é esvaziada e realiza-se a assepsia antes de iniciar uma nova fermentação (Martins, 2009).

2.4 Produção de Etanol

O álcool hidratado começou a ser utilizado no Brasil em larga escala há mais de trinta anos. Com a preocupação mundial devido ao aquecimento global e o aumento no preço do petróleo têm-se expectativas de um grande crescimento na produção de bioetanol. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, que é a matéria-prima mais eficiente para a produção de etanol.

A ascensão do álcool teve início na década de 70, quando foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Nessa época, o mundo enfrentava a crise do petróleo. O governo brasileiro apostou no pro-álcool como alternativa para reduzir a dependência das importações do combustível fóssil. O alto preço do petróleo fez o programa de incentivo à produção e ao uso de álcool decolar.

O pro-álcool teve grande sucesso até meados da década de 90, época em que cerca de 96% dos veículos nacionais eram fabricados com motores movidos a álcool. Depois de um momento de grande incentivo, o pro-álcool entrou em crise, devido ao esgotamento dos recursos governamentais destinados ao programa e ao descompasso entre a oferta e a demanda de álcool. Além disso, a partir de 1986, o preço do petróleo caiu drasticamente, reduzindo a competitividade do álcool no mercado dos combustíveis (Severo, 2009).

Depois de um período de sucesso e de crise, atualmente o setor sucroalcooleiro está enfrentando uma terceira fase, a de recuperação. Nesta nova etapa, o Brasil voltou a ser um grande consumidor de álcool, devido à adoção da tecnologia *flex-fuel* nos motores dos automóveis. Além disso, recentemente o Brasil tornou-se também grande exportador mundial de bioetanol (Severo, 2009).

O bioetanol produzido no Brasil é considerado um dos principais substitutos da gasolina, sendo empregado como combustível na forma hidratada de 92,6 a 93,8% INPM, no caso de motores movidos à álcool, ou na forma anidra mínimo de 99,3% INPM, como aditivo à gasolina (Martins, 2009). A Tabela 1 apresenta a evolução da proporção da mistura de álcool anidro na gasolina.

Tabela 1. Proporção da mistura de álcool anidro à gasolina (Martins, 2009).

Ano	Volume de álcool (L)	Volume de gasolina (L)	Porcentagem de etanol na gasolina (%)
1979	0,14	0,86	14
1980	0,17	0,83	17
1981	0,12	0,88	12
1982-1986	0,20	0,80	20
1987-2002	0,22	0,78	22
2002-2007	0,24	0,76	24
2007-2009	0,25	0,75	25

Fonte: ANP (2009).

Para a produção do etanol de segunda geração, que é obtido da hidrólise da celulose do bagaço de cana, se tem há necessidade de fortes investimentos em tecnologias. As estratégias de produção de bioetanol a partir do bagaço de cana de açúcar contemplam a fermentação da glicose produzida a partir da hidrólise ácida ou enzimática da celulose. Basicamente, tais processos consistem na Sacarificação e Fermentação Separadas (SFS), aplicável aos processos de hidrólise ácida e enzimática da celulose e na estratégia de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), aplicável ao processo de hidrólise enzimática da celulose (Baudel, 2006).

A implementação de uma unidade autônoma para a produção de etanol utilizando unicamente bagaço de cana de açúcar como fonte de carboidratos caracteriza um desafio tecnológico complexo e particularmente interessante. Tal sistema demanda a produção de hidrolisados com concentrações sacarídicas superior a 60g/L, requerendo uma etapa de concentração destes previamente à etapa fermentativa. Tal medida resulta em maior complexidade operacional e maior custo global (Baudel, 2006).

Baudel *et al.*, em 2006, relataram que experimentos realizados na Universidade Lund (Suécia), evidenciaram a possibilidade de se produzir em média 210L etanol/ton bagaço seco utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* convencionais em estratégias SFS, utilizando unicamente glicose como substrato. A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* “engenheiradas” em sistemas SFS possibilitou um aumento da ordem de 12% na produção de bioetanol, devido à conversão parcial da xilose em etanol. Separadamente, rendimentos produtivos da ordem de 242L etanol/ton bagaço

seco foram obtidos mediante processos SSF e *Fed-Batch* SSF utilizando *S. cerevisiae* convencionais, enquanto rendimentos da ordem de 254L etanol/ton bagaço seco foram obtidos utilizando *S. cerevisiae* “engenheiradas”. Todos os processos utilizaram bagaço pré-tratado por explosão a vapor, utilizando como catalisador SO₂ (2%).

O grande desafio da produção economicamente viável de bioetanol a partir da biomassa está em selecionar a melhor opção dentre as diferentes tecnologias de disponibilização de carboidratos do bagaço de cana de açúcar a partir da hidrólise da celulose em termos de custo, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

2.5 Materiais Lignocelulósicos

A biomassa oferece uma fonte abundante e barata de recursos de energia renovável. O resíduo de cana de açúcar, chamado de bagaço, é gerado durante a moagem da cana e é abundante em regiões tropicais e subtropicais como, Brasil, Índia e sul dos Estados Unidos. Os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana de açúcar, são constituídos por celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes (Knauf *et al.*, 2004). A composição média dos seus três principais constituintes é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição média do bagaço de cana de açúcar (Knauf *et al.*, 2004).

Componente	Composição
Celulose	23-53%
Hemicelulose	20-35%
Lignina	10-25%

2.5.1 Estrutura das Fibras e Fibrilas

As fibras vegetais podem ser consideradas como compósitos de fibrilas de celulose mantidas coesas por uma matriz constituída de lignina e hemicelulose (Jayaraman *et al.*, 2003), cuja função é agir como uma barreira natural à degradação microbiana e servir como proteção mecânica. Suas características estruturais estão relacionadas à natureza da celulose e à sua cristalinidade (Figura 3) (Silva *et al.*, 2009).

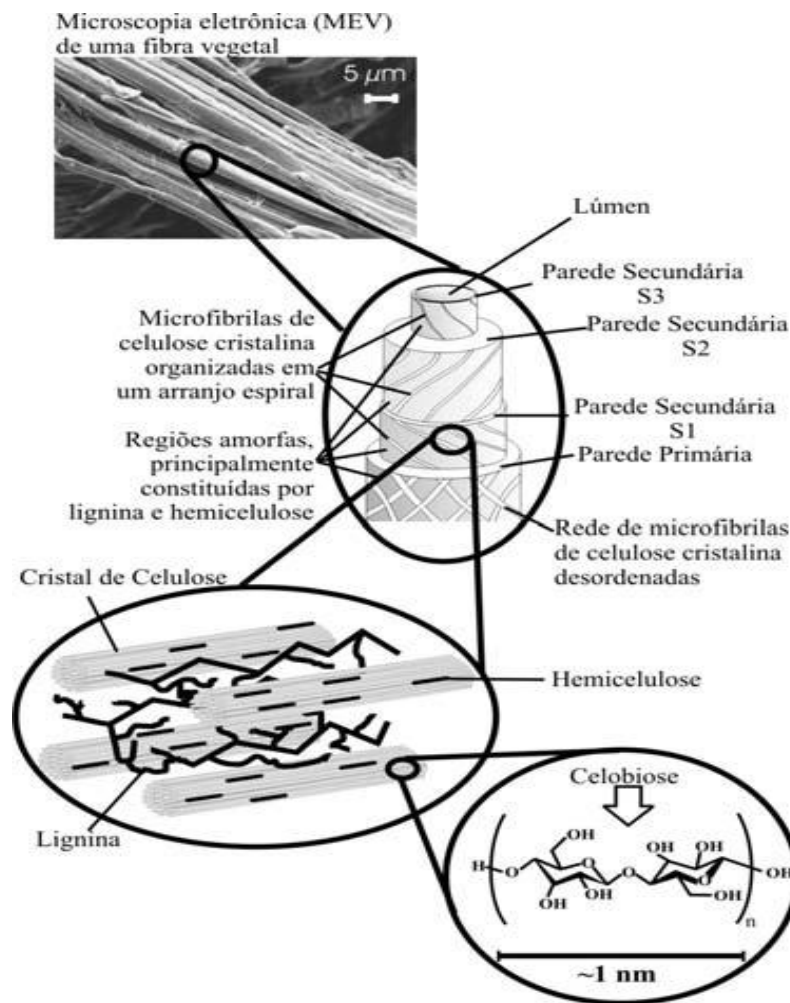


Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem de MEV refere-se à fibra de Eucalipto (Silva *et al.*, 2009).

A fibra lignocelulósica tem uma estrutura de camadas complexas por uma parede primária fina durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária (Figura 3). A parede secundária é constituída de três camadas (S₁, S₂ e S₃),

onde a camada intermediária S₂ determina as propriedades mecânicas da fibra e consiste em uma série de microfibrilas, helicoidalmente formadas por longas cadeias de celulose e organizadas no sentido da fibra. Tais microfibrilas têm o diâmetro de 10 a 30nm e são resultantes do empacotamento de 30 a 100 cadeias de celulose estendidas (Pietak *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008).

2.5.2 Celulose

A celulose (C₆H₁₀O₅)_n é um polímero natural de cadeia longa, um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de celobiose ou anidroglicose sindiotática ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β-(1→4), como mostra a Figura 4.

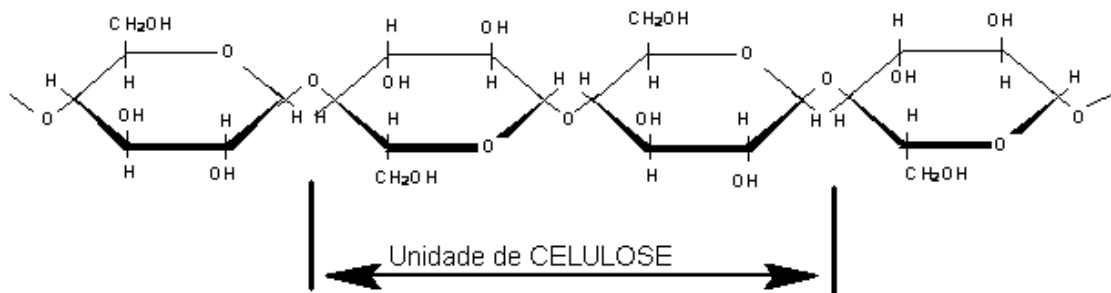


Figura 4. Unidade de celobiose (Fengel e Wegener, 1989).

O comprimento da cadeia da celulose nativa varia entre 10.000 a 15.000 resíduos conforme a sua origem, grau de maturação da parede celular, o tempo de envelhecimento e o processamento a que as fibras foram submetidas (Fengel e Wegener, 1989). Hidrolisando a celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeia terminais redutoras e não redutoras (Figura 5) que após hidrólise mais extensa, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.

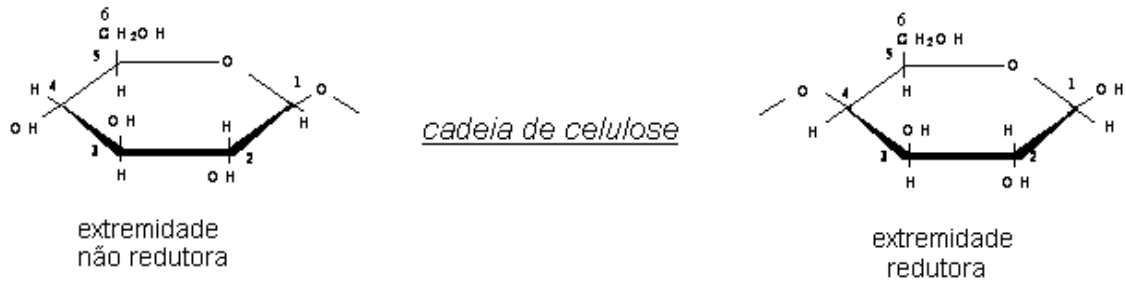


Figura 5. Cadeias com extremidades não redutora e redutora do polímero de celulose.

Com a quebra da ligação β -D (1,4) glicosídica forma-se uma cadeia redutora e outra não redutora. A cadeia redutora tem um aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal. O grupo não redutor é formado por C₄-OH terminal.

O polímero natural celulose possui uma disposição linear devido à hidroxila no carbono anomérico possui orientação equatorial (Figura 6), a conformação do anel piranosídico assume disposição em cadeira ⁴C₁ e cadeias adjacentes formam uma rede de ligações de hidrogênio intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) e intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) que estabilizam o agregado (Fengel e Wegener, 1989).

A estrutura da celulose nativa apresenta duas regiões: cristalina e amorfa. Regiões altamente ordenadas são denominadas de cristalinas e as regiões onde a cadeia apresenta orientação randomizada são denominadas de amorfas (Fan *et al.*, 1987). Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas nas regiões cristalinas que se alternam com as regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas como consequência dessa estrutura fibrosa a celulose possui alta resistência e é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns.

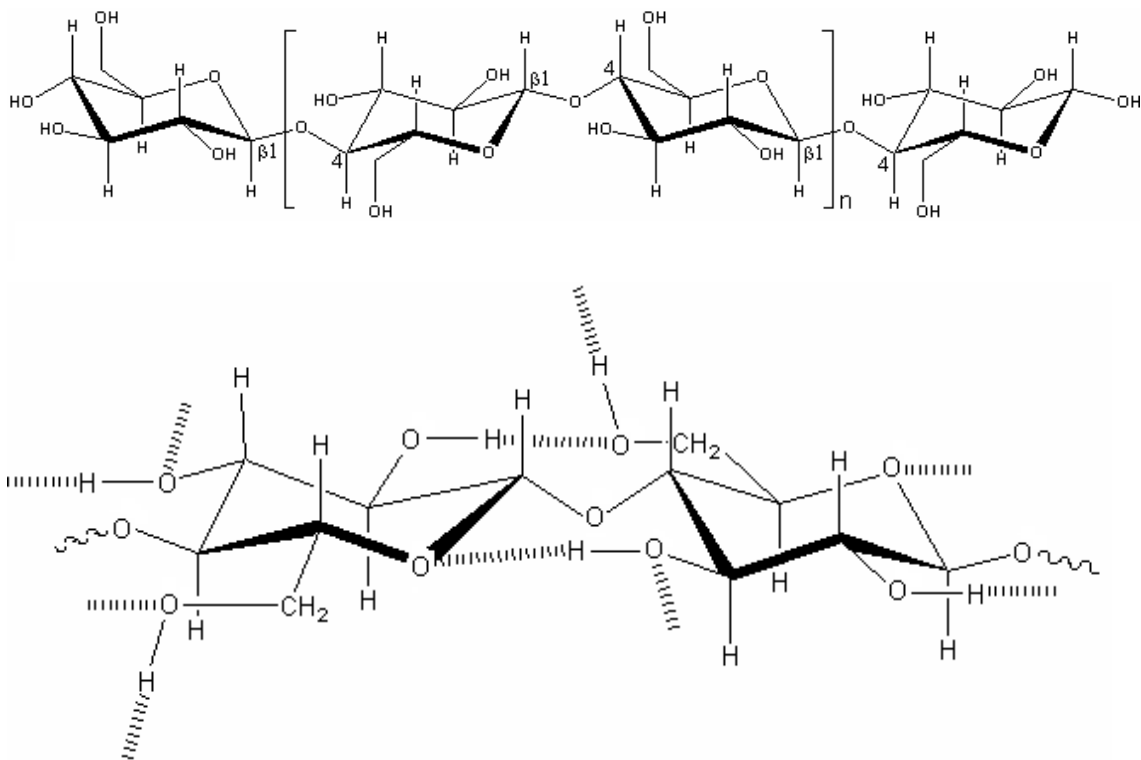


Figura 6. Posição das ligações inter e intramoleculares na celulose.

2.5.3 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que estão intimamente associadas à celulose na parede celular vegetal. São constituídas de vários monossacarídeos polymerizados, como pentoses (L-arabinose e D-xilose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico). As estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses são mostradas na Figura 7.

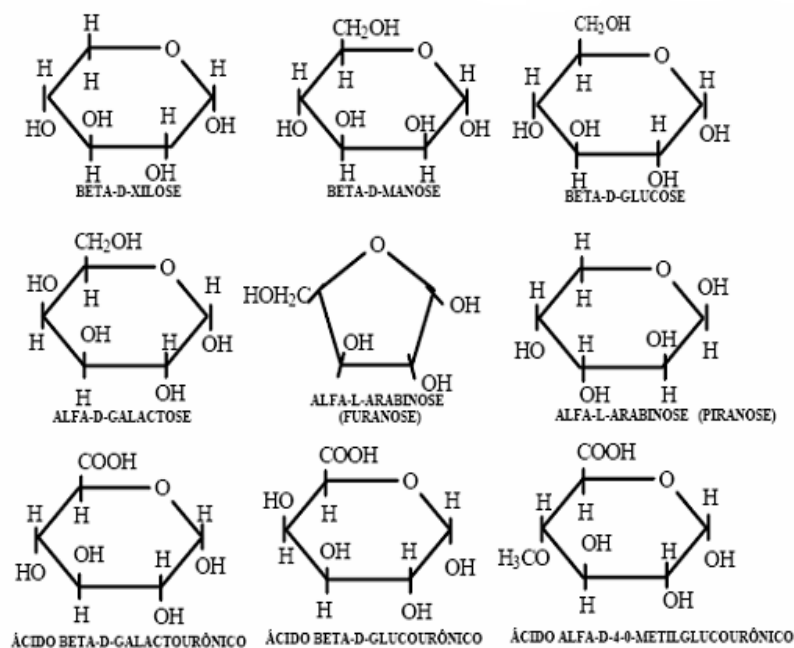


Figura 7. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.

As hemiceluloses por não possuírem regiões cristalinas são atingidas mais facilmente por produtos químicos, todavia, se ocorrer à perda de alguns substituintes da cadeia, as hemiceluloses podem sofrer cristalização induzida pela formação de ligações de hidrogênio, a partir de hidroxilas de cadeias adjacentes.

O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4 (Silva *et al.*, 2009). A hemicelulose é bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa e grau de polimerização (GP) variando entre 100 a 200 (Yang *et al.*, 2008). O teor de hemicelulose pode variar de 20 a 35% dependendo do tipo de tecido vegetal e espécie a que pertence.

A reação de auto-hidrólise envolve a formação de ácidos a partir dos componentes da hemicelulose, tais como o ácido acético, ácido fórmico e o ácido glucurônico (McGinnis *et al.*, 1983; Timell, 1967). Estes ácidos gerados catalisam a hidrólise da hemicelulose (Lora e Wayman, 1978), no entanto os ácidos formados na auto-hidrólise são ácidos fracos, por isso, estes não conseguem hidrolisar a celulose.

2.5.4 Lignina

A lignina é uma das macromoléculas mais abundantes na natureza depois da celulose, sendo incorporada durante o crescimento celular do vegetal. A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil (Silva *et al.*, 2009). A Figura 8 ilustra genericamente a molécula de lignina da *Eucalyptus grandis*.

Enquanto livros textos (como por exemplo, Fengel e Wegener, 1989) apresentam o teor de lignina presente nos materiais lignocelulósicos como sendo da ordem de 20 a 30%, outros autores relatam valores entre 10-25% (Knauf *et al.*, 2004). A lignina atua como material adesivo, como agente de enrijecimento no interior das fibras e como barreira contra degradação enzimática e microbiana da parede celular.

O teor de aromáticos na lignina é elevado, isto é resultante da polimerização enzimática catalisada pelos seus precursores (Ruffell *et al.*, 2008). O mecanismo de biossíntese da lignina se processa a partir de três alcoóis monoméricos, o álcool coniferílico, o álcool sinapílico e o álcool p-cumarílico (Figura 9).

A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose (Silva *et al.*, 2009). Existe uma grande dificuldade na elucidação química da estrutura da lignina devido ao fato de não haver um método bem estabelecido para isolar a lignina em sua forma nativa (John *et al.*, 2008).

A lignina por ser o segundo composto orgânico mais abundante na Terra depois da celulose, desempenha um papel fundamental em qualquer processo que utilize fibras celulósicas. Na indústria a lignina é queimada para gerar vapor nas caldeiras ou pode ser utilizada como fonte de produtos químicos, como para a produção de detergentes (Ruffell *et al.*, 2008).

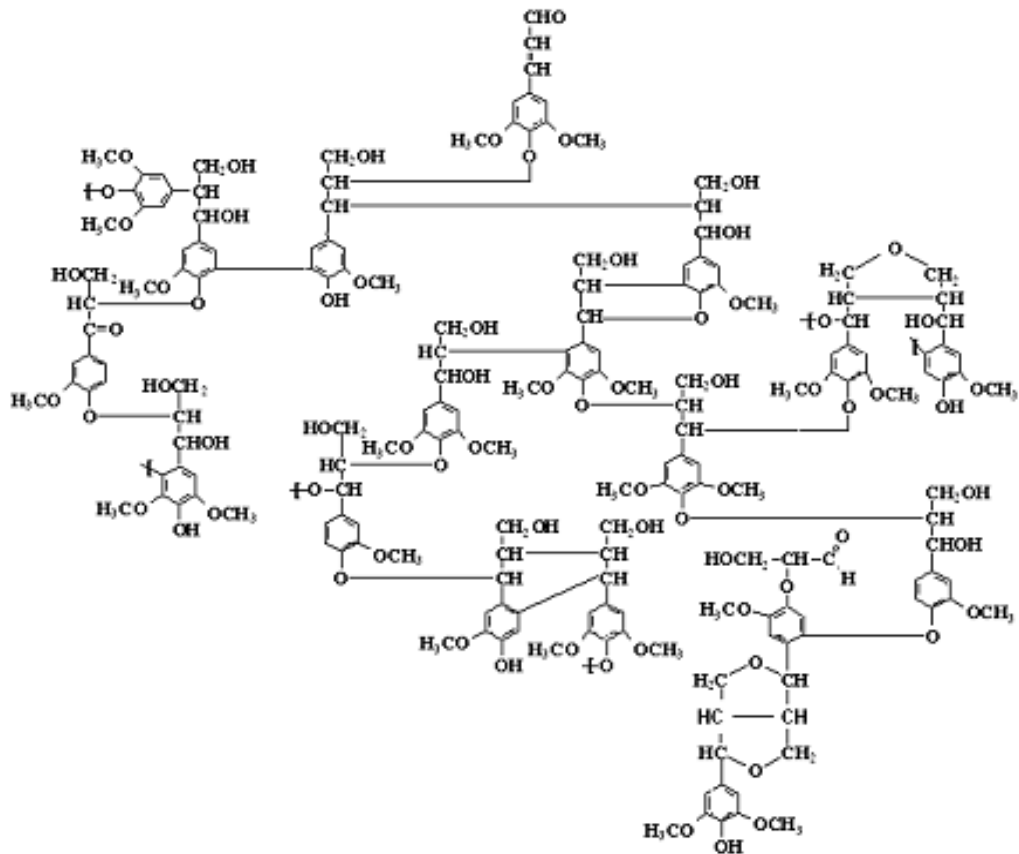


Figura 8. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Fagus sp* (Fengel e Wegener, 1989).

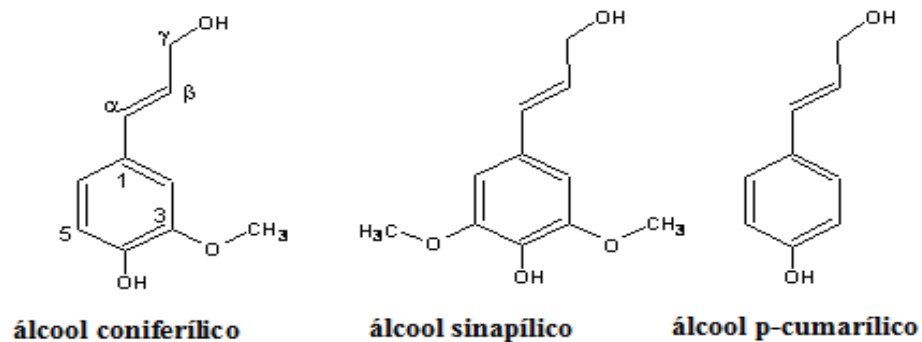


Figura 9. Estrutura química dos precursores da lignina.

2.5.5 Extrativos

Uma pequena porção da biomassa vegetal é constituída por compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos que não são parte integrante da estrutura celular, estes são chamados de extrativos (Forestry Commission, 2008). É possível extrair estes compostos utilizando solventes polares e não polares, sem degradar a estrutura da biomassa. Alguns exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (Silva, 2009). Os extrativos normalmente constituem de 4 a 10% da massa total seco do material celulósico.

2.6 Pré-Tratamento

Os materiais lignocelulósicos são resistentes a bioconversão, sendo necessário um pré-tratamento para garantir a acessibilidade dos agentes hidrolíticos à celulose. O processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica demanda a transformação da celulose e hemicelulose em seus respectivos monômeros (glicose e xilose) e posterior conversão dos mesmos a etanol celulósico.

O pré-tratamento do bagaço consiste em uma das etapas mais importantes em termos de custo, além de influenciar nas etapas anteriores e subsequentes do processo. O pré-tratamento relaciona-se às operações de preparação de matéria-prima (moagem, impregnação), bem como à hidrólise (ácida ou enzimática) da celulose (carga e consumo de enzimas ou ácidos, taxa de reação), geração de produtos inibidores à hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, concentração sacarídicas dos hidrolisados produzidos, purificação de produtos intermediários, tratamento de resíduos, agitação mecânica e geração de energia (Baudel, 2006).

Um pré-tratamento eficiente consiste em reduzir custos e aumentar a produtividade de bioetanol, por isso, há a necessidade de aumentar a digestibilidade do bagaço e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis.

Vários métodos de pré-tratamento têm sido sugeridos na literatura. Estes podem ser divididos: em métodos biológicos, físicos, químicos ou uma combinação de todos esses. Os métodos físicos convertem a biomassa em pós finos, incrementando a

superfície específica da celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorra com relativa facilidade (Baudel, 2006). Os métodos químicos objetivam remover a lignina sem degradar a cadeia celulósica que deve apresentar propriedades adequadas à sua posterior utilização. Como a lignina está ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre durante o processo de pré-tratamento, e dependendo das condições empregadas, a celulose pode ser degradada (Sarita, 2007).

Ao longo dos anos vários pré-tratamentos têm sido experimentados com o objetivo de desenvolver tecnologias mais eficientes em termos de custo e competitividade. Alguns pré-tratamentos utilizando vapor de água, ácido sulfúrico, amônia e hidróxido de cálcio têm emergido dentre as opções mais promissoras (Baudel, 2006).

O pré-tratamento com água quente, também conhecido com hidrotermólise (“*Hot water*”) ou solvólise, utiliza água comprimida em contato com a biomassa durante intervalos de tempo de 1 a 15 minutos sob temperaturas entre 170 a 230°C. Neste processo, as partículas da biomassa tendem a se romper em contato com a água quente (coação), não havendo necessidade de reduzir o tamanho das mesmas. Em média, 40 a 60% da biomassa é dissolvida no processo, com remoção de celulose variando entre 4 a 22% e uma grande parte da hemicelulose é recuperada quando se usa ácido como catalisador da hidrólise do líquido produzido. Neste processo uma grande quantidade de lignina é removida entre 35 a 60%. A desvantagem da solvólise está relacionada com a grande quantidade de água consumida, que produz hidrolisados muitos diluídos, ocasionado problemas operacionais nas etapas subsequentes da bioconversão (Baudel, 2006).

Algumas bases podem ser usadas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito alcalino no pré-tratamento depende da quantidade de lignina presente no material (Fan *et al.*, 1987; McMillan, 1994). Os processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operações, em termos de temperaturas e pressões, em comparação com sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali, geralmente cal ou soda, tende a causar um inchamento da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. O pré-tratamento utilizando hidróxido de cálcio (“*lime*”) apresenta vantagens em termos de custo do reagente, segurança do processo e

possibilidade de recuperar o álcali sob a forma de carbonato de cálcio mediante reação com dióxido de carbono produzido na etapa de fermentação alcoólica (Baudel, 2006).

Os ácidos concentrados como o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico têm sido utilizados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Embora, sejam agentes poderosos para a hidrólise, os ácidos concentrados são corrosivos, tóxicos e perigosos, porém são recuperados no final do processo (Sivers e Zacchi, 1995).

Os processos de pré-tratamento com ácido diluído conseguem altas taxas de reação e melhora significativa na hidrólise da celulose (Esteghlalian *et al.*, 1997). São utilizadas temperaturas entre 140 a 200°C, onde cerca de 80 a 90% das hemiceluloses são recuperadas e 30 a 50% da lignina é passível de extração alcalina. A hidrólise com ácido diluído demanda matéria-prima com reduzido teor de cinzas e outras impurezas, em virtude do efeito tamponante da mesma, resultando em um elevado consumo de ácido (Baudel, 2006).

O método de pré-tratamento com explosão a vapor tem sido muito utilizado em materiais lignocelulósicos (McMillan, 1994). Neste processo o material é submetido a uma alta pressão saturada de 6 a 34bar e uma temperatura entre 160 a 240°C durante um tempo de reação de 1 a 15 min. Após a reação, o material é submetido a uma rápida descompressão do equipamento e coletado em um tanque de expansão. Durante o pré-tratamento, ocorre hidrólise das hemiceluloses que liberam os carboidratos que podem sofrer degradação térmica e a lignina é parcialmente fragmentada, tornando a estrutura da biomassa mais susceptível à penetração de água, ácidos e enzimas, de modo que o potencial hidrolítico da celulose é incrementado (Sun e Cheng, 2002; Baudel, 2006). O pré-tratamento com explosão a vapor atua química e fisicamente na biomassa.

Outro tipo de pré-tratamento físico-químico é o AFEX (“*Ammonia Fibre explosion*”), que consiste na versão alcalina do processo de explosão de vapor. Neste caso, os materiais lignocelulósicos são submetidos à ação da amônia líquida (2kg/kg biomassa seca) em altas temperaturas 160 a 180°C, sob uma pressão de 9 a 17bar por um período de tempo 10 a 20 min. Em seguida, a pressão é rapidamente reduzida (Sun e Cheng, 2002). A vantagem deste processo está na elevada reatividade da fibra, mínima geração de compostos inibidores de fermentação, além da recuperação da amônia. Entretanto, o AFEX não promove uma elevada solubilização das hemiceluloses, como nos processos ácidos, o que torna difícil a recuperação da mesma no hidrolisado (Holtzaple *et al.*, 1992).

Outro pré-tratamento que tem sido muito relatado é emprega amônia aquosa (solução de NH_4OH). O pré-tratamento com amônia aquosa pode ser utilizado em vários tipos de matérias-primas utilizando diferentes processos. A amônia é utilizada como um reagente para remover a lignina. Em altas temperaturas, o pré-tratamento com amônia aquosa resulta em alta deslignificação. No entanto, a sua desvantagem está no alto consumo de energia, formação de compostos tóxicos e perda de açúcares (Kim *et al.*, 2009). Entretanto estudos têm comprovado que em baixas temperaturas de reação a amônia não é poluente, não é corrosiva e é de fácil manuseio, diminuindo as desvantagens observadas em altas temperaturas. O uso da amônia a temperatura ambiente minimiza a sua interação com a hemicelulose e a formação de componentes tóxicos, aumentando os rendimentos de bioconversão e fermentação (Kim *et al.*, 2009). A amônia consegue clivar as ligações C-O-C na lignina e as ligações de éster e éter entre a lignina e a hemicelulose, permitindo que a água penetre nas camadas internas da celulose aumentando a área superficial do material lignocelulósico (Balat *et al.*, 2008).

2.6.1. Amônia aquosa

Os pré-tratamentos alcalinos quebram as ligações entre a lignina e a hemicelulose, permitindo assim a penetração da água nas camadas internas da celulose aumentando a área superficial do material lignocelulósico (Balat *et al.*, 2008). O pré-tratamento com amônia aquosa tem sido estudado em vários materiais lignocelulósicos utilizando diversos processos (Kim *et al.*, 2009).

Kim *et al.*, em 2009 realizaram um pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa em baixas concentrações a temperatura ambiente (30°C), visando observar mudanças microbiais e composicionais do bagaço de cana armazenadas em amônia diluída por um longo período (40 dias). Os resultados mostraram que o bagaço tratado com 0,3% de solução de amônia aquosa diminui o número de bactérias linearmente com passar do tempo e o número de fungos manteve-se constante ao longo dos 40 dias. O longo tempo de estocagem resultou em uma maior deslignificação do bagaço e remoção de hemicelulose a partir de 10 dias. O teor de celulose (em massa) no bagaço manteve-se estável durante todo o tempo de armazenamento.

Outros pré-tratamentos foram estudados por Kurakake *et al.*, 2001 utilizando o bagaço de cana, sabugo de milho e gramíneas. O efeito do pré-tratamento foi baseado na remoção de lignina, liberação de açúcares e recuperação dos açúcares perdidos no pré-tratamento. O material lignocelulósico foi aquecido com solução de hidróxido de amônio e então a amônia foi removida rapidamente por vácuo. A amostra imediatamente foi hidrolisada enzimaticamente sem lavá-la com água. No bagaço de cana o efeito foi quase inalterado para mais de 1 mL de amônia aquosa/ g de bagaço. Os principais produtos foram glicose a partir de celulose e xilose e xilotriose a partir da xilana. No sabugo de milho a formação de glicose a partir de celulose necessitou de apenas 0,5 mL de amônia aquosa/ g de bagaço, porém a liberação de açúcares da arabinolixana não foi melhorada pelo pré-tratamento. Nas gramíneas a produção de açúcares primários foi similar ao do bagaço de cana. Os rendimentos de açúcares totais a partir da celulose e arabinoxilana foram de 55% e 67% para a espécie *Miscanthus* e 44% e 54% para a espécie *Solidago*, respectivamente.

No ano de 1995, Yoon desenvolveu um novo método de pré-tratamento utilizando amônia aquosa. Esse método foi denominado como percolação e reciclagem da amônia (do inglês, *Aqueous Ammonia Percolation*, ARP). O autor relatou que a biomassa quando é aquecida a altas temperaturas (acima de 150°C) com água pressurizada ácidos são formados pela solubilização de componentes ácidos e da desesterificação do grupo éster (ex. grupos acetatos) na hemicelulose. Esses ácidos catalisam a hidrólise da hemicelulose (Lora e Wayman, 1978) assim o pré-tratamento da biomassa com água quente é denominado de auto-hidrólise. Os ácidos formados na hidrólise são ácidos fracos, como o ácido acético, ácido fórmico e o ácido glucurônico (McGinnis *et al.*, 1983) e não são fortes o suficiente para hidrolisar a celulose, no entanto, a auto-hidrólise pode seletivamente extrair a hemicelulose do material lignocelulósico (Mok e Antal, 1992; Walch *et al.*, 1992). A hemicelulose na biomassa pode ser uma importante barreira para a hidrólise enzimática da celulose (Yoon em 1998).

Yoon avaliou em 1998, a combinação do processo ARP e auto-hidrólise da biomassa lignocelulósica. E também investigou o efeito da hemicelulose na digestibilidade enzimática. Os resultados indicaram que a temperatura da reação é uma variável operacional importante na auto-hidrólise. Quando a temperatura de reação aumenta a hemicelulose presente no tratado sólido diminui, ou seja, a quantidade de hemicelulose solubilizada aumenta. Na hidrólise enzimática a enzima celulase, mais

provável a endoglucanase, possui sítios ativos para a hemicelulose. A hemicelulose adsorve a enzima celulase deixando esta indisponível para a hidrólise enzimática da celulose.

Uma importante observação neste estudo foram os resultados obtidos quando a temperatura do pré-tratado foi acima de 190°C (em processo de batelada). Nesta condição quase nenhuma lignina foi removida, porém o substrato tratado apresentou alta digestibilidade próxima à do papel de filtro (substrato de referência). Este resultado indicou que a possível deformação térmica da lignina ou sua “despolimerização”, e não necessariamente sua remoção, pode ser um fator importante para a digestão enzimática da biomassa.

Yoon concluiu que a combinação da auto-hidrólise e o ARP mostraram ser um pré-tratamento satisfatório, assegurando a separação seletiva da hemicelulose a partir da biomassa assim como a deslignificação do material para dar acessibilidade a digestibilidade enzimática. E que a hemicelulose inibe a celulose na hidrólise enzimática. E o fracionamento da hemicelulose na biomassa é, portanto, um pré-requisito para melhorar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico e recuperar a hemicelulose.

Han *et al.*, estudaram em 2009 ARP utilizando palha de trigo como biomassa lignocelulósica. O pesquisador variou a temperatura de pré-tratamento de 50-170°C e o tempo de reação de 10-150 minutos. Os resultados mostraram que o sólido remanescente variou de 81% (10 min, 50°C) a 58,51% (150 min, 170°C). Os teores de celulose e hemicelulose variaram na fração sólido de 34,94% a 36,49% e de 10,14% a 12,69%, respectivamente. Na deslignificação a variação foi de 21,65% a 67,39%. O aumento da temperatura no pré-tratamento teve um efeito mais pronunciado na deslignificação. Embora a deslignificação aumente com o aumento do tempo de reação em baixas temperaturas. No entanto, a remoção de lignina em altas temperaturas o efeito foi pequeno com o aumento do tempo de reação. Isto sugere que a temperatura foi um fator mais importante na remoção de lignina que o tempo de reação.

Na hidrólise enzimática a conversão foi de 90% em 36h para o tratado por 30 min a 170°C (carga de 30 FPU de celulase/ g de celulose). No entanto, houve um pequeno aumento quando a carga foi para 40 FPU de celulase/ g de celulose (>95%), enquanto a biomassa não tratada foi menor que 35%. Considerando o custo energético Han trabalhou com o pré-tratado a 140°C devido à pequena diferença na digestibilidade

enzimática. Han *et al.*, analisaram na fermentação a ocorrência da formação de inibidores (furfurais) no pré-tratamento. Na fermentação foi utilizado um controle (glicose pura) e a palha de trigo hidrolisada com concentrações de açúcares similares e os resultados obtidos das eficiências em etanol foram de 91,57% e 90,66%, respectivamente. Isto significa que os inibidores não foram gerados pelo pré-tratamento ARP.

Outro processo muito utilizado é embebedimento em amônia aquosa (termo em inglês, *Soaking in Aqueous Ammonia*, SAA). Este processo tem se mostrado muito eficaz no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. O método SAA utiliza baixas temperaturas para diminuir a degradação dos açúcares fermentescíveis, formação de compostos inibidores e solubilização da hemicelulose. O SAA é um dos poucos processos de pré-tratamento do material lignocelulósico em que quase 100% do glucano e mais de 80% da xilana são mantidos na biomassa considerando que uma porcentagem significativa de lignina é removida. Apesar da alta eficiência na preservação dos carboidratos ainda cerca de 20% de xilana é solubilizada junto com a lignina, portanto, esta não estará disponível para a conversão em etanol na etapa de fermentação (Tae Hyn Kim *et al.*, 2009).

Tae Hyn Kim *et al.*, em 2009 realizaram um aprimoramento no processo SAA, que foi denominado de Embebedimento em Etanol e Amônia Aquosa (em inglês, *Soaking in Ethanol and Aqueous Ammonia*, SEAA). Neste método a biomassa é pré-tratada com solução de etanol e amônia aquosa. Após o pré-tratamento faz-se a operação de separação do sólido/líquido. A fração líquida entra em um evaporador onde a amônia é evaporada e recuperada por reciclo. Os sólidos residuais desta fração que são constituídos principalmente de lignina são recuperados e queimados como combustível em caldeiras. Os sólidos obtidos a partir da mistura sólido/líquido são lavados com água para remover amônia residual. Os sólidos lavados são hidrolisados com celulasas e hemicelulasas para a produção de açúcares fermentescíveis que são fermentados a etanol. Tae Hyn Kim *et al.*, relatam que o objetivo do método é reduzir a perda de xilana por solubilização. No processo SEAA, o etanol é adicionado na solução de hidróxido de amônio. A precipitação da hemicelulose com etanol tem sido utilizada na separação e purificação de polissacarídeos na biomassa lignocelulósica (Whistler *et al.*, 1970; Sun *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2938). Assim, mais xilana estaria disponível para a hidrólise aumentando a produção de açúcares fermentescíveis para a etapa de

fermentação. O etanol utilizado no processo de pré-tratamento pode ser recuperado e reciclado (Tae Hyn Kim *et al.*, 2009).

2.7 Hidrólise

As tecnologias para obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do etanol (Bioetanol, 2008). Existem basicamente três técnicas para a obtenção dos açúcares fermentescíveis: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído e a hidrólise enzimática. A Tabela 3 apresenta uma comparação entre os diferentes processos de hidrólise.

Tabela 3. Comparações das condições e desempenho das hidrólises (Hamelinck *et al.*, 2005).

Processo	Insumo	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido Diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215°C	3 min	50-70%
Ácido Concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40°C	2-6 h	90%
Enzimático	Celulase	70°C	1,5 dias	75-95%

No processo com ácido concentrado a celulose e hemicelulose são quebradas utilizando ácidos minerais fortes, tais como o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e o ácido fosfórico, em baixas temperaturas e com tempo de reações longos (horas). A desvantagem desta técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, elevando o custo final da produção do bioetanol, portanto, a recuperação do ácido é fundamental por questões econômicas e ambientais (Bioetanol, 2008).

O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempo de reação de segundos a alguns minutos, o que facilita o uso de processo contínuo

(Bioetanol, 2008). Neste caso, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente, podendo assim, a hemicelulose ser removida após o primeiro estágio. Devido às altas temperaturas no segundo estágio, uma quantidade considerável de lignina e açúcares solúveis é degradada levando a uma inibição do processo de fermentação.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas chamadas de celulasas que são altamente específicas (Beguin e Aubert, 1994). Na verdade, a celulase é um complexo enzimático composto por endoglucanases (que atacam as cadeias de celulose para produzir polissacarídeos de menor comprimento), exoglucanases (que atacam os terminais não redutores da cadeia e removem a celobiose) e β -glucosidades (que hidrolisam a celobiose e outros oligômeros à glicose) (Philippidis e Smith, 1995).

A hidrólise enzimática é um processo realizado em condições mais amenas que as hidrólises ácida ou alcalina. Isto porque, a hidrólise enzimática é conduzida usualmente em condições suaves (pH 4,8 da solução e temperaturas entre 45 a 50°C), não apresentando problemas de corrosão de equipamentos. Bactérias e fungos produzem celulasas. Esses microorganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos (Sun e Cheng, 2002).

As enzimas celulasas hidrolisam a celulose a açúcares redutores, que podem ser fermentados por microorganismos a bioetanol. Porém as celulasas são proteínas, e estas não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina, o que torna difícil o acesso destas enzimas às fibras de celulose, por isso, é de extrema importância um pré-tratamento antes da hidrólise.

A celulose apresenta regiões que são altamente ordenadas que tem grandes quantidades de ligações de hidrogênio e regiões menos ordenadas (amorfas), onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (Figura 10) (Fan *et al.*, 1987).



Figura 10. Regiões específicas da celulose (Sarita, 2007).

O complexo celulásico é constituído por três enzimas, as endoglucanases, as celobiohidrolases ou exoglucanases e as β -glucosidades ou celobiasas. E cada tipo de celulase ataca uma região da celulose preferencialmente, como ilustra a Figura 11.

As endoglucanases atacam regiões menos cristalinizadas na fibra da celulose (ligações internas do polímero), produzindo oligossacarídeos e celobiose (Sun e Cheng, 2002). Estas enzimas atacam de forma mais ou menos aleatória as ligações β -(1-4)-glicosídicas nas regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas.

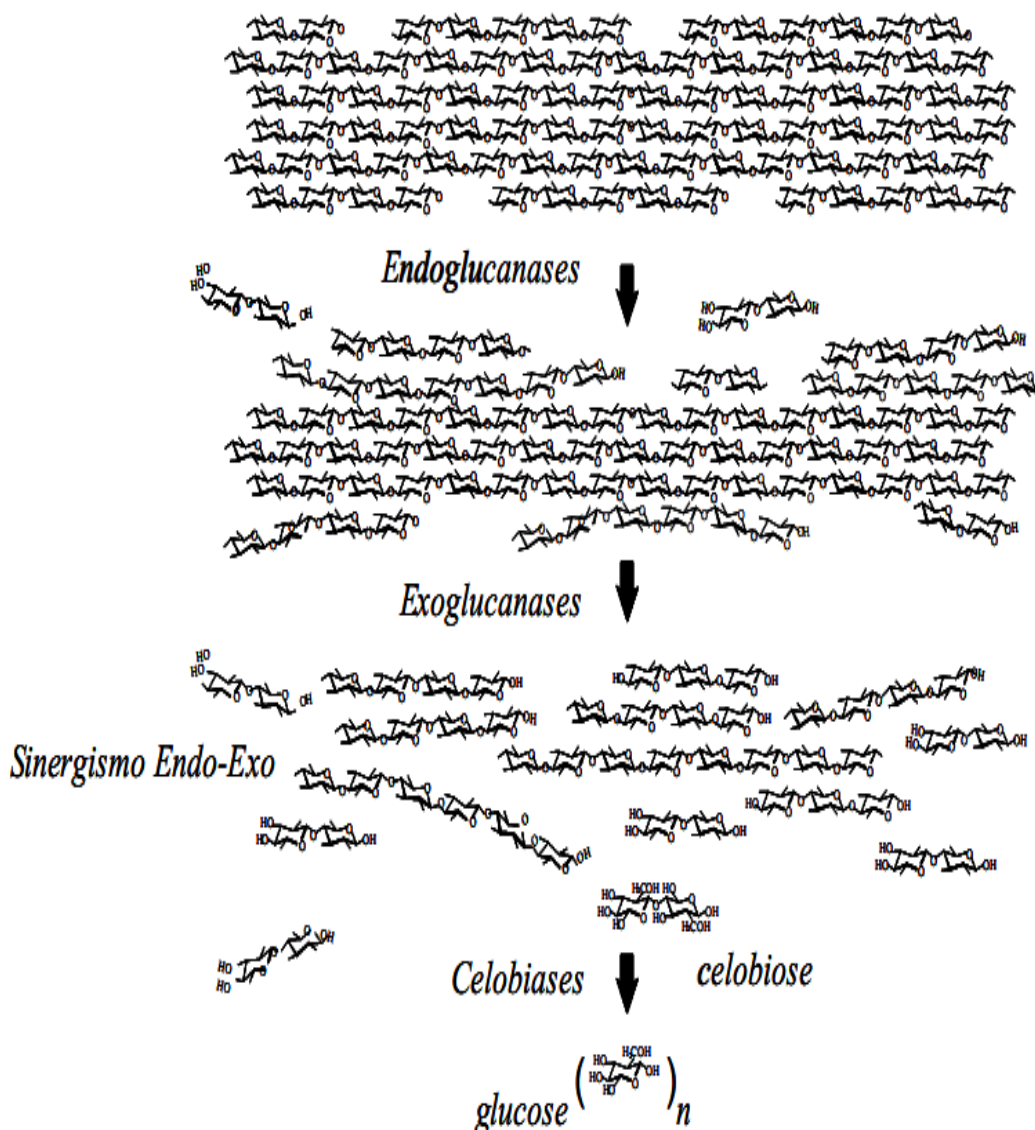


Figura 11. Modo de ação do complexo celulásico de *T. reesei*. (Pitarelo, 2007)

As celobiohidrolases ou exoglucosidases atuam nas regiões terminais do polímero da celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Estas enzimas não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. A CBH I quebra as unidades de celobiose das extremidades redutoras, enquanto a CBH II quebra as extremidades não redutoras da cadeia (Heikinheimo, 2002).

As celobiasas ou β -glucosidases hidrolisam celobiose a glicose, reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases.

O efeito do complexo da enzima celulase é expresso pela ação sinérgica destas três enzimas diferentes na celulase e este sistema complexo de enzimas necessita ser mantido estável para a atividade celulolítica elevada. Em consequência da ação das enzimas endo e exoglucanases na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades das celulases respectivas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo da sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior no complexo celulolítico do que a glicose (Sarita, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias para o melhoramento da hidrólise enzimática é necessário com o intuito de se obter maiores rendimento com menores custos. Uma opção seria incluir tentativas de recuperar as enzimas (imobilização) ou utilizar métodos mais eficazes no cultivo dos microorganismos para sintetizar estas enzimas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram avaliadas diferentes condições operacionais de pré-tratamento utilizando como material lignocelulósico o bagaço de cana de açúcar (*in natura* e explodido a vapor não lavado). A Figura 12 apresenta o fluxograma das etapas empregadas neste trabalho.

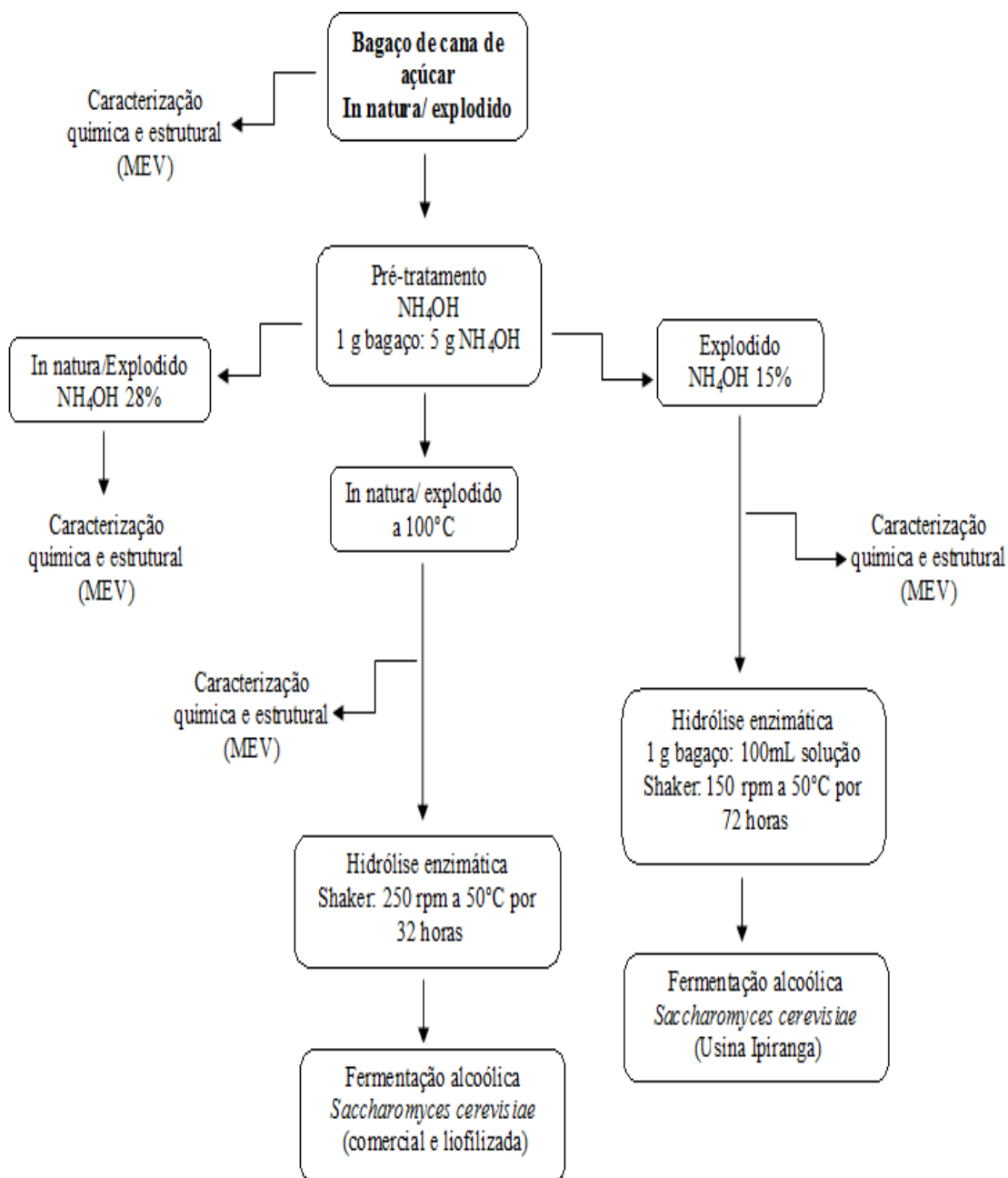


Figura 12. Fluxograma das etapas envolvidas no estudo do pré-tratamento das amostras de bagaço de cana de açúcar *in natura* e explodido não lavado.

3.1 Bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana de açúcar utilizado neste projeto foi cedido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP). Empregaram-se amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado (Figuras 13 e 14). Neste trabalho não se alterou a granulometria das amostras de bagaço.

A umidade das amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado foi determinada com auxílio de um determinador de umidade (Marte, modelo ID50). Obteve-se o valor de 51% e 55% para o bagaço *in natura* e explodido não lavado, respectivamente.



Figura 13. Fotografia ilustrando amostra de bagaço *in natura* (matéria-prima proveniente da Usina Iracema, gentilmente cedida pelo CTC, Piracicaba, SP).



Figura 14. Fotografia ilustrando amostra de bagaço explodido não lavado. Condições de pré-tratamento: explosão a vapor a 17 kgf, 205°C, tempo de reação 20 minutos (matéria-prima gentilmente cedida pelo CTC, Piracicaba, SP).

3.2 Enzimas

Neste trabalho foram utilizados dois complexos enzimáticos comerciais:

- ❖ complexo celulásico (Accellerase 1500), cedida pela empresa Genencor (A Danisco Division, USA) e;
- ❖ complexo enzimático β -glucosidase (BG), cedida pela empresa Genencor (A Danisco Division, USA).

As atividades dos extratos enzimáticos foram determinadas experimentalmente pelo método de Ghose (1987) modificado obtendo-se os valores de 66 FPU/mL (substrato papel de filtro qualitativo Satélite) e 108 FPU/mL (substrato papel de filtro Whatman nº 1) para a Accellerase 1500. Para o complexo enzimático β -glucosidase (BG) obteve-se o valor de 1.146 CBU/mL empregando substrato D-(+)-celobiose (Sigma-Aldrich).

3.3 Microorganismo

O microorganismo utilizado nos experimentos de fermentação alcoólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Empregou-se linhagem comercial (marca Fleischmann) e duas linhagens industriais: uma na forma de creme de levedura (doada pela Usina Ipiranga) e outra na forma liofilizada (cedida pelo CTC, Piracicaba,SP).

3.4 Pré-tratamento do bagaço de cana

O pré-tratamento das amostras de bagaço de cana de açúcar foi realizado em escala de bancada nas seguintes condições:

- 1) Em frascos Erlenmeyer a temperatura ambiente 24 ± 3 °C, empregando solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) 28% (m/m) na proporção 1:5 (massa de amostra seca por massa de solução) e;

- 2) Em reator de aço inoxidável (também denominado autoclave, volume útil aproximado de 200 mL) nas temperaturas de 50°C e 100°C (Figura 15), utilizando soluções de hidróxido de amônio a diferentes concentrações na proporção 1:5 (massa de amostra seca por massa de solução).



Figura 15. Fotografia ilustrando reator de aço inoxidável (autoclave) utilizado nos experimentos de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar.

A Tabela 4 apresenta um resumo das condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Tabela 4. Condições de pré-tratamentos estudados neste trabalho.

Amostra de bagaço	Temperatura da reação (°C)	Concentração de NH₄OH (%)	Tempo de reação
<i>In natura</i>	24 ± 3	28	7 / 15 / 30 dias
<i>In natura</i>	100	4 / 10 / 15	1 hora
Explodido	24 ± 3	28	7 / 15 / 30 dias
Explodido	50	15	30 / 60 / 90 minutos
Explodido	100	5 / 10 / 15	1 hora

3.4.1 Pré-tratamento com amônia aquosa a temperatura ambiente

Amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado foram pré-tratadas na proporção de 1 g bagaço: 5 g amônia aquosa (m/m) com concentração de 28% de solução de NH_4OH a temperatura ambiente 24 ± 3 °C por 7, 15 e 30 dias. Pesou-se 10,0g de bagaço massa seca (*in natura*/explodido não lavado) e colocou-se em um Erlenmeyer de 300 mL. Adicionou-se 185 mL de NH_4OH 28% em cada Erlenmeyer e fechou-se o recipiente com uma rolha. Após o término da reação, os bagaços foram lavados e filtrados com água destilada a temperatura ambiente. Em seguida, foram colocados na capela por uma noite. No dia seguinte foram caracterizados quimicamente para determinar composição de celulose, hemicelulose e lignina.

3.4.2 Pré-tratamento do bagaço explodido com amônia aquosa a 50°C

O bagaço explodido não lavado foi tratado na proporção 1:5 (m/m) com concentração de amônia aquosa 15% a 50°C em um reator de aço em banho-maria por 30, 60 e 90 minutos. Pesou-se 4,0g de bagaço explodido (base seca) e adicionou-se na autoclave juntamente com 22,2 mL de solução de NH_4OH 15%. Após o término da reação, a autoclave foi retirada do banho e deixou-se resfriar. Abriu-se a autoclave, retirou-se a amostra e, em seguida procedeu-se a lavagem com 500 mL de água destilada a temperatura ambiente. A amostra foi deixada na capela por uma noite. Em seguida realizou-se a caracterização química da amostra para determinar composição de celulose, hemicelulose e lignina.

3.4.3 Pré-tratamento do bagaço *in natura* com amônia aquosa a 100°C

O bagaço de cana foi tratado na proporção 1:5 (m/m) nas concentrações 4, 10 e 15% de amônia aquosa por 1 h a 100°C. Pesou-se 15,0g de bagaço *in natura* (base seca) e colocou-se no reator e adicionou-se 74,3 mL de solução de NH_4OH . Em seguida, o reator foi colocado em um banho de areia a 100°C por 1 hora. Após o término da

reação, esperou-se esfriar o reator. A amostra foi filtrada e lavada com 500 mL de água a temperatura ambiente e 1.500 mL de água destilada fervente. Deixou-se a amostra na capela durante uma noite. No dia seguinte a amostra foi caracterizada para determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina. Os experimentos realizados com concentrações de 4 e 15% de solução de NH_4OH foram realizados em duplicata e o experimento com 10% de solução de NH_4OH foi realizado em triplicata.

3.4.4 Pré-tratamento do bagaço explodido com amônia aquosa a 100°C

O bagaço de cana foi tratado na proporção 1:5 (m/m) nas concentrações 5, 10 e 15% de amônia aquosa por 1h a 100°C. Pesou-se 18,0g de bagaço explodido (base seca) e colocou-se no reator e adicionou-se 100 mL de solução de NH_4OH . Em seguida, o reator foi colocado em um banho de areia a 100°C por 1 hora. Após o término da reação, esperou-se esfriar o reator. A amostra foi filtrada e lavada com 2.000 mL de água destilada fervente. O material foi deixado na capela durante a noite e no dia seguinte caracterizado para determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina. Os experimentos realizados com concentrações de 5 e 10% de solução de NH_4OH foram pré-tratados em duplicata e o experimento com 15% de solução de NH_4OH foi pré-tratado em triplicata.

3.5 Caracterização química dos bagaços de cana de açúcar

As amostras dos bagaços *in natura* e explodido não lavado foram caracterizadas de acordo com procedimento descrito por Gouveia *et al.*, 2009. O material foi cominuído em moinho de facas para obter-se uma granulometria de 20 mesh. Para as amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado (sem tratamento com amônia aquosa) determinou-se a quantidade de extrativos.

Extrativos: adicionou-se 4,0g (massa seca) de bagaço (*in natura* e explodido não lavado) em um cartucho e colocou-se em um sistema de extração (Soxhlet - Diogolab). Adicionou-se em um balão de fundo redondo 190 mL de etanol 95%. Ajustou-se a manta para fornecer um ciclo mínimo de 6 sifões por hora. Refluxou-se por 12 horas. O líquido contendo os extrativos foi colocado em rotaevaporizador até se obter um líquido viscoso. Retirou-se este líquido utilizando um pouco de etanol. Colocou-se em uma plaquinha de Petri, previamente, tarada e deixou-se na capela ligada até se obter massa constante. Calculou-se a massa de extrativo do bagaço *in natura* e do bagaço explodido não lavado.

Caracterizaram-se todas as amostras pré-tratadas e não tratadas realizando-se uma hidrólise ácida.

3.5.1 Hidrólise ácida

Em um tubo de ensaio adicionou-se 10 mL de solução de ácido sulfúrico 72% e colocou-se em banho-maria a 45°C (tampou-se o tubo de ensaio com papel alumínio). Em um béquer de 100 mL adicionou-se 1,0 g de bagaço com 10% de umidade e colocou-se o béquer em banho-maria a 45°C. Adicionou-se o ácido sulfúrico no béquer e mexeu-se com um bastão de vidro por 10 minutos. A reação foi finalizada adicionando-se 50 mL de água destilada ao béquer. O conteúdo foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 225 mL de água destilada. O Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 minutos a 1 bar a 120°C. Filtrou-se o conteúdo do Erlenmeyer em papel de filtro qualitativo (previamente, pesado e seco em estufa a 100°C) diretamente em um balão volumétrico

de 500 ml. O filtrado foi analisado por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). A fração sólida retida no papel de filtro foi lavada com 1.500 mL de água destilada, tomando-se o cuidado de lavar bem as bordas do papel. Em seguida, foi deixada na capela por uma noite.

3.5.2 Determinação da lignina solúvel

Em um balão volumétrico de 100 ml transferiu-se 5,0 mL do hidrolisado e adicionou-se 40 gotas de hidróxido de sódio 6,5 mol/L, completando o volume com água destilada. Tomou-se uma alíquota desta solução e mediu-se a absorvância a 280 nm empregando cubeta de quartzo (espectrofotômetro Pharmacia Biotech- Ultrospec 2000). Como branco foi empregado água destilada. A lignina solúvel foi determinada pela Equação 1 (Rocha *et al.*, 1997).

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \cdot 10^{-2} \cdot (A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

C_{lig} , concentração de lignina solúvel em (g/L);

A_T , absorvância da solução de lignina com os produtos de degradação;

$$A_{\text{pd}} = c_1 \cdot \epsilon_1 + c_2 \cdot \epsilon_2$$

c_1 e c_2 , são as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente, determinadas por CLAE.

$$\epsilon_1 = 146,85 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (furfural)}$$

$$\epsilon_2 = 114,00 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (HMF)}$$

3.5.3 Determinação da lignina insolúvel

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason, modificado por Rocha *et al.*, 1997. O papel de filtro contendo a fração sólida (após ter ficado uma noite na capela) foi transferido para um pesa-filtro (previamente, pesado) e

colocado em estufa a 100°C até obter massa constante. A porcentagem de lignina na amostra foi calculada pela Equação 2.

$$\%L = \left(\frac{M_k - M_c}{M_A} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

L, lignina Klason insolúvel;

M_K, massa de lignina insolúvel;

M_c, massa de cinzas da lignina;

M_A, massa da amostra seca.

3.5.4 Determinação de cinzas da lignina e do bagaço

Após se ter obtido massa constante do papel de filtro este foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente pesado e colocado em uma mufla a 150°C por 30 minutos. Em seguida aumentou-se a temperatura para 250°C, e deixou-se por 20 minutos. Por fim, incinerou-se o papel de filtro a 800°C por 2 horas. Para determinar as cinzas do bagaço pesou-se 1,0g de bagaço (base seca) e colocou-se em um cadinho, previamente tarado e procedeu-se da mesma forma utilizada para o papel de filtro (modificado de Rocha *et al.*, 1997). Calculou-se a quantidade de cinzas contida na lignina e do bagaço de acordo com a Equação 3.

$$\% \text{ cinzas} = \left(\frac{M_c}{M_a} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde:

% cinzas, porcentagem de cinzas;

M_c, massa de cinzas (massa do cadinho com cinzas – massa do cadinho vazio);

M_A, massa da amostra seca.

3.5.5 Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

As concentrações de açúcares e ácidos orgânicos foram determinadas por CLAE. Foram construídas curvas de calibração dos ácidos orgânicos (a partir de soluções padrão de ácido acético, ácido fórmico e ácido glucurônico), e dos carboidratos (a partir de soluções padrão de glicose, xilose, celobiose e arabinose). As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas por CLAE (Gouveia *et al.*, 2009). Condições experimentais: coluna HPX-87H Aminex (Bio-Rad, Organic Acid Analysis column, 300 x 7,8 mm) fase móvel solução de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 0,005 mol.L⁻¹, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno (CTO-10A) 45°C e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu.

3.5.6 Determinação de hidroximetilfurfural e de furfural

Para determinar as concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural foram realizadas análises cromatográficas (CLAE). Construíram-se curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural injetando soluções padrões destes dois compostos. As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas (Gouveia *et al.*, 2009). Condições experimentais: coluna C-18 (Waters, 3,9 x 300 mm), fase móvel solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de solução de ácido acético, vazão de 0,8 mL/min, temperatura do forno 25°C e detector UV/VIS (SPD-10A) a 274 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

3.6 Hidrólise enzimática

A Tabela 5 apresenta as condições experimentais utilizadas nos experimentos de hidrólise enzimática (sacarificação) das amostras de bagaço *in natura* e explodido.

Tabela 5. Condições experimentais empregadas nos experimentos de hidrólise enzimática (sacarificação).

Amostra de bagaço	Condição do pré-tratamento	Accellerase 1500 (FPU / g de celulose)	β-glucosidase (CBU / g de celulose)
<i>In natura</i>	Uma hora a 100 °C com soluções de NH ₄ OH (4, 10 e 15% m/m)	30	5
<i>In natura</i>	Uma hora a 100 °C com soluções de NH ₄ OH (10% m/m)	30	-
Explodido	30, 60 e 90 min. a 50 °C com solução de NH ₄ OH (15% m/m)	30	30
Explodido	Uma hora a 100 °C com soluções de NH ₄ OH (5, 10 e 15% m/m)	30	5
Explodido	Uma hora a 100 °C com soluções de NH ₄ OH (15% m/m)	30	-

3.6.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de etanol foi determinada por CLAE (coluna HPX-87H, Bio-Rad), fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a 45°C e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu). Após a hidrólise enzimática filtraram-se os materiais hidrolisados e os filtrados foram armazenados para serem utilizados nos experimentos de fermentações alcoólicas.

3.6.2 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 50°C

As amostras provenientes deste pré-tratamento (condições descritas na Tabela 5) foram submetidas à hidrólise enzimática utilizando 1% de carga de sólidos (1g bagaço: 100 mL de solução), utilizando amostras de bagaço explodido não lavado a 20 mesh e amostras pré-tratadas sem ajuste de granulometria.

A solução para a hidrólise continha 60 mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 40 mL de água destilada, 30 FPU de celulase/g de bagaço e 30 CBU de β -glucosidade/g de bagaço.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* a 50°C com agitação de 150 rpm por 72 horas. As amostras foram analisadas por CLAE.

3.6.3 Bagaço *in natura* pré-tratado com amônia aquosa a 100°C

As amostras provenientes deste pré-tratamento (condições descritas na Tabela 5) foram submetidas à hidrólise enzimática utilizando carga de sólidos de 3%, utilizando amostras de bagaço *in natura* não tratado e amostras pré-tratadas (ambas sem ajuste de granulometria).

A solução para a hidrólise continha 70 mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 30 mL de água destilada, 30 FPU de celulase/ g de celulose e 5 CBU de β -glucosidade/g de celulose.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* a 50°C com agitação de 250 rpm por 32 horas. As amostras foram analisadas por CLAE.

3.6.4 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C

As amostras provenientes deste pré-tratamento (condições descritas na Tabela 5) foram submetidas à hidrólise enzimática utilizando carga de sólidos de 7%, utilizando bagaço explodido não lavado e pré-tratados sem ajuste de granulometria.

A solução para a hidrólise continha 100 mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 30 FPU de celulase/g de celulose e 5 CBU de β -glucosidade/g de celulose.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* a 50°C com agitação de 250 rpm por 28 horas. As amostras foram analisadas por CLAE.

3.6.5 Bagaço *in natura* e explodido pré-tratados com amônia aquosa a 100°C

As amostras provenientes desse pré-tratamento (condições descritas na Tabela 5) foram submetidas à hidrólise enzimática utilizando carga de sólidos de 5% para o bagaço *in natura* e 10% para o bagaço explodido. Não se modificou a granulometria original das amostras de bagaço.

A solução para a hidrólise continha 100 mL de tampão citrato pH 4,8 (50mM), 30 FPU de celulase/g de celulose.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* a 50°C com agitação de 250 rpm por 32 horas. As amostras foram analisadas por CLAE.

3.7 Fermentação alcoólica

3.7.1 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi quantificada por CLAE (coluna HPX-87H, Bio-Rad), fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a 45°C e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu).

3.7.2 Preparo do inóculo e do meio de fermentação alcoólica

O meio de fermentação foi preparado empregando os hidrolisados. O inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyers de 300 mL, nas seguintes condições: em *shaker* a 30°C com agitação de 200 rpm por 16 horas.

Os experimentos de fermentação foram realizados em *shaker* nas seguintes condições:

- ❖ Bagaço de cana explodido não lavado tratado por 30, 60 e 90 min a 50°C fermentação alcoólica realizada em *shaker* a 30°C com agitação de 200 rpm por 4 horas;
- ❖ Bagaço de cana *in natura* tratado com 4, 10 e 15% de solução de hidróxido de amônio a 100°C fermentação alcoólica realizada em *shaker* a 30°C com agitação de 250 rpm por 4 horas;
- ❖ Bagaço de cana explodido não lavado tratado com 5, 10 e 15% de solução de hidróxido de amônio a 100°C fermentação alcoólica realizada em *shaker* a 30°C com agitação de 250 rpm por 4 horas;

Durante os experimentos amostras foram retiradas em intervalos de tempo para a quantificação da concentração de etanol (CLAE).

A Tabela 6 mostra a composição dos meios de inoculação.

Tabela 6. Composição dos meios de inoculação.

Reagentes	Explodido não lavado tratado a 50°C	<i>In natura</i> tratado a 100°C	Explodido não lavado tratado a 100°C
Glicose	20,0 g/L	20,0 g/L	20,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L	5,0 g/L	5,0 g/L
Peptona	3,0 g/L	-	3,0 g/L
Sulfato de magnésio MgSO₄· 7H₂O	2,5 g/L	2,5 g/L	2,5 g/L
Fosfato de dipotássio K₂HPO₄	1,0 g/L	1,0 g/L	1,0 g/L
Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄	5,0 g/L	5,0 g/L	5,0 g/L
Levedura	1,0 g/L	5,0 g/L	10,0 g/L
Cloreto de cálcio CaCl₂	-	0,5 g/L	-
Uréia	-	3,0 g/L	-

Modificado de Santos e Gouveia (2009).

A Tabela 7 apresenta a composição dos meios de cultivo empregado nas fermentações.

Tabela 7. Composição dos meios de fermentação.

Reagentes	Explodido não lavado tratado a 50°C	<i>In natura</i> tratado a 100°C	Explodido não lavado tratado a 100°C
Extrato de levedura	2,0 g/L	2,0 g/L	2,0 g/L
Peptona	1,0 g/L	-	1,0 g/L
Sulfato de magnésio MgSO₄. 7H₂O	0,25 g/L	0,25 g/L	0,25 g/L
Fosfato de dipotássio K₂HPO₄	0,5 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L
Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄	1,0 g/L	1,0 g/L	1,0 g/L
Uréia	-	1,0 g/L	-
Antibiótico (Kamoran)	4 ppm	4 ppm	4 ppm

Modificado de Santos e Gouveia 2009.

3.7.3 Bagaço *in natura* e explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C

As fermentações foram realizadas seguindo os planejamentos ilustrados nas Figuras 16 e 17.

- ❖ Bagaço *in natura* tratado com 10% de amônia aquosa (Figura 16).

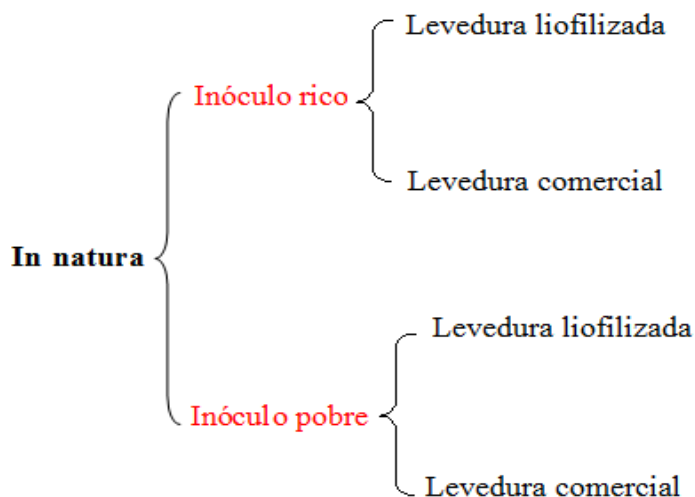


Figura 16. Planejamento dos experimentos de fermentação a partir dos hidrolisados provenientes do bagaço *in natura*.

- ❖ Bagaço explodido não lavado tratado com 15% de amônia aquosa (Figura 17).

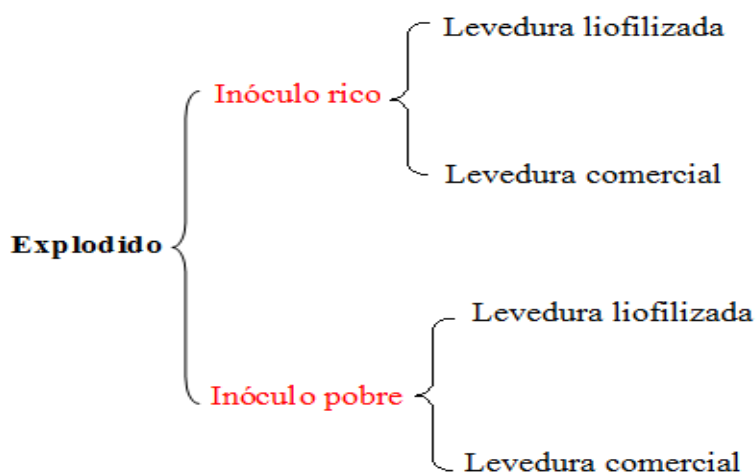


Figura 17. Planejamento dos experimentos de fermentação a partir dos hidrolisados provenientes do bagaço explodido.

Os inóculos denominados de “rico” e “pobre” foram preparados em frascos de Erlenmeyers de 300 mL com composição descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Composição dos meios de inoculação (inóculos denominados de “rico” e “pobre”).

Reagentes	Inóculo “rico”	Inóculo “pobre”
Glicose	20,0 g/L	20,0 g/L
Extrato de levedura	5,0 g/L	-
Peptona	3,0 g/L	-
Sulfato de magnésio MgSO₄. 7H₂O	2,5 g/L	2,5 g/L
Fosfato de dipotássio K₂HPO₄	1,0 g/L	-
Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄	5,0 g/L	-
Uréia	-	3,0 g/L
Levedura	10,0 g/L	10,0 g/L

Os inóculos foram preparados em frascos de Erlenmeyer em *shaker* a 30°C por 16 horas com agitação de 250 rpm. Terminado o tempo de reação, o meio foi filtrado a vácuo e a fração sólida foi empregada nas fermentações alcoólicas.

Os meios de fermentações foram preparados nos próprios hidrolisados, sendo um meio denominado de “rico” e outro meio denominado de “pobre” como mostra a Tabela 9.

Os experimentos de fermentação alcoólica foram realizados em *shaker* a 30°C por 5h com agitação de 250 rpm. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de tempo para quantificação da concentração de etanol. Estas amostras foram analisadas por CLAE.

Tabela 9. Composição dos meios de fermentações “rico” e “pobre”.

Reagentes	Meio “rico”	Meio “pobre”
Extrato de levedura	2,0 g/L	-
Peptona	1,0 g/L	-
Sulfato de magnésio MgSO₄· 7H₂O	0,25 g/L	0,25 g/L
Fosfato de dipotássio K₂HPO₄	0,5 g/L	-
Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄	1,0 g/L	-
Uréia	-	1,0 g/L
Antibiótico (Kamoran)	4 ppm	4 ppm

3.8 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras dos bagaços não tratados e pré-tratados com granulometria menor que 100 mesh foram secas em estufa a 60°C. Fixaram-se as amostras em suporte de alumínio com cola. As mesmas foram submetidas ao recobrimento com tinta de prata e em seguida a um recobrimento de 10 nm de ouro e mantidas em um dessecador até o momento da análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos bagaços *in natura* e explodido

Os bagaços de cana de açúcar *in natura* e explodido não lavado foram caracterizados utilizando a metodologia descrita por Gouveia *et al.*, 2009. A Tabela 10 apresenta a composição percentual dos constituintes do bagaço *in natura* e explodido não lavado.

Tabela 10. Composição química das amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado.

Componentes (%)	<i>In natura</i>	Explodido não lavado
Celobiose	0,7	1,8
Glicose	45,8	54,0
Xilose	22,2	16,7
Arabinose	3,3	2,2
HMF	0,4	0,2
Furfural	0,8	0,3
Lignina Klason	18,2	17,0
Lignina solúvel	6,8	13,3
Cinzas	2,1	1,7
Extrativos	5,5	3,4
Ácido acético	-	-
Ácido fórmico	-	-
Ácido glucurônico	0,9	-
Total	106,7	110,6

Para determinar os teores de celulose, hemicelulose e lignina total das amostras de bagaço de cana *in natura* e explodido utilizaram-se os fatores de conversão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Fatores de conversão para a celulose.

0,90 x massa de glicose
0,95 x massa de celobiose
1,20 x massa de HMF
3,09 x massa de ácido fórmico

Tabela 12. Fatores de conversão para a hemicelulose.

0,88 x massa de xilose
0,95 x massa de arabinose
0,72 x massa de ácido acético
1,37 x massa de ácido glucurônico

As Tabelas 13 e 14 apresentam os valores convertidos em termos de celulose, hemicelulose e lignina total dos bagaços de cana de açúcar *in natura* e explodido não lavado.

Tabela 13. Composição química do bagaço de cana *in natura*.

<i>In natura</i>	Porcentagem %
Celulose	42,4 ± 0,3
Hemicelulose	24,4 ± 0,4
Lignina total	24,9 ± 0,2
Cinzas	2,1 ± 0,4
Extrativos	5,5 ± 0,1
Total	99,3

* As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

Tabela 14. Composição química do bagaço de cana explodido não lavado.

Explodido não lavado	Porcentagem %
Celulose	50,6 ± 0,2
Hemicelulose	16,9 ± 0,1
Lignina total	30,4 ± 0,1
Cinzas	1,7 ± 0,1
Extrativos	3,4 ± 0,7
Total	103,0

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas

Na Tabela 15 apresentam-se os valores da composição de amostras de bagaço (*in natura* e explodido) descrito na literatura.

Tabela 15. Composição do bagaço *in natura* e explodido (Gouveia *et al.*, 2009).

Componentes (%)	<i>In natura</i>	Explodido
Celulose	42,8	47,7
Hemicelulose	25,8	8,9
Lignina total	22,4	34,3
Cinzas	1,4	n.a.
Extrativos	6,1	-

Observações: O bagaço explodido utilizado por Gouveia *et al.*, foi lavado exaustivamente; n.a. significa valor não apresentado.

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 14 e 15, observa-se que o teor de hemicelulose é menor no bagaço explodido não lavado quando comparado com o bagaço *in natura*. Este fato é resultado do pré-tratamento a que foi submetido o bagaço de cana (explosão a vapor), que remove boa parte da hemicelulose. O maior teor de hemicelulose na amostra de bagaço explodido analisada neste trabalho (Tabela 14) é provavelmente devido ao fato de a amostra não ter sido lavada.

A Figura 18 ilustra fotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço *in natura* e explodido não lavado.

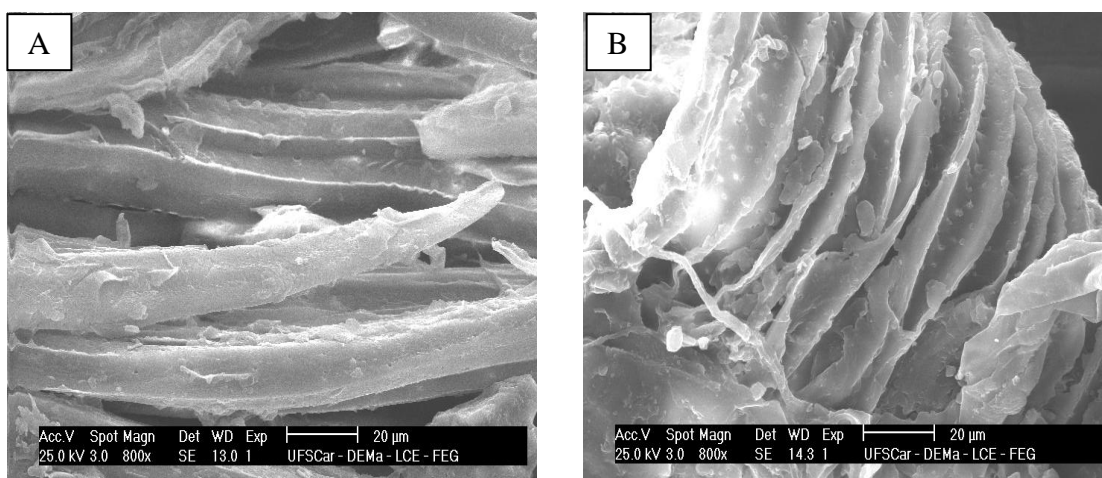


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos bagaços: (A) *in natura*, e; (B) explodido não lavado.

A partir das fotografias ilustradas na Figura 18 é possível observar que enquanto as fibras do bagaço *in-natura* encontram-se inteiras (Figura 18.A), as do bagaço explodido não lavado estão rompidas (Figura 18.B), conseqüência do pré-tratamento a que a matéria-prima foi submetida. A explosão a vapor provoca um rompimento das fibras, o que provoca um aumento considerável da área superficial (Ohgren et al., 2007).

4.1.1 Caracterização dos bagaços pré-tratados a temperatura ambiente 24±3 °C

❖ Bagaço *in natura*

A Tabela 16 apresenta os valores dos principais constituintes das amostras de bagaço *in natura* pré-tratadas por 7 dias, 15 dias e 30 dias, respectivamente, com solução de hidróxido de amônio 28% (m/m).

Tabela 16. Composição química das amostras de bagaço *in natura* tratadas por 7, 15 e 30 dias a temperatura ambiente 24±3 °C.

Componentes (%)	<i>In natura</i> tratado por 7 dias	<i>In natura</i> tratado por 15 dias	<i>In natura</i> tratado por 30 dias
Celulose	48,0 ± 0,3	49,5 ± 0,4	53,0 ± 0,1
Hemicelulose	23,7 ± 0,8	22,9 ± 0,5	21,7 ± 0,5
Lignina total	21,1 ± 0,2	19,7 ± 0,1	17,7 ± 0,1
Cinzas	4,6 ± 0,1	4,5 ± 0,6	4,1 ± 0,6
Total	97,4	96,6	96,5

* As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas

A partir dos dados apresentados na Tabela 16 observa-se um aumento na composição percentual de celulose e redução nas composições percentuais de lignina e hemicelulose nas amostras após o pré-tratamento à medida que o tempo de reação aumenta.

Após a etapa de pré-tratamento as amostras foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (Figura 19).

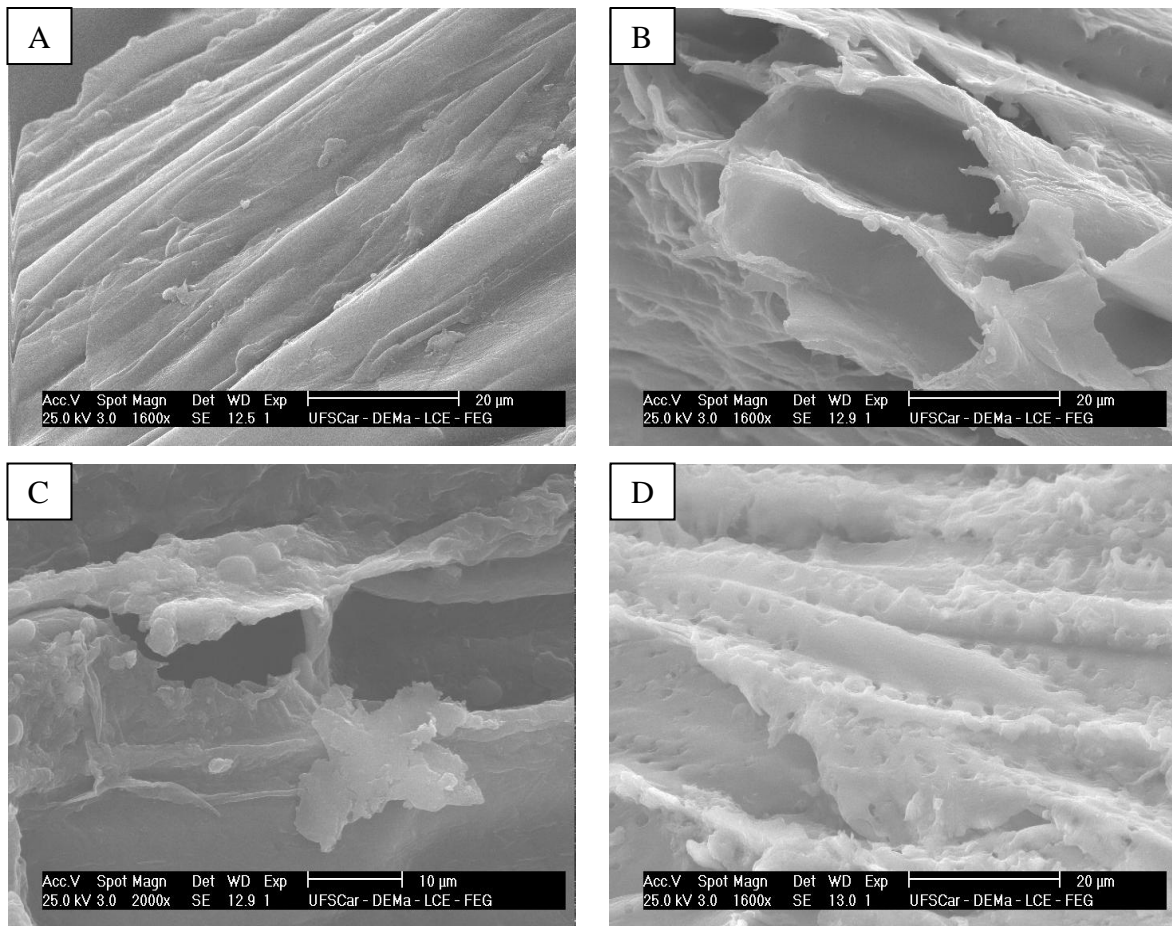


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* (A) não tratado com amônia aquosa, (B) *in natura* tratado por 7 dias, (C) *in natura* tratado por 15 dias e (D) *in natura* tratado por 30 dias.

A microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* tratado com solução de 28% de NH_4OH apresenta uma maior deformidade das fibras com o aumento no tempo de reação, sendo a maior deformação do bagaço tratado por 30 dias.

Para ilustrar a eficiência do pré-tratamento correlacionaram-se as razões das principais frações do bagaço (celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina) em função do tempo de reação. A Tabela 17 apresenta estes valores.

Tabela 17. Razões das principais frações do bagaço em função do tempo de reação para os experimentos realizados com amostras de bagaço *in natura* tratadas com solução de hidróxido de amônio (28% m/m) a $24\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tempo \ Razão	<i>In natura</i>	<i>In natura</i> tratado por 7 dias	<i>In natura</i> tratado por 15 dias	<i>In natura</i> tratado por 30 dias
Celulose/ Hemicelulose	1,739	2,022	2,158	2,445
Celulose/ Lignina	1,701	2,271	2,515	3,003
Hemicelulose/ Lignina	0,978	1,123	1,165	1,228

A partir dos dados apresentados na Tabela 17 construíram-se gráficos das razões celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina em função do tempo (Figuras de 20 a 22).

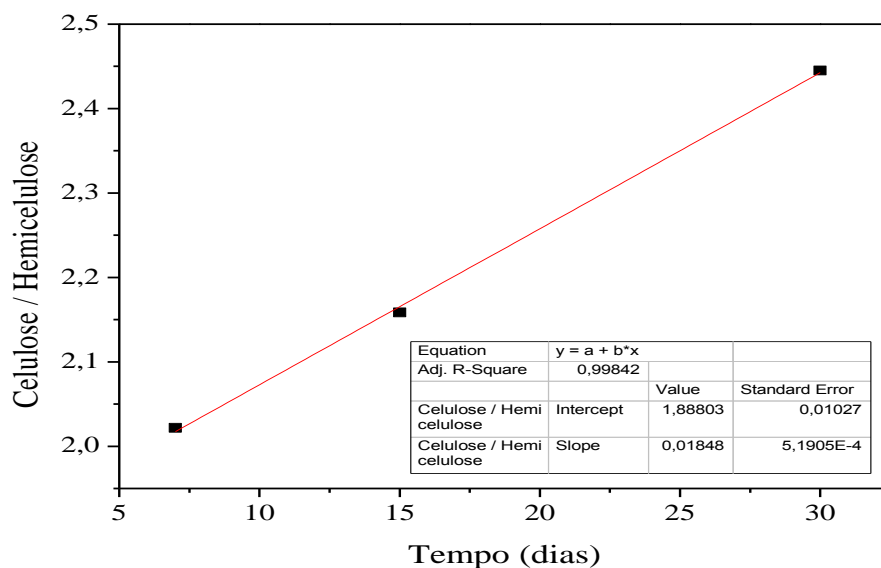


Figura 20. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente).

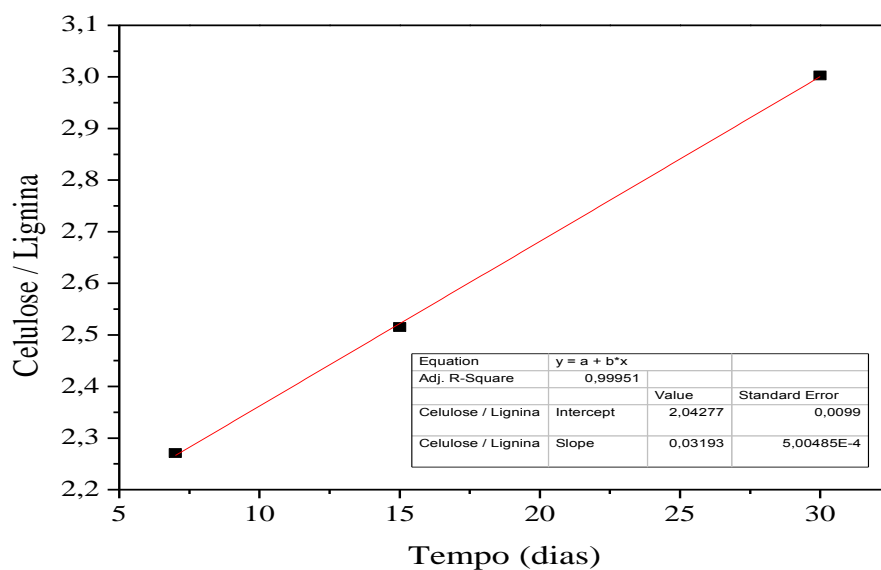


Figura 21. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente).

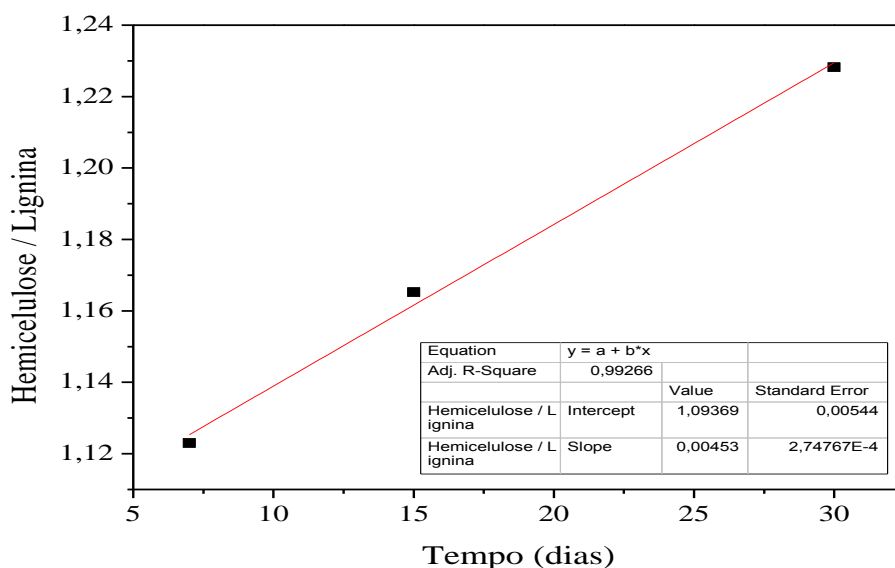


Figura 22. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço *in natura* tratado à temperatura ambiente).

Nas Figuras 20 a 22 observa-se que o valor das razões calculadas (celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina) aumentou com o tempo de reação, obtendo-se, em todos os casos, um bom ajuste linear ($R^2 > 0,99$). Embora não

se tenha quantificado o rendimento da etapa de pré-tratamento (razão entre a massa inicial da amostra e a massa final da amostra pré-tratada) verificou-se que este foi seletivo na remoção da lignina e da hemicelulose.

❖ Bagaço explodido

A Tabela 18 apresenta a composição dos constituintes das amostras de bagaço explodido tratados por 7 dias, 15 dias e 30 dias, respectivamente, com solução de hidróxido de amônio 28% (m/m) a temperatura ambiente, 24 ± 3 °C.

Tabela 18. Composição química do bagaço explodido não lavado tratado por 7, 15 e 30 dias a temperatura ambiente, 24 ± 3 °C.

Componentes (%)	Explodido tratado por 7 dias	Explodido tratado por 15 dias	Explodido tratado por 30 dias
Celulose	$67,1 \pm 0,1$	$72,4 \pm 0,1$	$74,2 \pm 0,1$
Hemicelulose	$7,5 \pm 0,1$	$6,6 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,1$
Lignina total	$18,8 \pm 0,2$	$17,6 \pm 0,1$	$15,9 \pm 0,1$
Cinzas	$3,7 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$
Total	97,1	99,2	98,0

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

Nestes experimentos observou-se um decréscimo mais significativo na composição percentual de hemicelulose quando comparado com o tratamento empregando amostra de bagaço *in natura*. Este resultado é atribuído ao fato da amostra de bagaço não ter sido previamente lavada antes de ser submetida ao pré-tratamento empregando amônia aquosa. Houve neste caso, a combinação de dois efeitos na remoção da hemicelulose. O primeiro devido à reação de despolimerização durante a etapa de explosão a vapor e o segundo devido ao pré-tratamento alcalino aquoso.

Caracterizou-se morfológicamente o bagaço explodido pré-tratado a temperatura ambiente 24 ± 3 °C, através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 23).

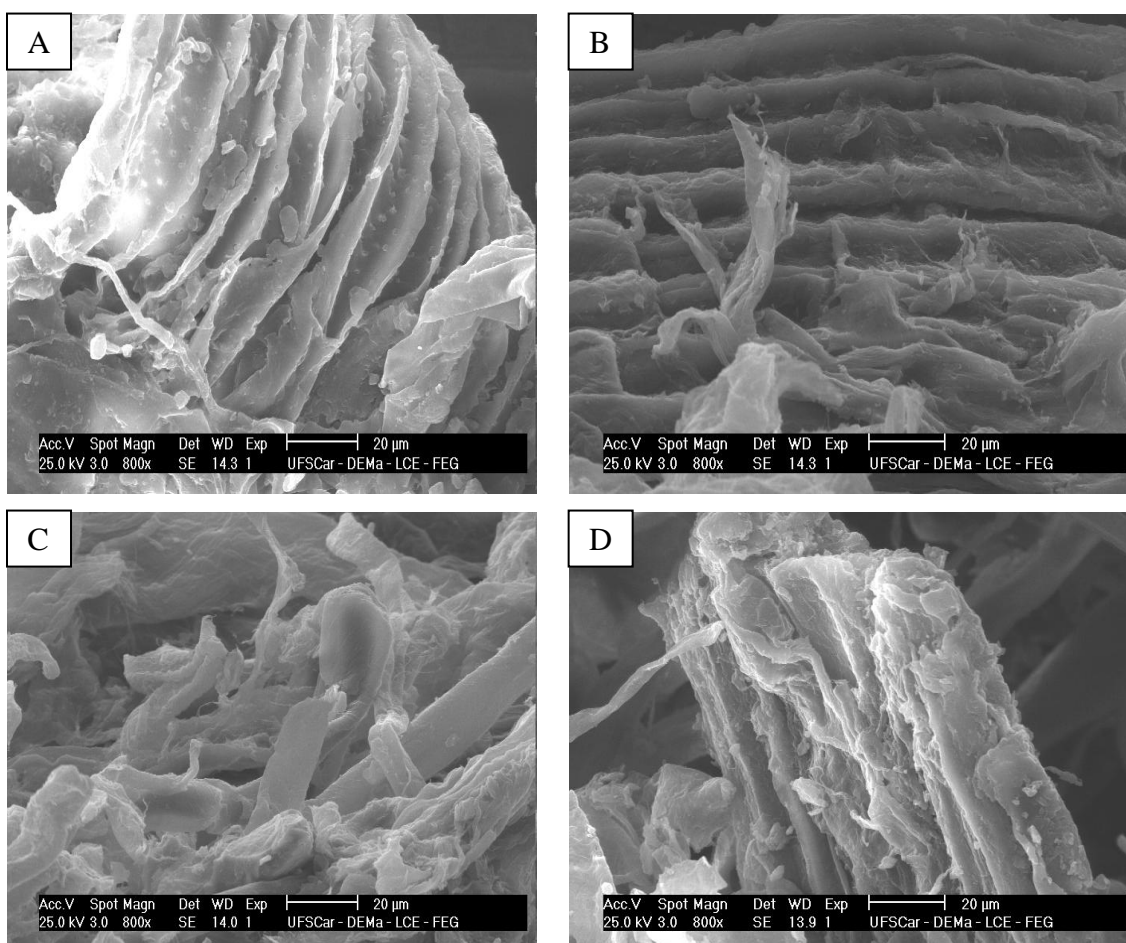


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado: (A) não tratado, (B) explodido tratado por 7 dias, (C) explodido tratado por 15 dias e (D) explodido tratado por 30 dias.

A microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço tratadas ao longo de 7, 15 e 30 dias mostrou que a partir de 15 dias de tratamento o bagaço explodido apresenta uma maior desestruturação das fibras.

Correlacionaram-se as razões entre as principais frações do bagaço de cana de açúcar explodido (celulose, hemicelulose e lignina) em função do tempo de pré-tratamento (Tabela 19).

Tabela 19. Razões das principais frações do bagaço em função do tempo de reação para os experimentos realizados com amostras de bagaço explodido não lavado tratadas com solução de hidróxido de amônio (28% m/m) a 24 ± 3 °C.

Tempo	Explodido não lavado	Explodido tratado por 7 dias	Explodido tratado por 15 dias	Explodido tratado por 30 dias
Razão				
Celulose/ Hemicelulose	2,988	8,969	10,926	13,336
Celulose/ Lignina	1,667	3,574	4,116	4,661
Hemicelulose/ Lignina	0,558	0,399	0,377	0,349

A partir dos dados apresentados na Tabela 19 construíram gráficos das razões celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina em função do tempo (Figuras de 24 a 26).

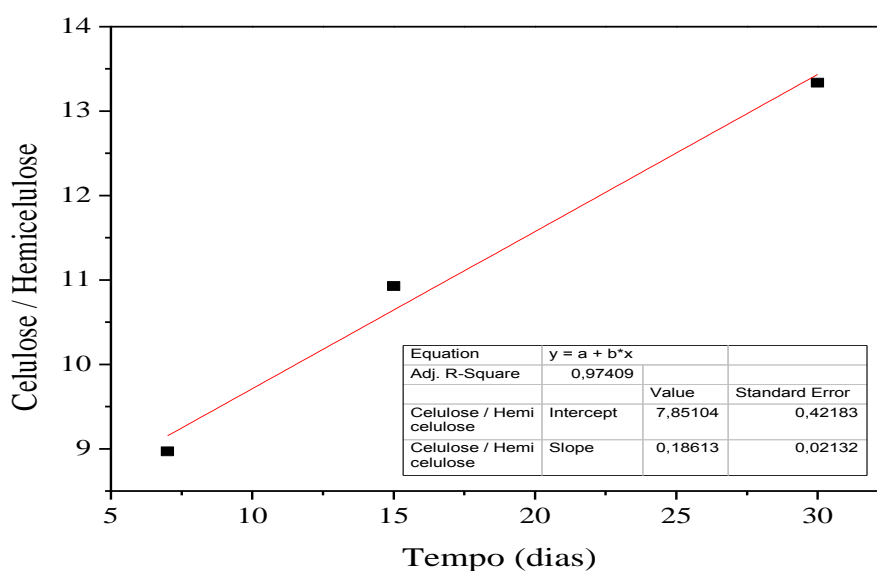


Figura 24. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente).

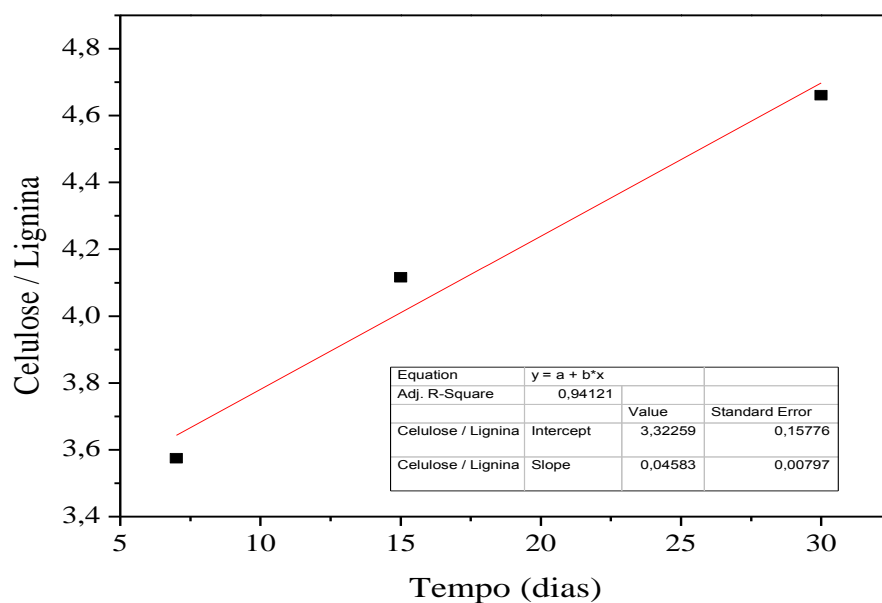


Figura 25. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente).

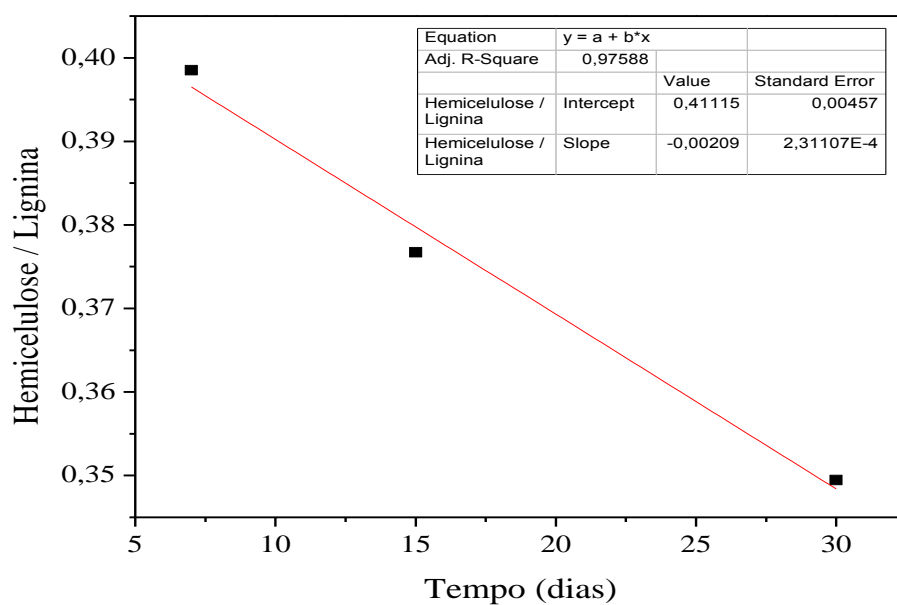


Figura 26. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura ambiente).

Nas Figuras 24 e 25 observa-se que o valor das razões calculadas aumentou com o tempo de reação, obtendo-se, em todos os casos, um satisfatório ajuste linear ($R^2 > 0,97$ para a razão celulose/hemicelulose e $0,94$ para a razão celulose/lignina). Para a razão hemicelulose/lignina (Figura 26) a variação do valor ao longo do tempo foi pequena (de $0,399$ a $0,349$) indicando que a proporção entre estas duas frações manteve-se quase que inalterada.

4.1.2 Caracterização do bagaço explodido pré-tratado a 50°C

A Tabela 20 apresenta a composição das amostras de bagaço explodido não lavado pré-tratadas por 30, 60 e 90 minutos com solução de NH₄OH 15% (m/m), respectivamente.

Tabela 20. Composição química do bagaço explodido tratado por 30, 60 e 90 minutos.

Componentes (%)	Explodido tratado por 30 min	Explodido tratado por 60 min	Explodido tratado por 90 min
Celulose	74,3 ± 0,2	75,3 ± 0,2	76,3 ± 0,2
Hemicelulose	7,0 ± 0,2	6,8 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Lignina total	17,9 ± 0,2	16,5 ± 0,2	15,5 ± 0,1
Cinzas	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2
Total	100,2	99,6	99,7

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

As amostras de bagaço tratadas com solução de hidróxido de amônio (15% m/m) a 50°C apresentaram composição percentual acima de 70% em todos os tempos de reação.

Estas amostras pré-tratadas foram caracterizadas morfológicamente, através de microscopia eletrônica de varredura, como ilustra a Figura 27.

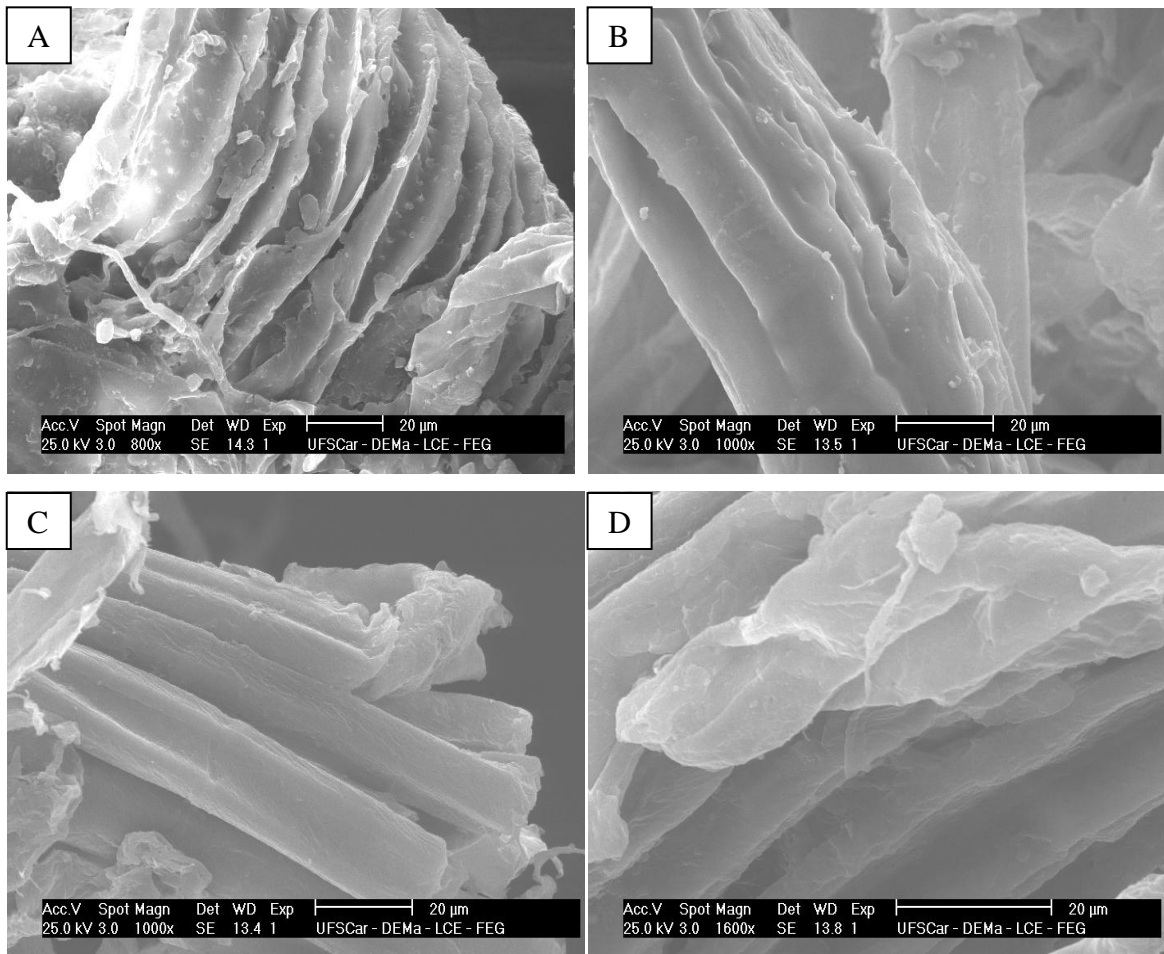


Figura 27. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado (A) não tratado, (B) tratado com solução de NH₄OH por 30 min, (C) tratado com solução de NH₄OH por 60 min e (D) tratado com solução de NH₄OH por 90 min.

O pré-tratamento foi realizado de forma branda (temperatura de 50°C com solução de 15% de NH₄OH), com um satisfatório resultado. A microscopia eletrônica mostra uma maior desestruturação das fibras após o pré-tratamento do bagaço com amônia aquosa.

Correlacionaram-se as razões entre as principais frações do bagaço de cana de açúcar explodido (celulose, hemicelulose e lignina) em função do tempo de pré-tratamento (Tabela 21).

Tabela 21. Resumo das correlações de todos os experimentos utilizando bagaço explodido tratado com 15% de solução de amônia aquosa a 50°C.

Tempo Razão	Explodido não lavado	Explodido tratado por 30 min	Explodido tratado por 60 min	Explodido tratado por 90 min
Celulose/ Hemicelulose	3,035	10,611	11,103	11,399
Celulose/ Lignina	1,694	4,140	4,551	4,930
Hemicelulose/ Lignina	0,558	0,390	0,410	0,432

A partir dos dados apresentados na Tabela 21 construíram gráficos das razões celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina em função do tempo (Figuras de 28 a 30).

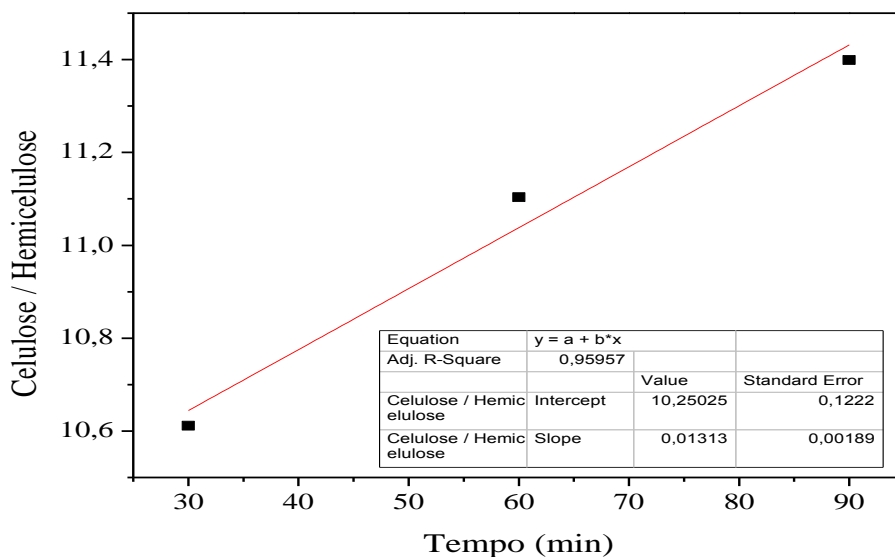


Figura 28. Razão celulose/hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C).

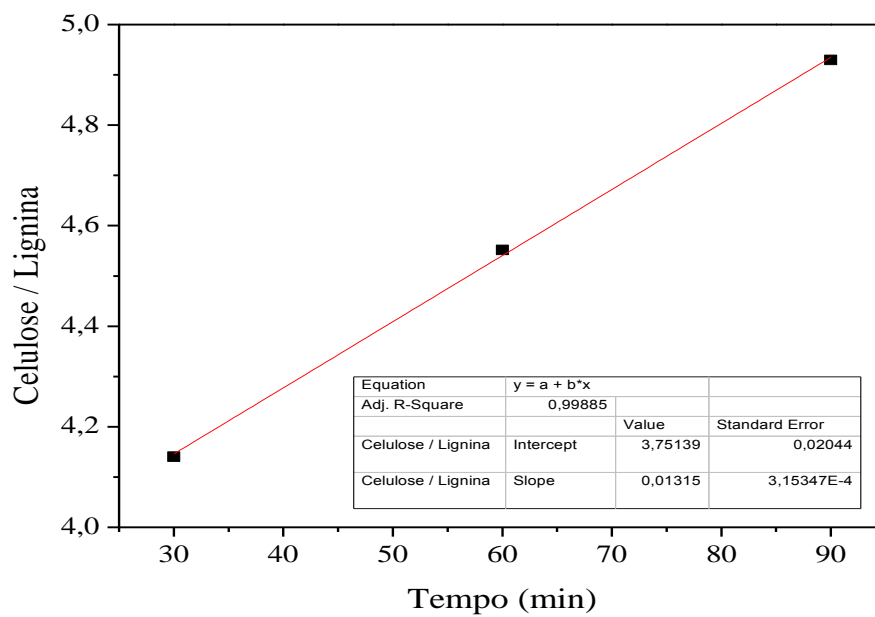


Figura 29. Razão celulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C).

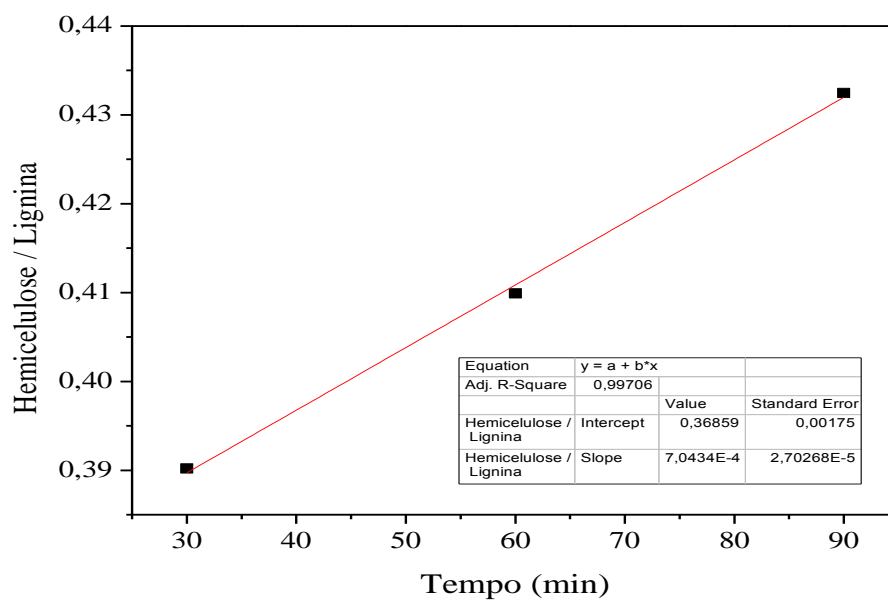


Figura 30. Razão hemicelulose/lignina em função do tempo de pré-tratamento (amostra de bagaço explodido não lavado tratado à temperatura de 50°C).

Nas Figuras 28 a 30 observa-se que o valor das razões calculadas (celulose/hemicelulose, celulose/lignina e hemicelulose/lignina) aumentou com o tempo de reação, obtendo-se, em todos os casos, um ajuste linear satisfatório ($R^2 > 0,96$). Nesta condição verificou-se que o pré-tratamento foi seletivo na remoção da lignina e da hemicelulose.

4.1.3 Caracterização do bagaço *in natura* pré-tratado a 100°C

As Tabelas 22 e 23 apresentam as composições das amostras do bagaço *in natura* pré-tratadas com solução de NH₄OH 4, 10 e 15% (m/m), respectivamente.

Tabela 22. Composição química do bagaço *in natura* tratado com solução de NH₄OH 4, 10 e 15%.

Componentes (%)	<i>In natura</i> tratado com 4% NH₄OH	<i>In natura</i> tratado com 10% NH₄OH	<i>In natura</i> tratado com 15% NH₄OH
Celulose	46,8 ± 0,2	72,0 ± 0,3	59,5 ± 0,1
Hemicelulose	22,6 ± 0,1	15,0 ± 0,1	16,6 ± 0,2
Lignina total	22,0 ± 0,2	10,5 ± 0,2	17,7 ± 0,2
Cinzas	4,0 ± 0,8	2,4 ± 0,2	3,1 ± 0,1
Total	95,4	99,9	96,9

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

Nestes experimentos os rendimentos obtidos na etapa de pré-tratamento foram calculados (Equação 4) obtendo-se os valores de: 84,1 ± 2,6 % para o pré-tratado com 4% de NH₄OH, 59,7 ± 2,2 % para o pré-tratado com 10% de NH₄OH e 55,7 ± 3,2 % para o pré-tratado com 15 % de NH₄OH. A Tabela 23 apresenta os valores das frações das amostras corrigidas em função do rendimento do pré-tratamento.

$$R = \left(\frac{\text{massa final amostra pré- tratada}}{\text{massa inicial amostra}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Tabela 23. Valores corrigidos da caracterização química das amostras de bagaço *in natura* tratadas com 4, 10 e 15% de solução de NH₄OH.

Componentes (%)	<i>In natura</i>	<i>In natura</i> tratado com 4% NH₄OH	<i>In natura</i> tratado com 10% NH₄OH	<i>In natura</i> tratado com 15% NH₄OH
Celulose	42,4 ± 0,3	39,4 ± 0,2	42,9 ± 0,3	33,1 ± 0,1
Hemicelulose	24,4 ± 0,4	19,0 ± 0,1	9,0 ± 0,1	9,3 ± 0,2
Lignina total	24,9 ± 0,2	18,5 ± 0,2	6,3 ± 0,2	9,8 ± 0,2
Cinzas	2,1 ± 0,4	3,4 ± 0,8	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Extrativos	5,5 ± 0,1			
Total	99,3			

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

A amostra de bagaço pré-tratada com 10% (m/m) de solução de NH₄OH foi a que manteve o teor de celulose no bagaço pré-tratado, removendo lignina e hemicelulose. O bagaço tratado com 15% de solução de amônia aquosa (pré-tratado em duplicata) teve a maior perda de celulose. Uma das possíveis causas seria a degradação de açúcares em condições mais severas de pré-tratamento, como relatado por Kim *et al.*, em 2004.

Caracterizou-se morfologicamente o bagaço *in natura* pré-tratado a 100°C, através de microscopia eletrônica de varredura, como ilustra a Figura 31.

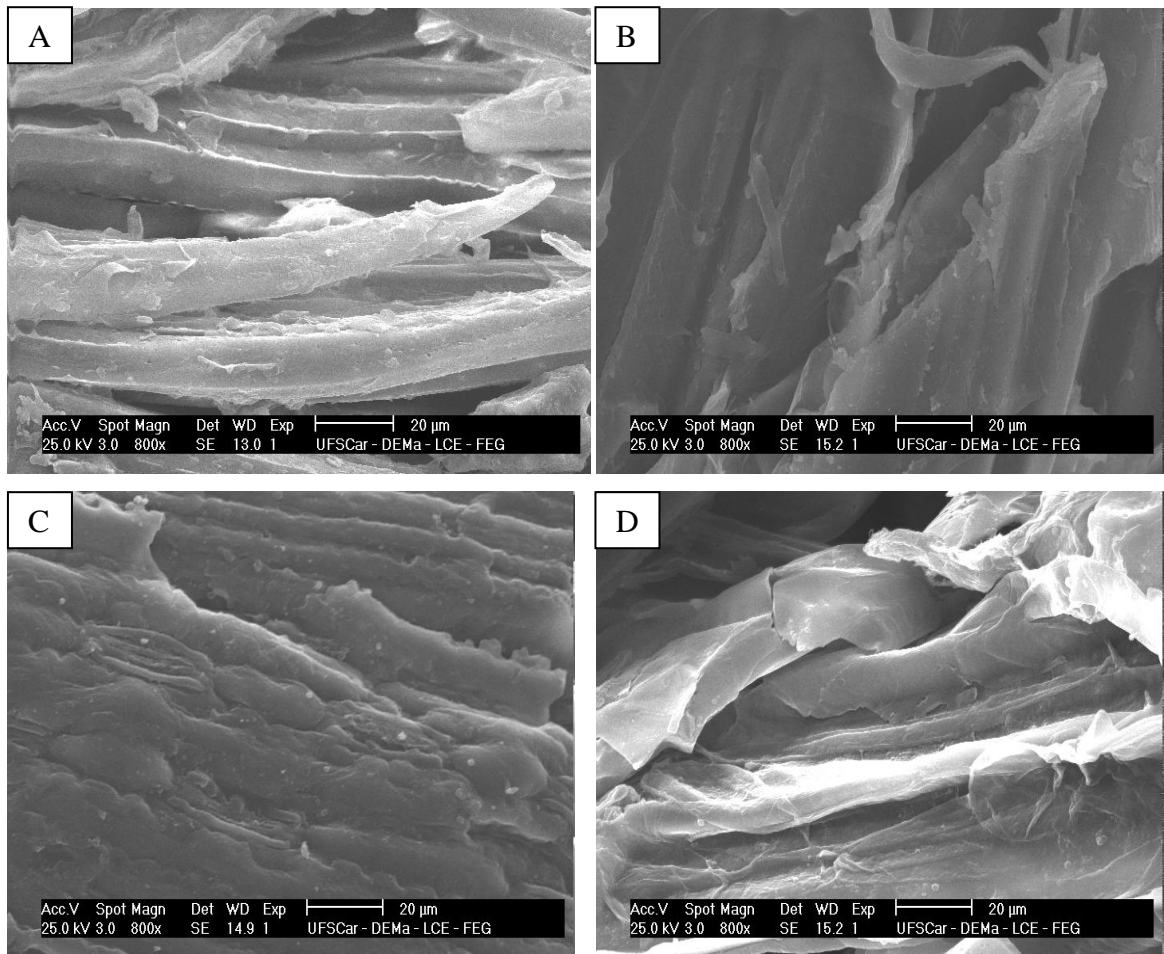


Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço *in natura*: (A) não tratado, (B) tratada com solução 4% (m/m) de NH₄OH, (C) tratada com solução 10% (m/m) de NH₄OH e (D) tratada com solução 15% (m/m) de NH₄OH.

Nas fotografias obtidas (MEV) observa-se que à medida que se aumenta a concentração da solução de hidróxido de amônio as fibras das amostras tornam-se mais abertas. A amostra pré-tratada com 15 % de NH₄OH foi a que apresentou uma maior desestruturação das fibras.

4.1.4 Caracterização do bagaço explodido pré-tratados a 100°C

As Tabelas 24 e 25 apresentam as caracterizações das amostras de bagaço explodido pré-tratadas com solução 5, 10 e 15% (m/m) de NH_4OH , respectivamente.

Tabela 24. Composição química das amostras de bagaço explodido tratadas com solução de NH_4OH 5, 10 e 15%.

Componentes (%)	Explodido tratado com 5% NH_4OH	Explodido tratado com 10% NH_4OH	Explodido tratado com 15% NH_4OH
Celulose	66,7 ± 0,2	71,3 ± 0,1	79,2 ± 0,1
Hemicelulose	7,3 ± 0,2	5,4 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Lignina total	24,8 ± 0,2	22,1 ± 0,2	15,5 ± 0,2
Cinzas	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,3
Total	100,9	100,9	100,2

As análises da caracterização química foram realizadas em triplicatas.

Os rendimentos dos pré-tratamentos foram: 74,9 ± 2,2 % para o pré-tratado com 5% de NH_4OH , 68,8 ± 1,8 % para o pré-tratado com 10% de NH_4OH e 62,9 ± 2,4 % para o pré-tratado com 15% de NH_4OH . A Tabela 25 apresenta os valores das frações das amostras corrigidas em função do rendimento do pré-tratamento.

Tabela 25. Valores corrigidos da composição das amostras de bagaço explodido tratadas com 5, 10 e 15% de solução de NH₄OH.

Componentes (%)	Explodido não lavado	Explodido tratado com 5% NH₄OH	Explodido tratado com 10% NH₄OH	Explodido tratado com 15% NH₄OH
Celulose	50,6 ± 0,2	50,0 ± 0,2	49,0 ± 0,1	49,8 ± 0,1
Hemicelulose	16,9 ± 0,1	5,5 ± 0,2	3,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Lignina total	30,4 ± 0,1	18,6 ± 0,2	15,2 ± 0,2	9,8 ± 0,2
Cinzas	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Extrativos	3,4 ± 0,7			
Total	103,0			

As análises de caracterização química foram realizadas em triplicatas.

A amostra de bagaço explodido tratada com 15% NH₄OH foi a que apresentou melhor remoção de lignina e hemicelulose. O teor de celulose permaneceu praticamente inalterado nestas amostras. As demais amostras apresentaram satisfatória remoção de lignina e hemicelulose.

Caracterizaram-se morfologicamente estas amostras de bagaço, por meio de microscopia eletrônica de varredura. As fotografias são ilustradas na Figura 32.

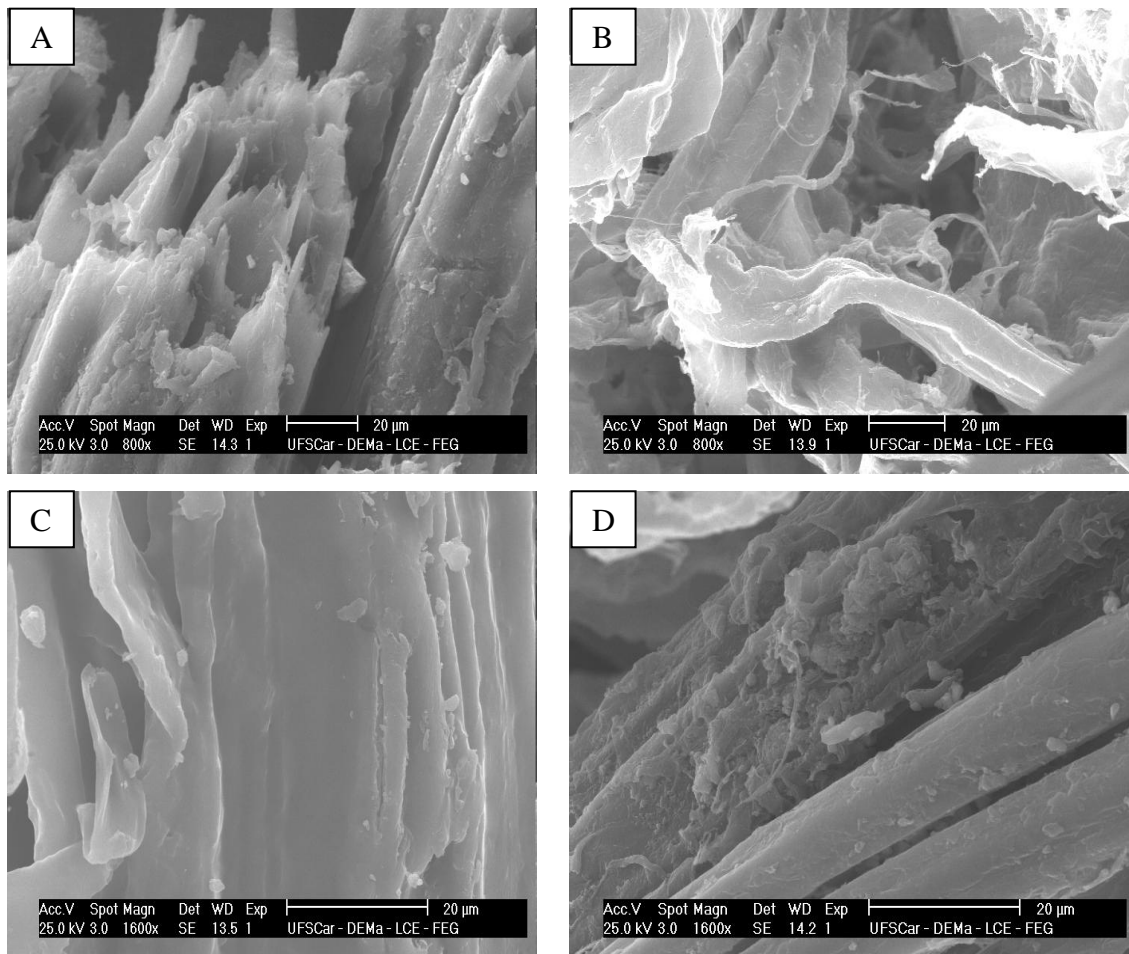


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura do bagaço explodido não lavado (A) não tratado com solução de NH₄OH, (B) explodido tratado com 5% NH₄OH, (C) explodido tratado com 10% NH₄OH e (D) explodido tratado com 15% NH₄OH.

A análise da microscopia eletrônica do bagaço explodido tratado a 100°C mostra uma desorganização das fibras dos pré-tratados, sendo o de maior teor de celulose o tratado com 15% de solução de NH₄OH.

A Tabela 26 apresenta as perdas percentuais dos três principais componentes das amostras de bagaço *in natura* e explodido (em relação à amostra não tratada) após a etapa de pré-tratamento alcalino com solução de NH₄OH.

Tabela 26. Resultados obtidos nos pré-tratamentos realizados a temperatura de 100°C para os bagaços *in natura* e explodido.

Amostra de bagaço	Condição do pré-tratamento	Perda de celulose (%)	Redução do teor de hemicelulose (%)	Redução no teor de lignina (%)
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 4%, 100°C, 1 hora.	7,1	22,1	25,7
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 10%, 100°C, 1 hora	-	63,1	74,7
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 15%, 100°C, 1 hora	21,9	61,9	60,6
Explodido	Sol. NH ₄ OH 5%, 100°C, 1 hora	1,2	67,4	38,8
Explodido	Sol. NH ₄ OH 10%, 100°C, 1 hora	3,2	78,1	50,0
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 100°C, 1 hora	1,6	87,6	67,8

A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 26 observa-se para as amostras de bagaço *in natura* a melhor condição de pré-tratamento foi a que empregou solução de NH₄OH 10%. Neste caso, o teor de celulose manteve-se praticamente inalterado, com maior remoção de lignina e hemicelulose em relação aos demais. Já para a amostra pré-tratada com solução a 15%, foi à condição menos favorável apresentando a maior redução no teor de celulose. Contudo, a remoção de lignina e hemicelulose foram satisfatórias. Nestes experimentos a elevação da temperatura promoveu um aumento na velocidade de reação.

Para o bagaço explodido a perda no teor de celulose foi menor que 3%, sendo a melhor condição obtida com solução de NH₄OH 15%. Nas condições avaliadas, quanto maior a concentração da solução de NH₄OH, melhor a remoção de lignina e hemicelulose.

As melhores condições de pré-tratamento encontradas foram:

- ❖ para o bagaço *in natura*: solução de NH₄OH 10% (m/m), tempo de reação de 60 minutos a 100 °C;
- ❖ para o bagaço explodido: solução de NH₄OH 15% (m/m), tempo de reação de 60 minutos a 100 °C.

4.2 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica

4.2.1 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 50°C

A hidrólise enzimática foi realizada em *shaker* a 50°C com agitação de 150 rpm, utilizando 1% de carga de sólidos. A fermentação foi realizada em *shaker* a 30°C com agitação de 200 rpm por 4 horas. O cromatograma do hidrolisado obtido da amostra de bagaço explodido tratado por 30 minutos encontra-se no Apêndice A.

A Figura 33 apresenta a concentração de glicose ao longo do experimento de hidrólise. O valor da concentração de glicose atingiu 3,0 g/L em 72 horas.

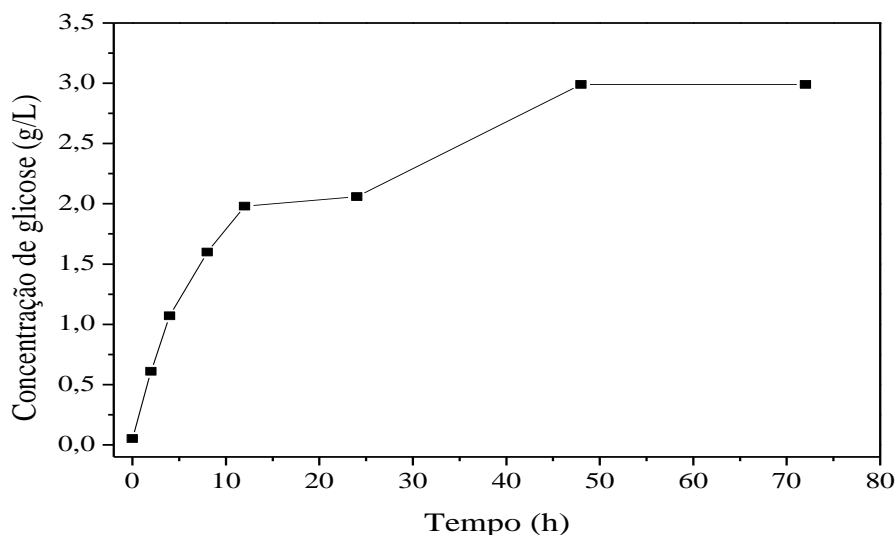


Figura 33. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 30 minutos.

Na Figura 34 visualiza-se a conversão em glicose (conversão da celulose em glicose) ao longo do experimento. A conversão máxima alcançada foi da ordem de 35,0% em 72 horas.

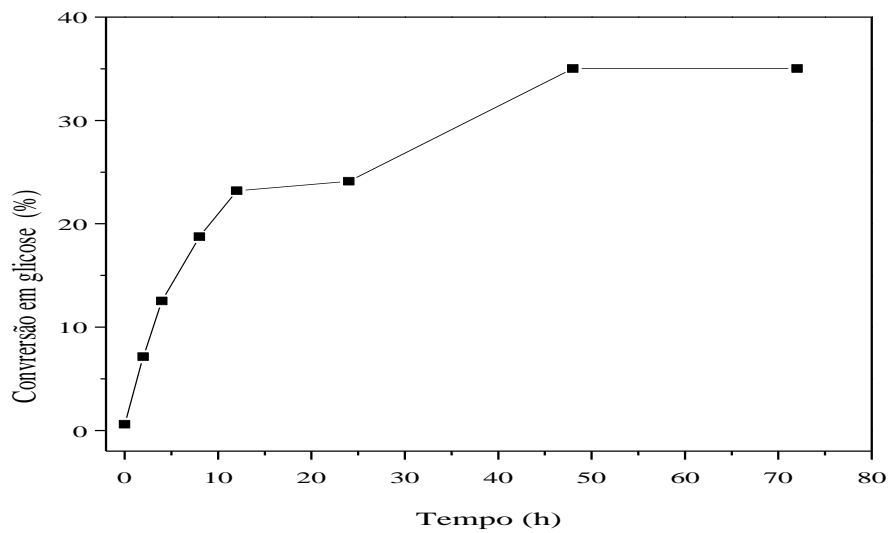


Figura 34. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado por 30 minutos.

A Figura 35 ilustra o experimento de hidrólise realizado com o bagaço explodido tratado por um período de 60 minutos. Neste ensaio a concentração máxima de glicose alcançada foi de 3,8 g/L. No Apêndice A cromatograma do hidrolisado obtido do experimento tratado por 60 min.

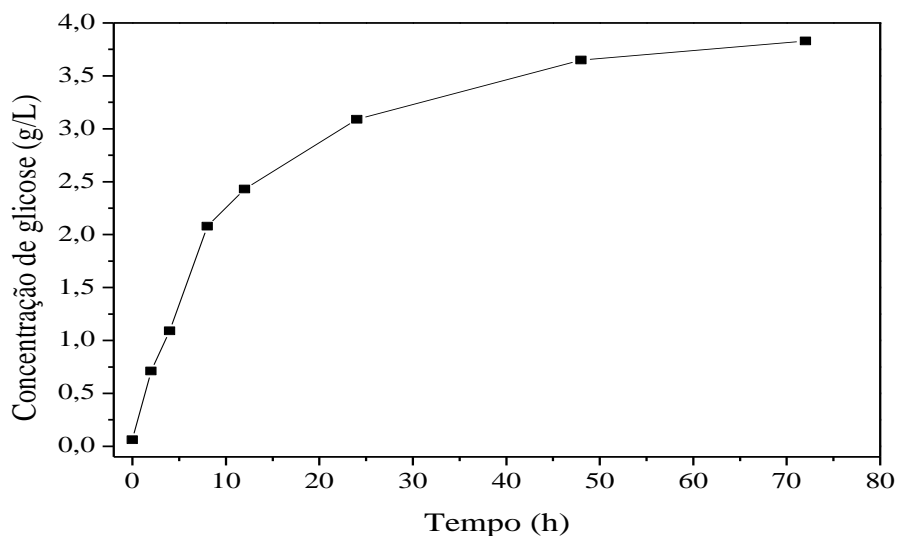


Figura 35. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 60 minutos.

A conversão da hidrólise enzimática ao longo deste experimento é apresentada na Figura 36. Neste ensaio a conversão máxima foi de 46,1% em 72 horas de hidrólise.

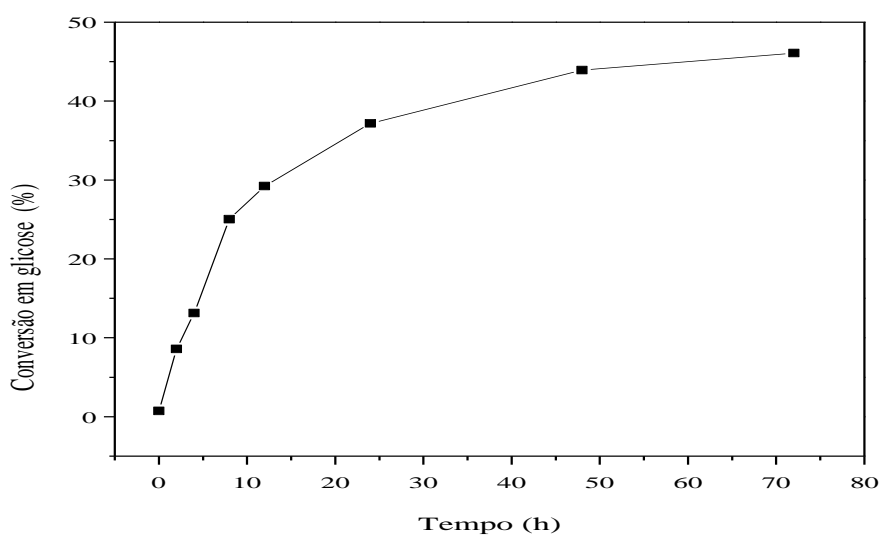


Figura 36. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado por 60 minutos.

A Figura 37 mostra a concentração de glicose ao longo do experimento de hidrólise do bagaço explodido tratado por período de 90 minutos. A concentração máxima de glicose obtido neste ensaio foi de 3,2 g/L. Cromatograma do hidrolisado pré-tratado por 90 min no Apêndice A.

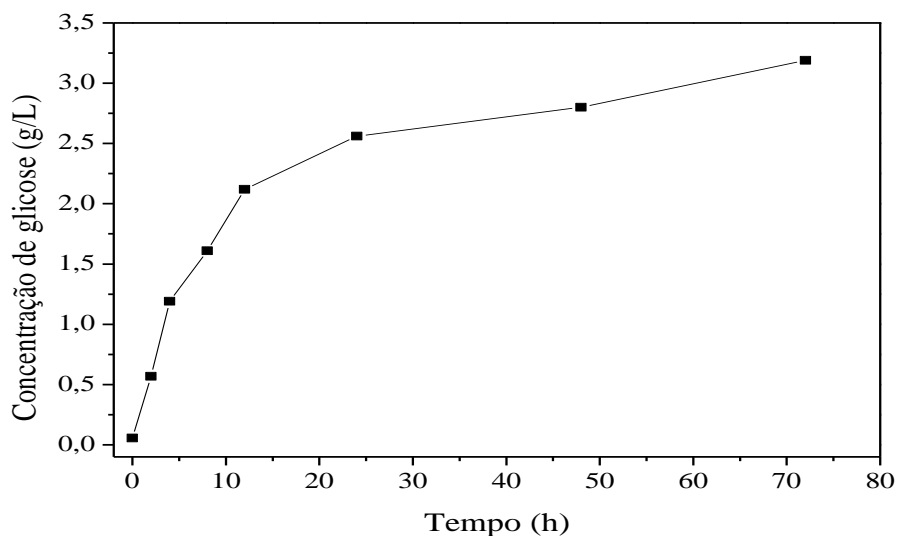


Figura 37. Concentração de glicose durante o experimento de hidrólise do bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m) a 50°C por 90 minutos.

Na Figura 38 apresenta-se o gráfico do rendimento da hidrólise ao longo do experimento. Neste ensaio a conversão máxima obtida foi de 38,1%.

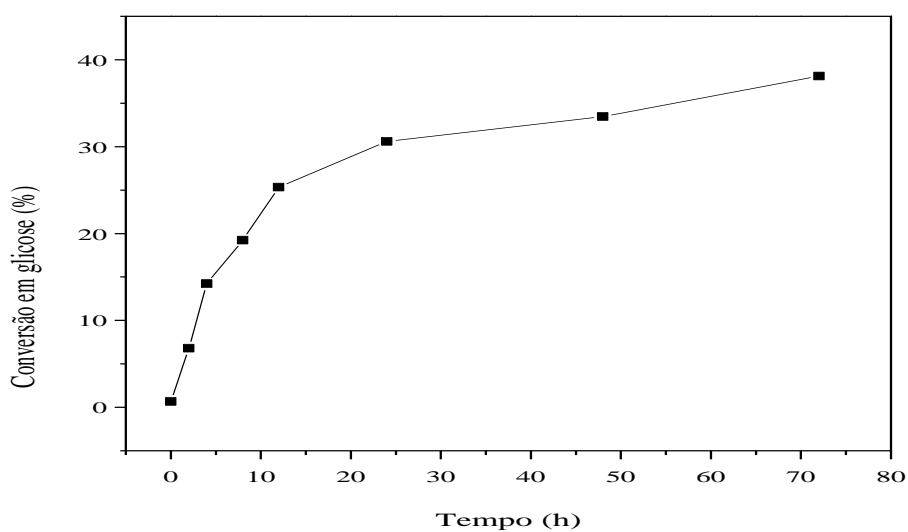


Figura 38. Conversão em glicose do bagaço explodido tratado 90 minutos.

Realizou-se também experimento de hidrólise enzimática utilizando bagaço explodido não lavado a 20 mesh (com a mesma carga de sólidos e de enzimas). A concentração de glicose ao longo deste ensaio é apresentada na Figura 39. O valor máximo da concentração de glicose alcançada foi de 3,0 g/L, em 72 horas. Cromatograma do hidrolisado do bagaço não lavado a 20 mesh no Apêndice A.

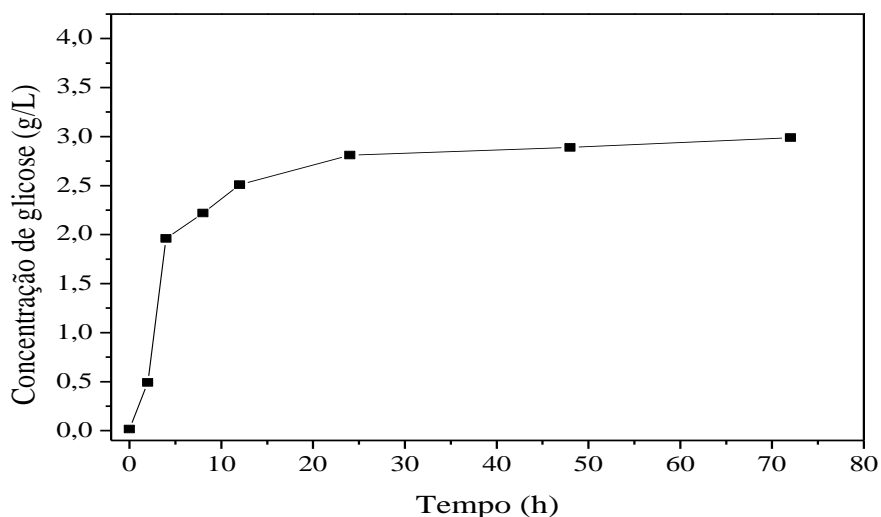


Figura 39. Concentração de glicose ao longo de experimento de hidrólise enzimática do bagaço explodido (cominuído a 20 mesh).

A Figura 40 apresenta o gráfico do rendimento da hidrólise enzimática do bagaço explodido não lavado a 20 mesh. O rendimento máximo foi de 48,6%.

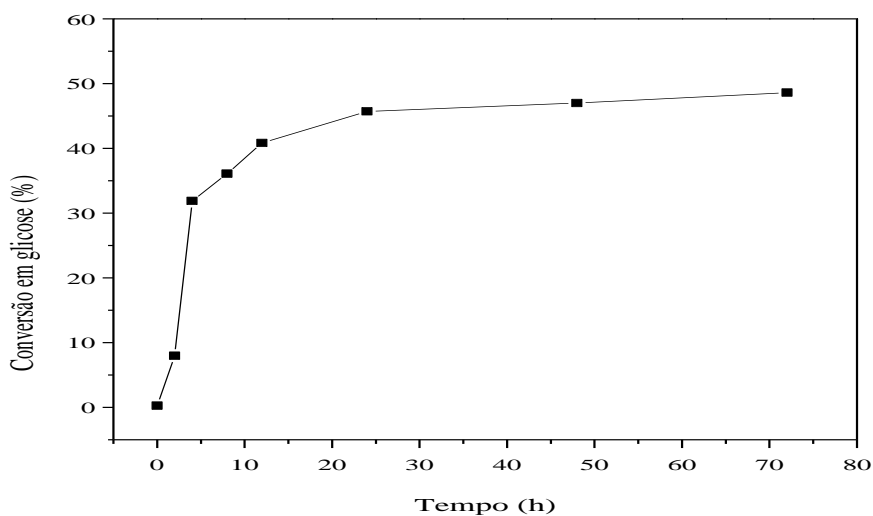


Figura 40. Conversão em glicose do bagaço explodido (cominuído a 20 mesh).

Os hidrolisados oriundos da hidrólise enzimática foram submetidos à fermentação alcoólica. A Tabela 27 apresenta os resultados obtidos nestes experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

Tabela 27. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação das amostras de bagaço explodido não tratado e pré-tratados com solução de NH_4OH 15% (m/m).

Bagaço Explodido	Conversão em glicose (%)	C_{etanol} (g/L)	Eficiência (%)	$Y_{p/s}$
30 minutos	35,0	1,0	68,6	0,35
60 minutos	46,1	1,5	75,4	0,39
90 minutos	38,1	1,2	75,2	0,39
Não lavado (20 mesh)	48,6	1,3	83,0	0,43

4.2.2 Bagaço *in natura* pré-tratado com amônia aquosa a 100°C

Estes experimentos empregaram uma carga de sólidos de 3%. A Figura 41 apresenta o gráfico da concentração de glicose ao longo do tempo nos experimentos realizados. A maior concentração de glicose foi de 13,4 g/L (bagaço tratado com 10% de NH_4OH) alcançando conversão máxima de 64,2%. O valor da menor conversão foi para o bagaço não tratado com NH_4OH cerca de 37,7 %.

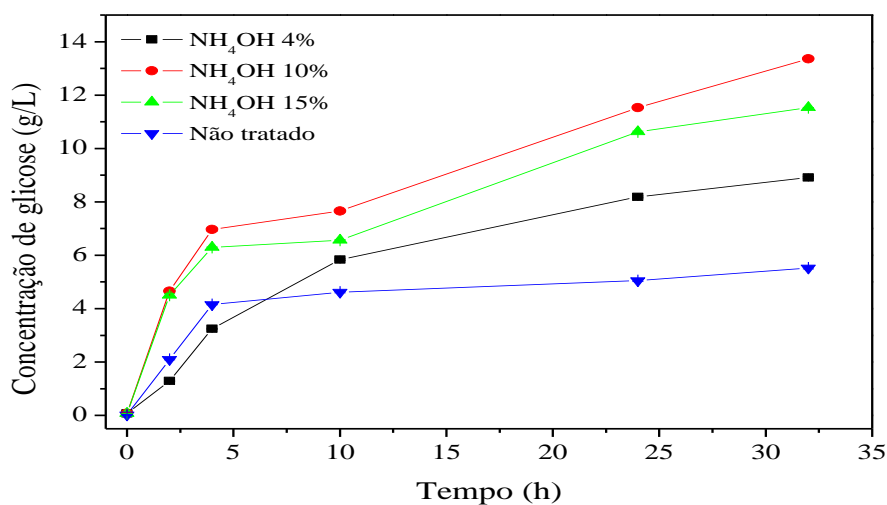


Figura 41. Concentração de glicose ao longo dos experimentos empregando bagaço *in natura* não tratado com amônia aquosa e bagaço *in natura* pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 4, 10 e 15% (m/m).

A Figura 42 apresenta os valores da concentração de etanol obtidas na fermentação dos hidrolisados. A maior concentração de etanol foi obtida no experimento que utilizou 10% de solução de NH_4OH (m/m). Neste experimento a concentração de etanol alcançou o valor de 5,7 g/L.

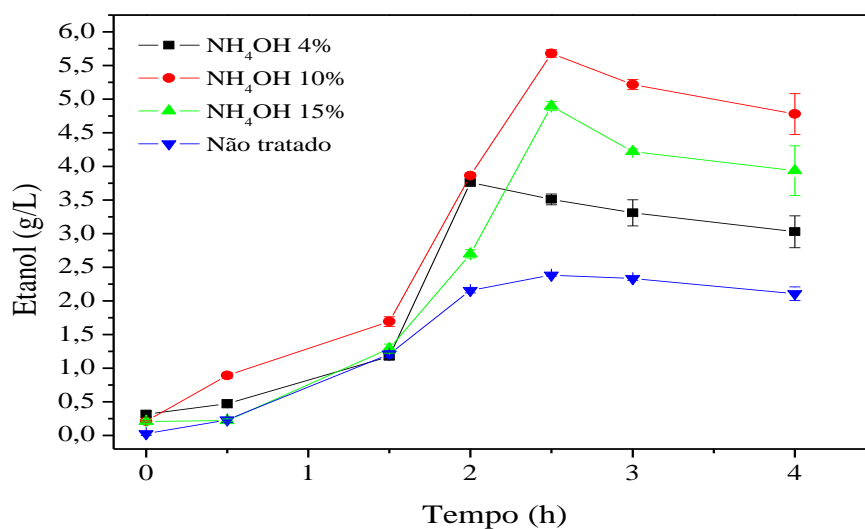


Figura 42. Concentração de etanol dos bagaços *in natura* não tratado e pré-tratado com solução de NH₄OH nas concentrações de 4, 10 e 15% (m/m).

A Tabela 28 resume os resultados obtidos nestes experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica do bagaço *in natura*.

Tabela 28. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica das amostras do bagaço *in natura* não tratado com NH₄OH e pré-tratados a 100°C.

Bagaço <i>In natura</i>	Conversão em glicose (%)	C _{max} etanol (g/L)	Eficiência (%)	Y _{p/s}
NH ₄ OH 4%	57,2	3,8	82,5	0,42
NH ₄ OH 10%	64,2	5,7	83,2	0,43
NH ₄ OH 15%	58,6	4,9	83,1	0,43
Não tratado com NH ₄ OH	37,7	2,4	84,6	0,43

4.2.3 Bagaço explodido pré-tratado com amônia aquosa a 100°C

Os experimentos foram realizados com 7% de carga de sólidos. As condições experimentais das etapas de hidrólise e fermentação foram às mesmas dos experimentos anteriores. A Figura 43 apresenta o gráfico da concentração de glicose obtida em cada um dos diferentes experimentos realizados.

A máxima concentração de glicose foi obtida no experimento utilizando 15% de solução de NH_4OH foi de 48,8 g/L. E a menor concentração de glicose foi para o bagaço explodido não tratado com solução de NH_4OH cerca de 21,1 g/L.

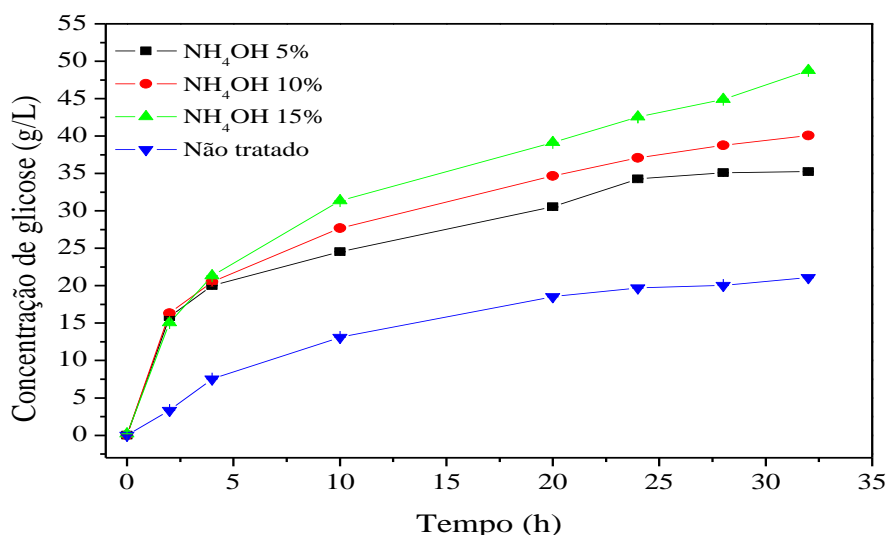


Figura 43. Concentração de glicose ao longo dos experimentos empregando bagaço explodido não tratado e explodido pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/m).

A máxima conversão obtida foi de 79,9% no experimento que utilizou bagaço explodido pré-tratado com solução de NH_4OH (15% m/m). A menor conversão foi para o bagaço explodido não tratado com solução de NH_4OH cerca de 58,0%.

A Figura 44 apresenta o gráfico da fermentação alcoólica dos pré-tratados explodido a 100°C e do bagaço não tratado com solução de amônia aquosa. A maior concentração de etanol foi do pré-tratado com 15% de solução de NH_4OH alcançando 22,6 g/L.

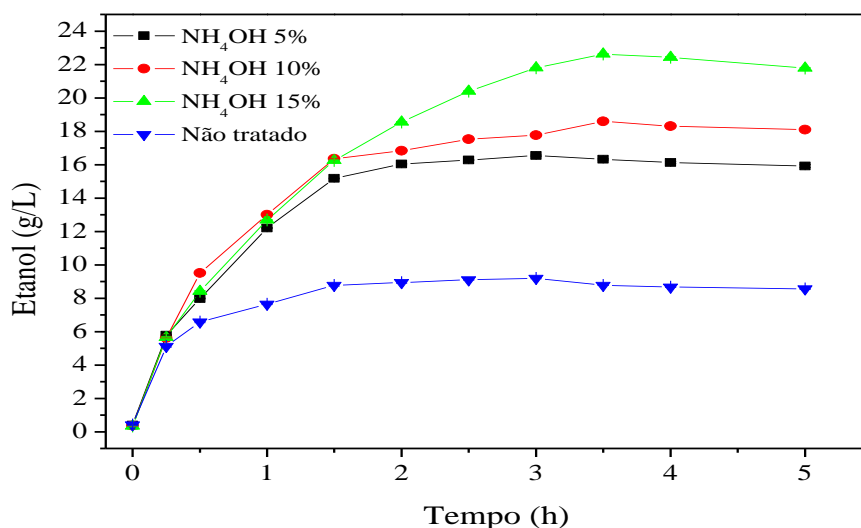


Figura 44. Concentração de etanol do bagaço explodido não tratado e pré-tratado com solução de NH_4OH nas concentrações de 5, 10 e 15% (m/m).

A Tabela 29 resume os resultados obtidos nestes experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica do bagaço explodido.

Tabela 29. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação das amostras do bagaço explodido não tratado com NH_4 e pré-tratados a 100°C.

Bagaço Explodido	Conversão em glicose (%)	$C_{\text{max etanol}}$ (g/L)	Eficiência (%)	$Y_{p/s}$
NH₄OH 5%	70,5	16,5	91,9	0,47
NH₄OH 10%	76,7	18,6	90,8	0,46
NH₄OH 15%	79,9	22,6	90,8	0,46
Não tratado com NH₄OH	58,0	9,2	85,4	0,44

4.2.4 Bagaço *in natura* e explodido pré-tratados com amônia aquosa a 100°C

Nestes experimentos empregaram-se amostras de bagaço pré-tratadas nas melhores condições: *in natura* tratado com solução de NH_4OH 10% (m/m) (5% carga de sólidos) e explodido com solução de NH_4OH 15 % (m/m) (10% carga de sólidos), ambos por 1h a 100°C.

Os experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica foram realizados nas mesmas condições anteriores. A Figura 45 mostra o gráfico de concentração de glicose pelo tempo. A máxima concentração de glicose foi de 26,0 g/L e o máxima conversão na etapa de hidrólise foi de 69,7% para o bagaço *in natura*.

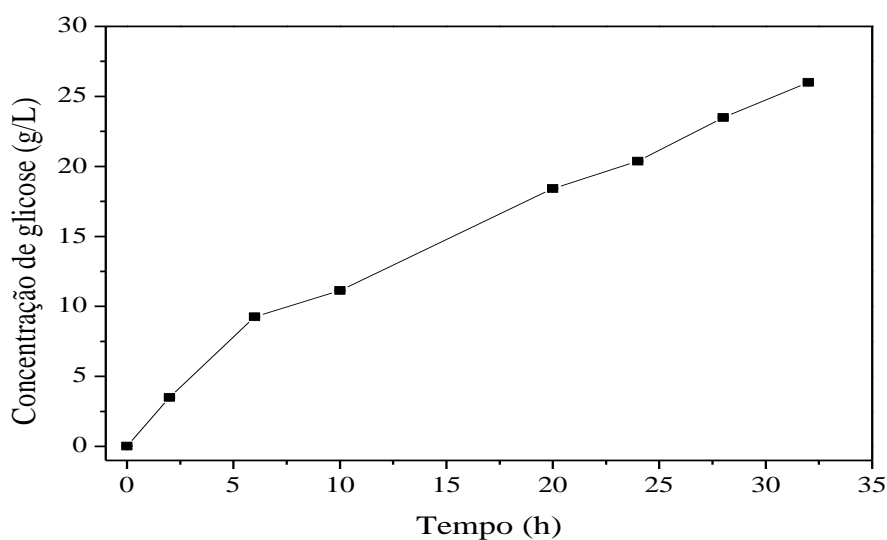


Figura 45. Concentração de glicose do bagaço *in natura* pré-tratado com solução de NH_4OH 10% (m/m).

A Figura 46 apresenta o gráfico da fermentação alcoólica do pré-tratado *in natura* a 100°C em várias condições de preparo de inóculo. Foram realizados quatro experimentos nos quais foram avaliados duas linhagens de levedura e dois inóculos. A maior concentração de etanol foi para o inóculo denominado “rico” com levedura liofilizada cerca de 12,0 g/L (eficiência de 90,3%) e a menor concentração de etanol foi

do inóculo denominado “pobre” utilizando levedura comercial 10,6 g/L (eficiência de 79,5%).

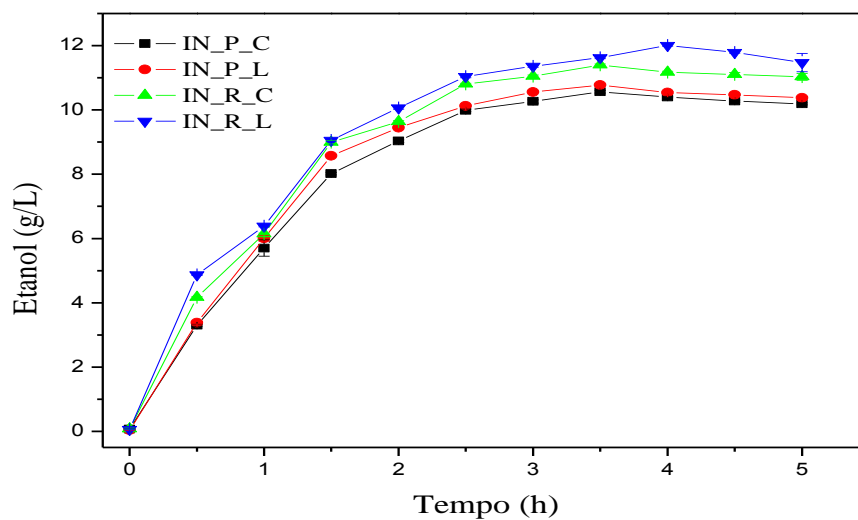


Figura 46. Concentração de etanol do bagaço *in natura* em várias condições de preparo de inóculo.

Legenda:

IN_P_C: Inóculo pobre com levedura comercial;

IN_P_L: Inóculo pobre com levedura liofilizada;

IN_R_C: Inóculo rico com levedura comercial;

IN_R_L: Inóculo rico com levedura liofilizada.

A Tabela 30 apresenta a influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica para o bagaço *in natura* tratado com 10% de solução de NH₄OH.

Tabela 30. Influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica do hidrolisado proveniente da amostra de bagaço *in natura*.

Inóculos	C_{max} etanol (g/L)	Eficiência (%)	Y_{p/s}
IN_P_C	10,6	79,5	0,41
IN_P_L	10,8	81,0	0,41
IN_R_C	11,4	85,8	0,44
IN_R_L	12,0	90,3	0,46

A Figura 47 mostra o gráfico de concentração de glicose do bagaço explodido tratado com 15% de solução de NH_4OH ao longo do tempo. A concentração máxima de glicose foi de 74,5 g/L e a conversão máxima foi de 82,1%.

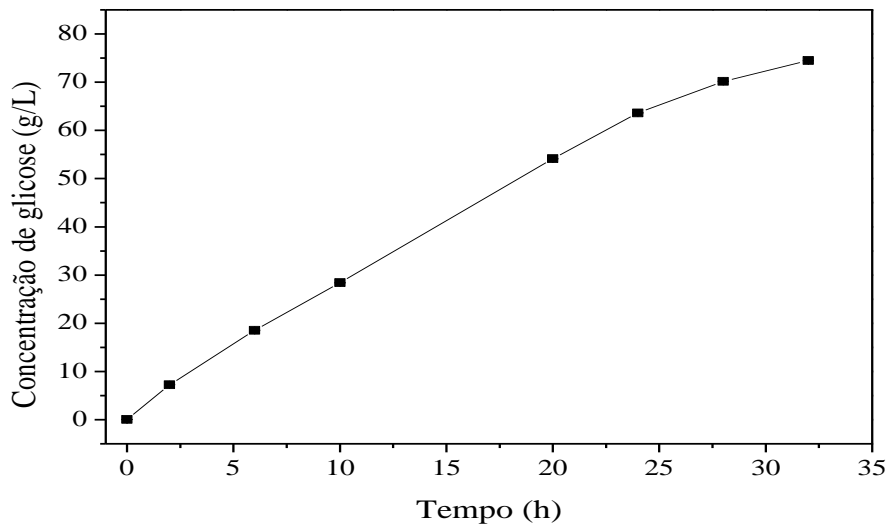


Figura 47. Concentração de glicose do bagaço explodido pré-tratado com 15% de solução de NH_4OH .

A Figura 48 apresenta o gráfico da concentração de etanol realizada com o hidrolisado proveniente do bagaço explodido pré-tratado. Neste experimento a maior concentração de etanol foi obtida com o emprego do inóculo denominado “rico” com a levedura liofilizada: 34,3 g/L (eficiência da fermentação de 90,1%). A menor concentração de etanol foi com o inóculo denominado “pobre” utilizando levedura comercial: 29,6 g/L (eficiência de 77,7%).

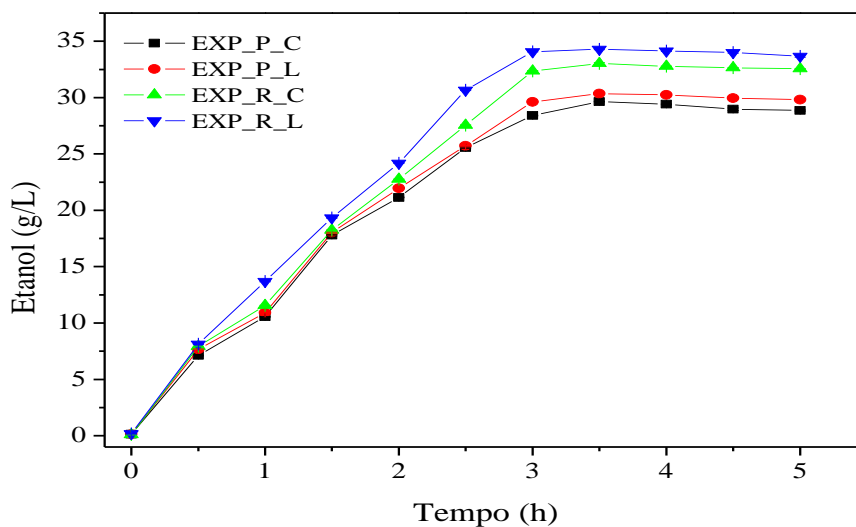


Figura 48. Concentração de etanol do bagaço explodido em várias condições de preparo de inóculo.

Legenda:

EXP_P_C: Inóculo pobre com levedura comercial;

EXP_P_L: Inóculo pobre com levedura liofilizada;

EXP_R_C: Inóculo rico com levedura comercial;

EXP_R_L: Inóculo rico com levedura liofilizada.

A Tabela 31 apresenta a influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica do bagaço explodido tratado com 15% de solução de NH_4OH .

Tabela 31. Influência dos inóculos no desempenho da fermentação alcoólica do hidrolisado proveniente da amostra de bagaço explodido.

Inóculos	$C_{\text{max etanol}}$ (g/L)	Eficiência (%)	$Y_{p/s}$
EXP_P_C	29,6	77,9	0,40
EXP_P_L	30,4	79,8	0,41
EXP_R_C	33,0	86,8	0,44
EXP_R_L	34,3	90,1	0,46

A Tabela 32 apresenta um resumo de todos os resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica empregando hidrolisados obtidos a partir de amostras de bagaço *in natura* e explodido submetidas à etapa de pré-tratamento.

Tabela 32. Resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica das amostras dos bagaços *in natura* e explodido pré-tratados.

Amostra de bagaço	Condição do pré-tratamento	Carga de sólidos (%)	Conversão em glicose (%)	Eficiência de fermentação (%)
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 50°C, 30 min.	1	35,0	68,6
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 50°C, 60 min.	1	46,1	75,4
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 50°C, 90 min.	1	38,1	75,2
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 4%, 100°C, 1 hora.	3	57,2	82,5
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 10%, 100°C, 1 hora	3	64,2	83,2
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 15%, 100°C, 1 hora	3	58,6	83,1
<i>In natura</i>	Sol. NH ₄ OH 10%, 100°C, 1 hora	5	69,7	90,3
Explodido	Sol. NH ₄ OH 5%, 100°C, 1 hora	7	70,5	91,9
Explodido	Sol. NH ₄ OH 10%, 100°C, 1 hora	7	76,7	90,8
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 100°C, 1 hora	7	79,9	90,8
Explodido	Sol. NH ₄ OH 15%, 100°C, 1 hora	10	82,1	90,1

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na etapa de pré-tratamento empregando solução de NH_4OH a diferentes concentrações e condições experimentais conclui-se que:

- ❖ Nos experimentos realizados com bagaço *in natura* e explodido a temperatura ambiente houve um aumento da composição percentual de celulose. Nas condições avaliadas o pré-tratamento mostrou-se seletivo na remoção da lignina e hemicelulose. A melhor condição foi obtida para as amostras pré-tratadas por 30 dias;
- ❖ Nos experimentos realizados com bagaço explodido a temperatura de 50°C e com concentração da solução de NH_4OH de 15% (m/m) por tempos de reação de 30, 60 e 90 minutos, obteve-se um incremento na composição percentual de celulose para o tempo de reação de 90 minutos. Nas condições avaliadas o pré-tratamento mostrou-se seletivo na remoção da lignina e hemicelulose;
- ❖ Nos experimentos realizados a 100°C por 60 minutos com amostras de bagaço *in natura* e explodido variou-se a concentração da solução de NH_4OH (4, 5, 10 e 15%). Para a amostra de bagaço *in natura* tratado com concentração de 10% NH_4OH quase não houve perda de celulose. A remoção de lignina e hemicelulose foram satisfatórias. Para a amostra de bagaço explodido a melhor condição foi obtida na concentração de 15% de solução de NH_4OH . Nesta condição, obteve-se a maior remoção de lignina e hemicelulose.

Estes resultados apontam preliminarmente para a potencialidade da utilização do pré-tratamento por amônia aquosa no processo de produção de etanol celulósico. A composição da amostra de bagaço *in natura* obtida na melhor condição de pré-tratamento (10% de NH_4OH , 100°C e 60 minutos) foi: celulose (42,9%), hemicelulose (9,0%) e lignina total (6,3%), com rendimento de 59,7%. Para a amostra de bagaço explodido, a melhor condição de pré-tratamento foi obtida empregando solução de

NH₄OH 15%, a 100°C por 60 minutos. (celulose (49,8%), hemicelulose (2,1%) e lignina total (9,8%), com rendimento de 62,9%.

Os experimentos de hidrólise enzimática empregando as amostras de bagaço *in natura* obtiveram os seguintes resultados:

- ❖ Amostras pré-tratadas a 100°C por 60 minutos, concentração de NH₄OH (4, 10 e 15%), carga de sólidos de 3%, carga de enzima de 30 FPU/g de celulose e 5 CBU/g de celulose: rendimento de hidrólise (conversão em glicose) de 64,2% para a amostra tratada com solução 10% NH₄OH;
- ❖ Amostra pré-tratada a 100°C por 60 minutos, solução 10% de NH₄OH, 10% de carga de sólidos e carga de enzima de 30 FPU/g de celulose: rendimento de hidrólise (conversão em glicose) de 69,7%.

Os experimentos de hidrólise enzimática realizados com amostras de bagaço explodido pré-tratadas obtiveram os seguintes resultados:

- ❖ Amostras pré-tratadas com solução de NH₄OH 15% (m/m), a 50°C, carga de sólidos de 1% e carga enzimática de 30 FPU/g de bagaço e 30 CBU/g de bagaço: rendimentos de hidrólise (conversão em glicose) de 35,0% (30 minutos), 46,1% (60 minutos) e 38,1% (90 minutos);
- ❖ Amostras pré-tratadas a 100°C por 60 minutos com soluções de NH₄OH (5, 10 e 15%), carga de sólidos 7% e carga enzimática de 30 FPU/g de celulose e 5 CBU/g de celulose: melhor rendimento de hidrólise (conversão em glicose) para a amostra tratada com solução 15% de NH₄OH, 79,9%;
- ❖ Amostra pré-tratada a 100°C por 60 minutos, solução 15% de NH₄OH, 10% de carga de sólidos e 30 FPU/g de celulose: rendimento de hidrólise (conversão em glicose) de 82,1%.

O resultado da hidrólise enzimática da amostra de bagaço *in natura* pré-tratado na melhor condição apresentou rendimento de hidrólise (conversão em glicose) melhor que o da amostra de bagaço explodido não lavado. Os valores obtidos foram 69,7% para o bagaço *in natura* tratado com 10% de solução de NH₄OH e 58,0% para o bagaço explodido não lavado, embora os experimentos tenham sido realizados com diferentes cargas de sólidos (5% para o *in natura* e 7% para o explodido). As eficiências obtidas na fermentação foram da mesma ordem, 85%.

Nos experimentos realizados com diferentes cargas de enzima verificou-se não ser necessária a complementação com a enzima β -glucosidase.

Nos experimentos realizados com amostra de bagaço explodido o aumento na carga de sólidos de 7 para 10% não influenciou no rendimento da hidrólise enzimática (conversão em glicose), variação da ordem de 3%.

A fermentação dos hidrolisados obtidos na etapa de pré-tratamento foi realizada empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens comercial e industrial). As eficiências na conversão da glicose a etanol foram acima de 78% para as fermentações empregando meio “pobre” e da ordem de 88% para os experimentos utilizando meio “rico”. Em todos os experimentos realizados a levedura industrial apresentou uma maior eficiência em relação à levedura comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. A.; JEFFRIES, T. W. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 1, p. 2-19, jan. 1990.

ANDERSON, E.; MECHTMAN, J.; SEELEY, M. Hemicelluloses from cottonseed hulls. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 175-179, nov. 1938.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress of Energy Combined Science**, v. 34, p. 551-573, out. 2008.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol**, São Paulo, dez. 2006.

BARNET, J. A. The utilization of sugars by yeast. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 126-234, 1976.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, jan. 1994.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES); CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE) (Org.). **Bioetanol de Cana de Açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, Nov. 2008. 316 p.

BRASILEIRO, L. B.; COLODETTE, J. L.; PILÓ-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 819-829, abril 2001.

DÁRIO, M. G. et al. Fermentação de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas no gene SUC2. **54º Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador, set. 2008.

ESTEGHLALIAN, A. et al. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 129-136, mar. 1997.

ENTIAN, K. D.; BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 12, p. 506-510, dez. 1992.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis. **Springer - Verlag**. New York, v. 3, 1987.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FORESTRY COMMISSION. **Extraction Technologies for Tree Metabolites**. Disponível em: <<http://tree-chemicals.csl.gov.uk/review/extraction.cfm>>. Acesso em: 30 mar. 2010.

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

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

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

HAN, M. et al. Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 606-611, 2009.

HOLTZAPPLE, M.T.; LUNDEEN, J. E.; STURGIS, R. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 5-21, 1992.

JAYARAMAN, K. Manufacturing sisal-polypropylene composites with minimum fibre degradation. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 367-374, 2003.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 343-364, fev. 2008.

KIM, M.; AITA, G.; DAY, D. F. Compositional in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 34-40, nov. 2009.

KIM, T. H.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B. Pretreatment and fractionation of corn stover by soaking in ethanol and aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 171-179, jan. 2009.

KIM, T. H. **Bioconversion of Lignocellulosic Material into Ethanol**: pretreatment, enzyme hydrolysis, and ethanol fermentation. Ph.D. Dissertation, Department of Chemical Engineering, Auburn University, Auburn, AL. Adviser: Y.Y. Lee, 2004, 173 p.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p. 147-150, 2004.

KURAKAKE, M. et al. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse, and switchgrass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 251-259, 2001.

LORA, J. H.; WAYMAN, M. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. **Tappi Journals**, v. 61, p. 47-50, 1978.

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do Efeito do Inóculo e do Perfil de Alimentação do Mosto na Produção em Escala Piloto e Industrial de Etanol**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 2004, 80 p.

McGINNIS, G. D.; WILSON, W. W.; MULLEN, C. E. Biomass pretreatment with water and high-pressure oxygen. **Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 22, n. 2, p. 352-357, jun. 1983.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E; BAKER, J. O; Overend, R. P. (Eds), **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994.

MOK, W. S.; ANTAL, M. J.; VARHEGYI, G. Productive and parasitic pathways in dilute acid-catalyzed hydrolysis of cellulose. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 31, n. 1, p. 94-100, 1992.

MOREIRA, A.L. et al. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana de açúcar. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 35-42, jan./jun. 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Savier Editora, 2002.

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

PHILIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K. Limiting factor in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.51/52, p. 117-124, 1995.

PIETAK, A. et al. Novel technique for characterizing the surface of natural fibres. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 3627-3635, 2007.

PITARELO, A.P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana de Açúcar a Bioconversão via Pré-tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, 2007, 142 p.

PORRO, D. et al. Flow-cytometric determination of the respiratory activity in growing *saccharomyces cerevisiae* populations. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 2, p. 193-197, mar. 1994.

RABELO, S. C. **Avaliação de Desempenho do Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana de Açúcar.** Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia química, 2007, 180 p.

REN, J.L.; SUN, R.C.; PENG, F. Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 4, p. 786-793, abr. 2008.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

ROCHA, G. J. M. et al. Resumos do 5th Brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components, Paraná, Brasil, 1997.

RUFFELL, J. **Pretreatment and Hydrolysis of Recovered Fibre for Ethanol Production.** Master degree, The University of British Columbia, Vancouver. Chemical and Biological Engineering, 2008, 110 p.

SEVERO, J. R. **O Álcool, O Brasil E O Mundo**, Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/artigos/o-alcool-o-brasil-e-o-mundo>> Acesso em: 10 dez. 2009.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, V. F. N. **Estudos de Pré-tratamento e Sacarificação Enzimática de Resíduos Agroindustriais como Etapas no Processo de Obtenção de Etanol Celulósico**. Tese de mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Departamento de Biotecnologia, 2009, 116 p.

SIVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 43-52, 1995.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1-11, 2002.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J. Fractional separation and physico-chemical analysis of lignins from the black liquor of oil palm trunk fiber pulping. **Separation and Purification Technology**, v. 4, p. 529-539, 2001.

TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 45-70, 1967.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR (ÚNICA). **Setor sucroenergético** - mapa da produção. Disponível em: <www.unica.com.br>. Acesso em: 10 dez. 2009.

WALCH, E. et al. Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 173-177, 1992.

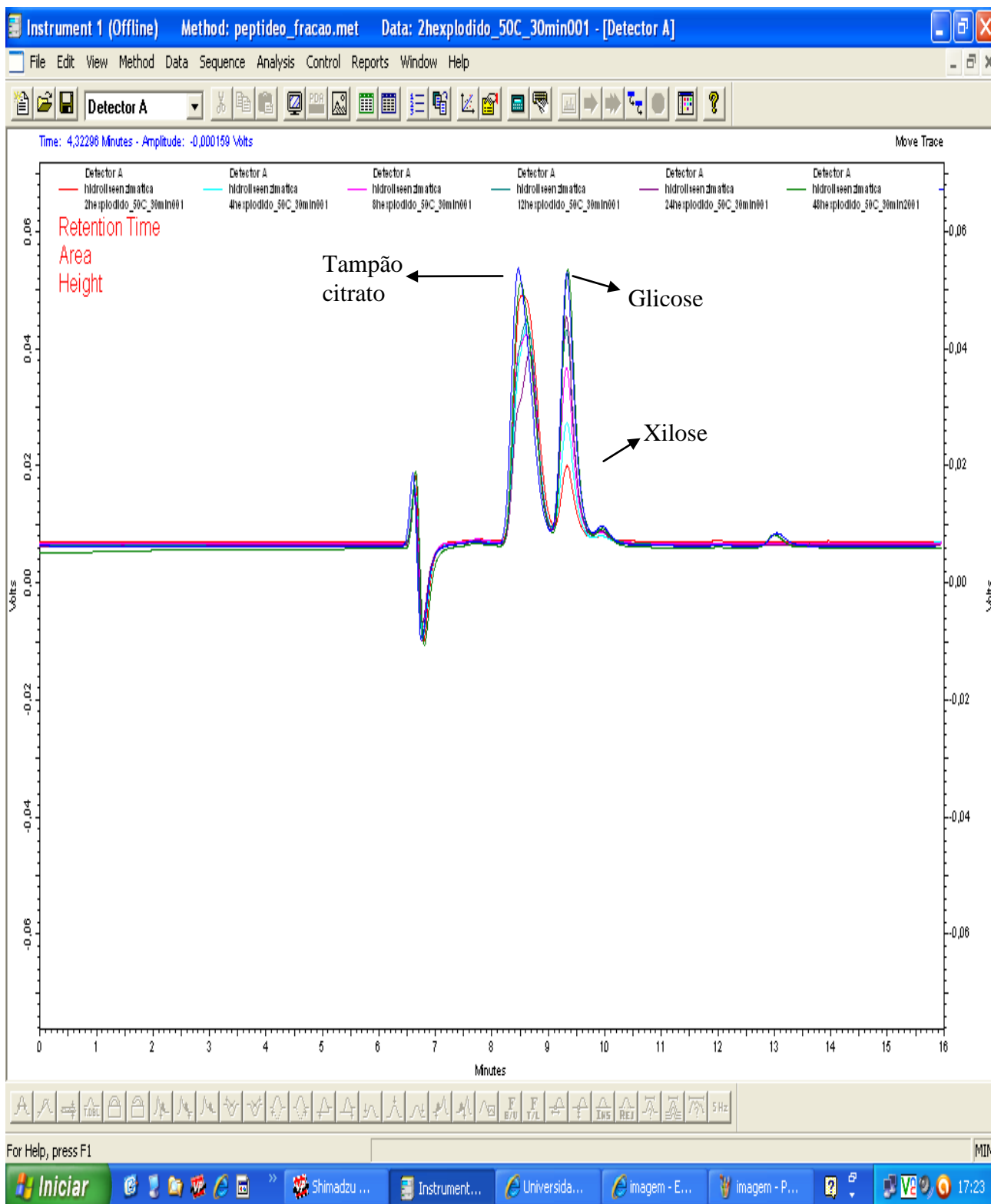
WHISTLER, R. L.; RICHARDS, E. L. Hemicelluloses. In: PIGMAN W.; HORTON D. (Eds.). **The carbohydrates, Chemistry and Biochemistry**. New York: Academic, v. IIA, p. 447-469, 1970.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5756-5762, 2008.

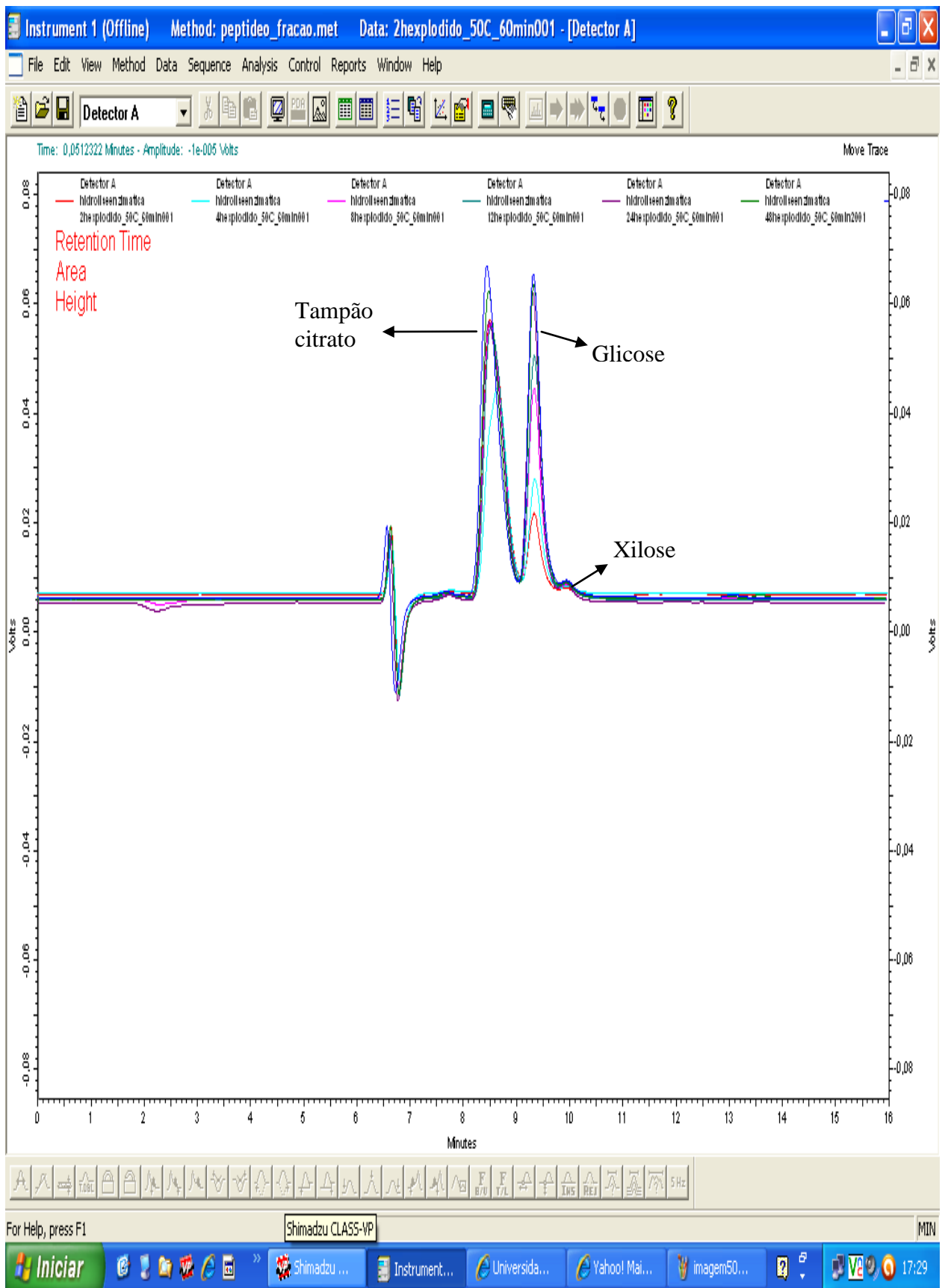
YOON, H. H. Pretreatment of lignocellulosic biomass by autohydrolysis and aqueous ammonia percolation. **Korea Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 6, p. 631-636, 1998.

YOON, H. H.; WU, Z. W.; LEE, Y. Y. Ammonia-recycled percolation process for pretreatment of biomass feedstock. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 51/52, n. 1, p. 5-19, 1995.

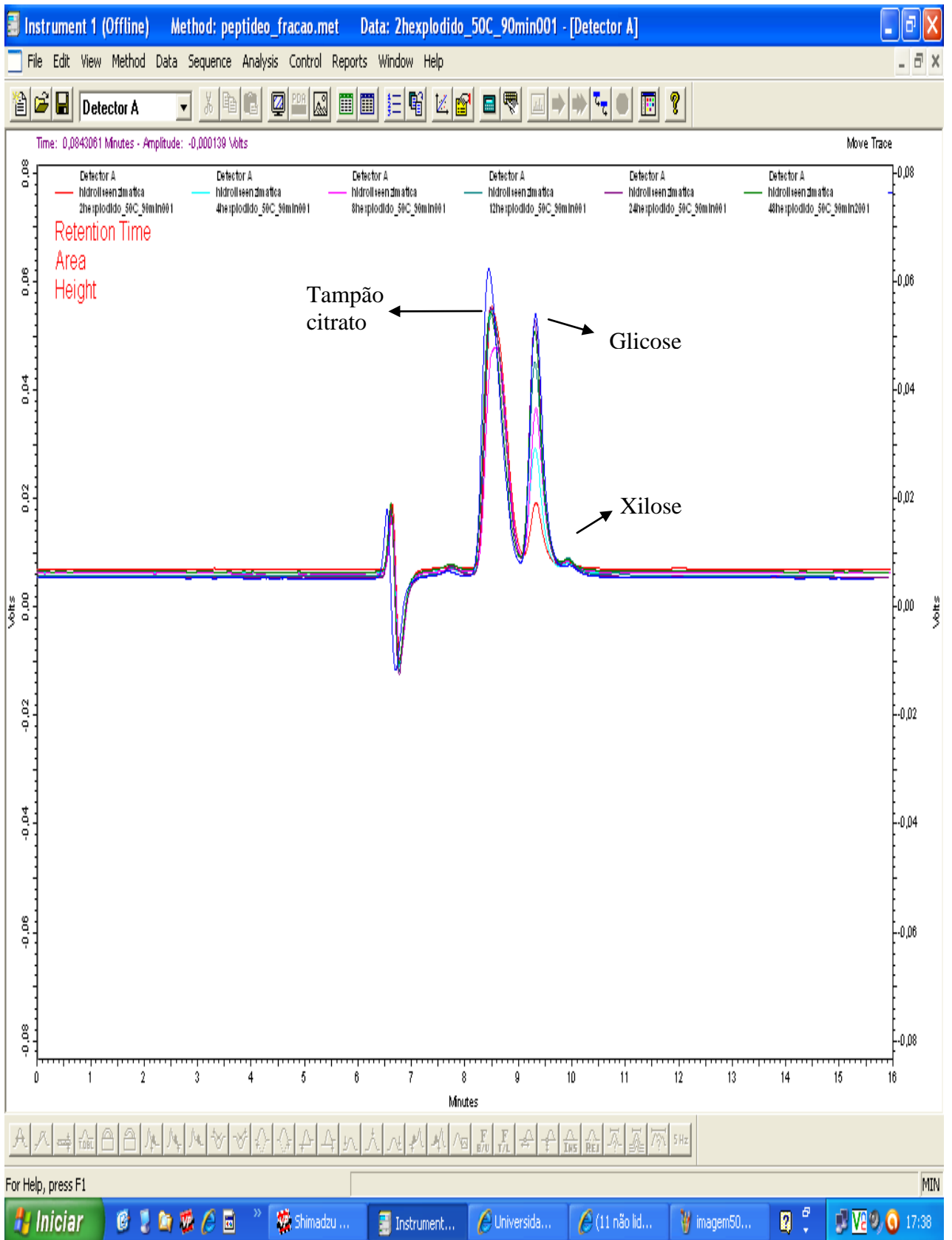
APÊNCIE A: Cromatogramas das análises dos hidrolisados para o bagaço explodido não tratado com NH_4OH e pré-tratados a 50°C .



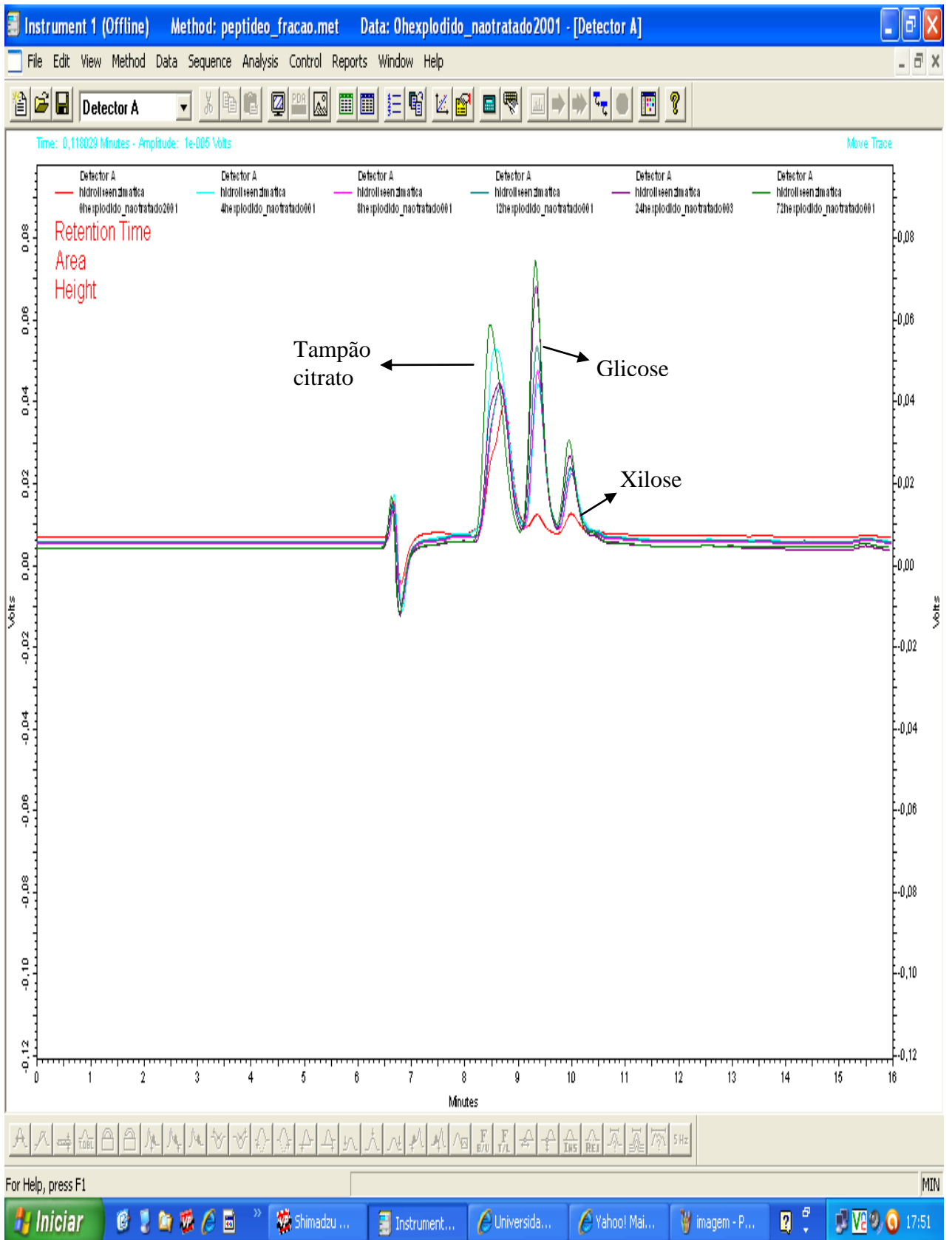
Cromatograma do bagaço explodido tratado por 30 minutos. Hidrólise enzimática realizada com 1% de carga de sólidos.



Cromatograma do bagaço explodido tratado por 60 minutos. Hidrólise enzimática realizada com 1% de carga de sólidos.



Cromatograma do bagaço explodido tratado por 90 minutos. Hidrólise enzimática realizada com 1% de carga de sólidos.



Cromatograma do bagaço explodido (cominuído a 20 mesh). Hidrólise enzimática realizada com 1% de carga de sólidos.