

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – CAMPUS POÇOS DE CALDAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

VAGNER MARCELO GOMES

**OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR COM
ÁCIDO SULFÚRICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Poços de Caldas / MG

2018

VAGNER MARCELO GOMES

**OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR COM
ÁCIDO SULFÚRICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito final para obtenção de título de Mestre em Engenharia Química. Orientadora: Prof.^a. Dra. Melina Savioli Lopes.
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Adelino Sousa.

Poços de Caldas / MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

G633o Gomes, Vagner Marcelo.

Otimização do pré-tratamento da palha da cana-de-açúcar com ácido sulfúrico e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis / Vagner Marcelo Gomes. -- Poços de Caldas/MG, 2018.

74 f. –

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2018.

Bibliografia.

1. Engenharia química. 2. Etanol. 3. Cana-de-açúcar. 4. Ácido sulfúrico. 5. Hidrólise. I. Lopes, Melina Savioli. II. Título.

CDD – 660.2

VAGNER MARCELO GOMES

**OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR COM
ÁCIDO SULFÚRICO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES FERMENTESCÍVIES**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovado em: 07 de fevereiro de 2018.



Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof^a. Dr^a. Daniela Battaglia Hirata

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof^a. Dr^a. Laura Plazas Tovar

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Dedico este trabalho a Deus, minha família e amigos pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma etapa concluída em minha vida.

A minha orientadora Prof.^a. Dra. Melina Savioli Lopes e ao meu co-orientador Prof. Dr. Rogério Adelino Sousa, pela orientação, parceria e apoio.

A doutoranda Emília Savioli Lopes e as professoras Dra. Daniela B. Hirata e Dra. Laura Plazas Tovar, pelo auxílio imprescindível em diversas etapas deste trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

O presente trabalho propõe a otimização do pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar, para uma posterior produção de etanol de segunda geração. Para tal, o pré-tratamento do material lignocelulósico foi realizado com uma relação sólido líquido de 0,5:10 em solução diluída de ácido sulfúrico. No planejamento experimental proposto - um delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² onde foram incluídos quatro testes nas condições axiais e três repetições no ponto central, os fatores avaliados na otimização foram: a concentração da solução de ácido sulfúrico (0,10 - 2,90 % m/v) e o tempo de pré-tratamento realizado em autoclave vertical a 120 °C e 1 Kgf/cm² por 14-55 minutos. As variáveis respostas definidas para a otimização foram: a massa de glicose liberada em função da massa de palha de cana-de-açúcar inicial do pré-tratamento, e a concentração de sólidos solúveis liberados medidos em graus Brix (°B). Os resultados mostraram que a condição otimizada para a liberação de glicose e também sólidos solúveis, foi a condição de ácido sulfúrico a 2,0 % m/v de concentração com o tempo de 40 minutos em autoclave, onde foi obtida uma concentração de 0,194 g glicose/g de palha de cana-de-açúcar e 3,2 °B. As análises estatísticas realizadas demonstraram que a concentração de ácido sulfúrico (linear e quadrático) e tempo de autoclave (linear e quadrático) foram estatisticamente significativos (pela análise do p-valor) em um intervalo de confiança de 95 % para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar; enquanto que para a variável concentração de sólidos solúveis, apenas a concentração de ácido sulfúrico (linear e quadrático) foram estatisticamente significativos. Além disso, a análise da ANOVA (análise de variância) demonstrou que o modelo previsto é estatisticamente significativo com R² de 96,77 % para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar, e 92,59 % para a variável concentração de sólidos solúveis. Observou-se também que o F calculado para as duas variáveis respostas são maiores que o F tabelado, confirmando em ambos os casos a significância dos modelos matemáticos propostos. Na hidrólise enzimática realizada com a enzima comercial Celluclast® 1,5L com carga de 15 FPU/g de biomassa, foi verificado uma digestibilidade de 68,71 % da celulose da palha da cana-de-açúcar utilizada, enquanto que 35,59 % da celulose total da biomassa foi convertida em glicose. Assim, concluiu-se que a concentração de ácido sulfúrico é o fator com maior impacto na conversão de palha de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis e também na liberação de sólidos solúveis na etapa do pré-tratamento. Na hidrólise enzimática, o rendimento global de conversão de celulose em glicose obtido foi de 35,59 % devido à baixa concentração de β-glicosidases na enzima utilizada.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração. Palha da cana-de-açúcar. Pré-tratamento ácido.

ABSTRACT

The present work proposes the optimization of acid pretreatment followed by enzymatic hydrolysis of sugarcane straw for a second generation of second generation ethanol. For this, pretreatment of the lignocellulosic material was performed with a liquid solid ratio of 0.5: 10 in dilute solution of sulfuric acid. In the proposed experimental design - a rotational composite central delineation (RCCD) 2^2 where four tests were included in the axial conditions and three repetitions in the central point, the factors evaluated in the optimization were: sulfuric acid solution concentration (0.10 - 2, 90 % m/v) and pretreatment time performed in a vertical autoclave at 120 ° C and 1 Kgf/cm² for 14-55 minutes. The response variables defined for the optimization were: the glucose mass released as a function of the initial sugar cane straw mass of the pre-treatment, and the concentration of soluble solids released measured in degrees Brix (°B). The results showed that the optimized condition for the release of glucose and also soluble solids was the condition of sulfuric acid at 2.0 % w/v concentration with time of 40 minutes in autoclave, where a concentration of 0.194 g glucose/g sugar cane straw and 3.2 °B. Statistical analysis showed that the concentration of sulfuric acid (linear and quadratic) and autoclave time (linear and quadratic) were statistically significant (by p-value analysis) in a 95 % confidence interval for the mass response variable glucose per sugarcane straw mass; while for the soluble solids concentration variable, only the concentration of sulfuric acid (linear and quadratic) was statistically significant. In addition, the ANOVA (analysis of variance) analysis showed that the predicted model is statistically significant with R² of 96.77 % for the variable mass response of glucose by sugar cane straw mass, and 92.59 % for the soluble solids concentration variable. It was also observed that the calculated F for the two response variables is larger than the table F, confirming in both cases the significance of the proposed mathematical models. In the enzymatic hydrolysis carried out with the commercial enzyme Celluclast® 1,5L with a load of 15 FPU/g of biomass, a digestibility of 68.71 % of the sugarcane straw cellulose used was verified, whereas 35.59 % of the biomass total cellulose was converted to glucose. Thus, it was concluded that the sulfuric acid concentration is the factor with the greatest impact on the conversion of sugarcane straw to fermentable sugars and also on the release of soluble solids in the pre-treatment stage. In enzymatic hydrolysis, the overall yield of cellulose to glucose obtained was 35.59 % due to the low concentration of β -glycosidases in the enzyme used.

Keywords: Second generation ethanol. Straw of sugarcane. Acid pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cana-de-açúcar.....	16
Figura 2 - Rendimento teórico da produção de etanol por hectare.....	20
Figura 3 - Estrutura da celulose.....	21
Figura 4 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.....	23
Figura 5 - Esquema do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa.....	25
Figura 6 - Formação de componentes inibitórios.....	28
Figura 7 - Estrutura tridimensional da CBHII de T. reesei.....	32
Figura 8 - Etapas envolvidas em uma otimização de processos.....	35
Figura 9 - Palha da cana-de-açúcar moída.....	49
Figura 10 - Curva para determinação de glicose.....	52
Figura 11 - Diagrama de Pareto dos fatores do planejamento experimental.....	54
Figura 12 - Superfície de contorno.....	56
Figura 13 - Diagrama de Pareto da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.....	60
Figura 14 - Superfície de contorno da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição básica da cana-de-açúcar.	17
Tabela 2 - Composição química de diferentes biomassas.	18
Tabela 3 - Diferentes tipos de pré-tratamentos.	27
Tabela 4 - Comparação das condições e desempenhos dos tipos de hidrólise.	30
Tabela 5 - Comparação entre os métodos químicos de hidrólise.	30
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental DCCR.	43
Tabela 7 - Variáveis reais do planejamento experimental.	43
Tabela 8 - Umidade residual da palha da cana-de-açúcar após secagem.	48
Tabela 9 - Caracterização química da palha da cana de açúcar.	49
Tabela 10 - Comparativo da composição da palha da cana-de-açúcar in natura.	50
Tabela 11 - Curva de glicose.	51
Tabela 12 - Sólidos solúveis.	53
Tabela 13 - Coeficientes da variável sólidos solúveis.	54
Tabela 14 - ANOVA do °B.	55
Tabela 15 - Análise de glicose no pré-tratamento ácido.	57
Tabela 16 - Variável resposta massa glicose/ g palha.	58
Tabela 17 - Coeficientes da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.	59
Tabela 18 - ANOVA da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.	61
Tabela 19 - Análise de glicose no ponto central medido em $\lambda = 540$ nm.	63
Tabela 20 - Rendimento de glicose no ponto central.	63
Tabela 21 - Influência do tempo no planejamento experimental.	64
Tabela 22 - Concentração de açúcares após 72 h de hidrólise enzimática.	65

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	Grau Célsius
1G	Etanol de primeira geração
2G	Etanol de segunda geração
5-HMF	5-hidróximetilfurfural
ART	Açúcares redutores totais
Å	Ångström
CBU	Beta-glucosidase unit
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNS	Ácido dinitrosalicílico
FPU	Filter paper unit
FXU	Fungal xilanase unit
g	grama
HMF	Hidróximetilfurfural
HPLC	High performance liquid chromatography
Kgf/cm²	Quilograma força por centímetro quadrado
L	Litro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NREL	National Renewable Energy Laboratory
°B	Grau brix
pH	Potencial de hidrogênio

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	CANA-DE-AÇÚCAR.....	15
3.2	PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR	17
3.3	CELULOSE.....	21
3.4	HEMICELULOSES	23
3.5	LIGNINA	24
3.6	OUTROS COMPONENTES.....	24
3.7	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	25
3.7.1	Pré-tratamento ácido.....	29
3.8	HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	30
3.8.1	Hidrólise enzimática.....	31
3.9	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4	MÉTODOS	36
4.1	PREPARAÇÃO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
4.2.1	Determinação de cinzas.....	37
4.2.2	Determinação dos extrativos.....	38
4.2.3	Determinação dos carboidratos estruturais, grupos acetil, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina.....	39
4.2.4	Lignina insolúvel.....	39
4.2.5	Lignina solúvel	40
4.2.6	Quantificação de carboidratos.....	41
4.3	OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR....	42
4.4	PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO.....	44
4.5	CURVA PADRÃO DE GLICOSE.....	44
4.6	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	46
4.6.1	Análise de açúcares e inibidores por CLAE	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	48
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO.....	51
5.2.1	Curva para quantificação de glicose.....	51
5.2.2	Análise de sólidos solúveis.....	52
5.2.3	Glicose liberada durante o pré-tratamento.....	56

5.2.4	Validação do planejamento experimental no ponto central.....	63
5.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	65
6	CONCLUSÃO	68
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente preocupação global em relação à preservação do meio ambiente, aliada a limitação da oferta dos tradicionais combustíveis fósseis e do preço do petróleo, os governos tiveram a necessidade de elaborar políticas que contemplassem o investimento em combustíveis renováveis e sustentáveis (TOVAR et al., 2017). Segundo Santos et al., (2012), a queima de combustíveis fósseis representa aproximadamente 82 % das emissões dos gases causadores do efeito estufa. O uso de biocombustíveis reduz a emissão de gases causadores do efeito estufa, além de ser uma alternativa economicamente viável aos combustíveis fósseis (CANILHA, 2010).

Os biocombustíveis podem ser obtidos a partir de fontes biomássicas, reduzem a emissão de carbono para a atmosfera, são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; MOSIER, 2005). As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para a produção de etanol e de outros biocombustíveis (RABELO, 2010). Atualmente, o etanol é produzido utilizando-se matérias-primas sacaríneas ou amiláceas, como a cana-de-açúcar e o milho, respectivamente. Entretanto, a comunidade científica tem se empenhado em pesquisas com o intuito de desenvolver processos e baratear custos que visam o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos de origem agrícolas, como palha e bagaço da cana-de-açúcar, palha de trigo, resíduos de milho, resíduos florestais, além do capim elefante (SANTOS et al., 2012). A palha da cana-de-açúcar é uma fonte de biomassa que apresenta um grande potencial de aplicação para a produção de etanol de segunda geração devido sua composição lignocelulósica com cerca de 40-44 % de celulose, 30-32 % de hemiceluloses, 22-25 % de lignina. Estima-se que de uma tonelada de palha de cana-de-açúcar com 40 % de celulose seja possível obter até 237 L de etanol.

No Brasil, a demanda do mercado indica uma perspectiva crescente de produção de etanol – que é utilizado como combustível automotivo em motores flexfuel; exportado para ser misturado à gasolina como forma de enfrentar o aquecimento global e tendo em vista os altos preços do petróleo; além de ser utilizado na produção do biodiesel durante a reação de transesterificação dos

óleos vegetais. O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. No processo de produção de açúcar e etanol são gerados subprodutos como a palha e o bagaço, que são matérias-primas lignocelulósicas compostas por celulose, hemiceluloses e lignina que estão localizadas na parede celular das fibras. A celulose é o material orgânico renovável mais abundante da terra e possui condições favoráveis para conversão biológica, química e fisiológica resultando em produtos de grande interesse econômico (HSU et al., 1980).

O etanol obtido pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), é o único combustível com capacidade de atender à crescente demanda mundial por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente (SANTOS et al., 2012). O etanol de segunda geração (2G) é obtido pelo aproveitamento de resíduos como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar, é uma alternativa para ampliar a produção do álcool no Brasil, sem a necessidade de investimento no aumento da área de plantio. A palha e o bagaço da cana-de-açúcar podem ser utilizados para a geração de calor e *eletricidade* conforme a necessidade energética do processo de produção de etanol de primeira geração (BALAT et al., 2008).

Os materiais lignocelulósicos podem ser utilizados para produzir o bio-etanol, pois são fontes de açúcares fermentescíveis com grande disponibilidade e baixo custo (MARTÍN et al., 2007; MUSSATO et al., 2010). A composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém 35 – 50 % do polímero de celulose, seguido de 20-35 % do polímero de hemiceluloses, que são recobertos por 10-25 % da macromolécula de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Tais componentes constituem a microfibrila celulósica, que devido à falta de água na sua estrutura, apresenta grande recalcitrância que dificulta a conversão dos polímeros mencionados em açúcares menores e fermentescíveis, para uma posterior produção de etanol (SANTOS et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Neste contexto, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias que viabilizem a produção de etanol com a conversão dos materiais lignocelulósicos da palha da cana-de-açúcar em polissacarídeos fermentescíveis, que atualmente são desperdiçados ou utilizados de forma menos nobre.

2 OBJETIVO

Estudar uma forma alternativa para o aproveitamento da palha da cana-de-açúcar gerada na produção de etanol de primeira geração.

Para isso, seguiu-se as seguintes etapas:

- a) Caracterização da matéria-prima utilizada quanto a sua umidade residual após secagem, comprimento e largura médios, teores iniciais de lignina, celulose, hemiceluloses, cinzas e extrativos.
- b) Estudo das condições de pré-tratamento ácido através do planejamento experimental.
- c) Estudo da hidrólise enzimática do material pré-tratado na condição ótima determinada pelo planejamento experimental da etapa anterior.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe uma tendência mundial para o desenvolvimento científico e tecnológico de combustíveis “ambientalmente corretos”, entre eles destacam-se àqueles advindos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

A partir do século XIX a necessidade de novas fontes de energia renováveis, fez com que a hidrólise da biomassa surgisse como opção de matéria-prima para fermentação, resultando na obtenção do etanol celulósico (RABELO, 2007). Há grande interesse de vários países (Brasil, Estados Unidos, Canadá e outros) no desenvolvimento de tecnologia de produção de etanol a partir do aproveitamento da palha e do bagaço de cana-de-açúcar, sendo possível a elevação da produção em até 30 %, para uma mesma área plantada de cana-de-açúcar (DA SILVA et al., 1997). Neste contexto, a palha da cana-de-açúcar se destaca por apresentar diversas características que revelam o seu grande potencial frente aos anseios mundial.

3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma gramínea, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, originou-se na Índia e foi introduzida no Brasil na época colonial e disseminou-se pela região nordeste onde os engenhos se multiplicaram. Atualmente é muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país, colocando o Brasil no topo do ranking mundial de produtores de cana-de-açúcar (BRASIL, 2017; MACHADO, 2013).

A cana-de-açúcar pode ser basicamente dividida em duas partes: subterrânea e aérea. A parte subterrânea é constituída pelas raízes e rizomas, enquanto que na sua parte aérea encontra-se o colmo, as folhas e as flores, conforme ilustrado na Figura 1 (LOPES, 2015).

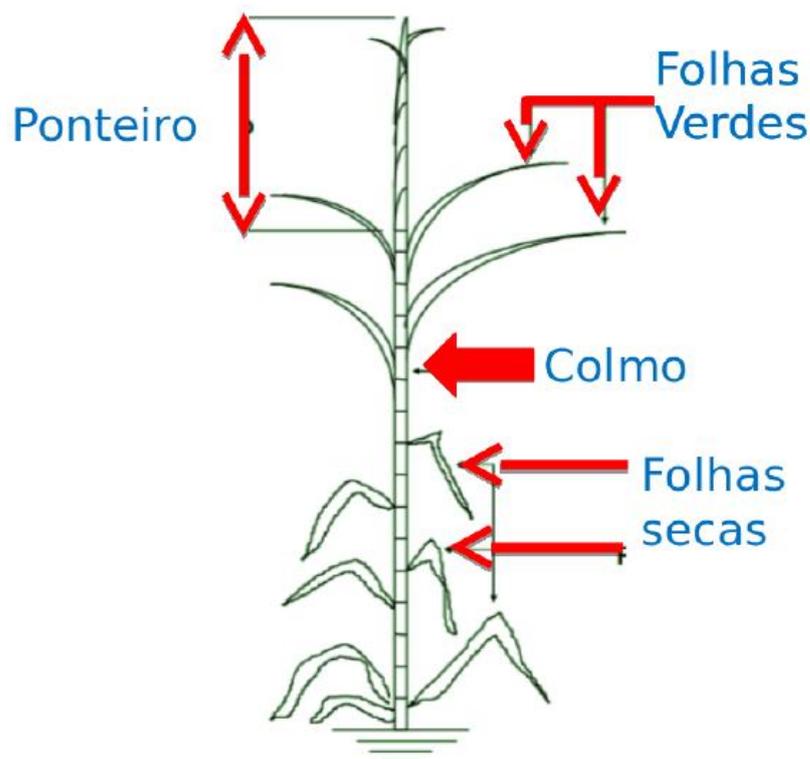


Figura 1 - Estrutura da cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de LOPES, 2015.

Segundo Dias (2011), a composição da cana-de-açúcar apresenta variações dependendo de fatores como variedade de espécie da cana, do solo, do clima, da disponibilidade de água, da época da safra, etc. Na Tabela 1 encontra-se uma composição média observada para a cana-de-açúcar. Os sólidos solúveis da cana-de-açúcar são quantificados em refratômetros – que têm como unidade de medida o grau Brix ($^{\circ}\text{B}$). O Brix é uma unidade de medida que quantifica a concentração de sólidos solúveis de uma amostra por cem gramas de solução. Os sólidos solúveis encontrados no caldo da cana-de-açúcar são, a sacarose, além de açúcares redutores como a glicose e a frutose.

Tabela 1 - Composição básica da cana-de-açúcar.

Componente	Teor (% em massa)
<i>Sólidos totais</i>	24 a 27
<i>Sólidos solúveis</i>	10 a 16
<i>Fibras (base seca)</i>	11 a 16
<i>Água</i>	73 a 76

Fonte: COPERSUCAR, 1987.

Na parede celular das fibras se encontram a celulose e a hemiceluloses, compostos hidrolisáveis para a obtenção de açúcares redutores totais (ARTs), além da lignina. A celulose e hemiceluloses são os compostos que após serem tratados são utilizados na obtenção dos carboidratos para a fermentação (SOUSA, 2014).

Segundo informações do site do governo do Brasil, a safra de 2015/16 de produção de cana-de-açúcar cresceu 4,9 % em relação à safra anterior, onde foram produzidas 665,6 milhões de toneladas. Em 2017 a produção foi próxima a 691 milhões de toneladas, o que equivale a um aumento de 3,8 % em relação ao ano passado. Na safra de 2015/16, a área de cultivo de cana-de-açúcar ocupou cerca de 8,6 milhões de hectares; para a safra de 2017 houve um aumento de 468,2 mil hectares na área de cultivo, alcançando uma área total aproximada de 9 milhões de hectares.

3.2 PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A palha da cana-de-açúcar é uma fonte de biomassa que apresenta um grande potencial de aplicação para a produção de etanol de segunda geração, devido sua composição lignocelulósica. É possível observar na Tabela 2 que a palha da cana-de-açúcar possui uma composição média de 40-44 % de celulose, 30-32 % de hemiceluloses, 22-25 % de lignina, enquanto que o bagaço também da cana-de-açúcar apresenta cerca de 32-48 % de celulose, 19-24 % de hemiceluloses e 23-32 % de lignina. Levando-se em consideração que apenas os polímeros de celulose e hemiceluloses (holocelulose) quando hidrolisados acarretam na liberação de açúcares redutores que podem ser fermentados e transformados em etanol, observa-se que a palha da cana-de-açúcar possui

maiores percentuais desses componentes do que o bagaço. Além disso, observa-se que a palha da cana-de-açúcar apresenta os menores percentuais de lignina em sua composição - heteropolímero amorfo - que durante a hidrólise dos açúcares fermentescíveis atua como barreira física para enzimas hidrolíticas, o que interfere na quantidade de enzimas requerida em um processo, além de dificultar a sua recuperação após a hidrólise (SANTOS et al., 2012).

Tabela 2 - Composição química de diferentes biomassas.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemiceluloses	% Lignina
<i>Palha de cana</i>	40 - 44	30 - 32	22 - 25
<i>Bagaço de cana</i>	32 - 48	19 - 24	23 - 32
<i>Madeira dura</i>	43 - 47	25 - 35	16 - 24
<i>Madeira mole</i>	40 - 44	25 - 29	25 - 31
<i>Talo de milho</i>	35	25	35
<i>Espiga de milho</i>	45	35	15
<i>Algodão</i>	95	2	0,3
<i>Palha de trigo</i>	30	50	15
<i>Sisal</i>	73,1	14,2	11
<i>Palha de arroz</i>	43,3	26,4	16,3
<i>Forragem de milho</i>	38 - 40	28	7 - 21
<i>Fibra de coco</i>	36 - 43	0,15 - 0,25	41 - 45
<i>Fibra de bananeira</i>	60 - 65	6 - 8	5 - 10
<i>Palha de cevada</i>	31 - 45	27 - 38	14 - 19

Fonte: SANTOS et al., 2012.

Açúcares redutores são aqueles que possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres, capazes de serem oxidados na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (CHATUVERDI; VERMA, 2013), como por exemplo, a glicose, frutose, xilose, arabinose, etc. Geralmente, monossacarídeos são açúcares redutores.

A agroindústria canavieira vem se desenvolvendo crescentemente nos últimos anos no que diz respeito em produção de etanol. Neste contexto, uma recuperação parcial ou total da palha da cana-de-açúcar propiciado por uma otimização no processo de colheita, garantiria um aumento significativo na quantidade de biomassa disponível para ser convertida em etanol, sem a necessidade de ampliação da área de cultivo (SANTOS et al., 2012). O aproveitamento da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G,

garante uma destinação adequada para esses resíduos agroindustriais, pois, com a lei nº 11.241/2002 do estado de São Paulo, foram proibidas as queimadas durante a colheita da cana-de-açúcar, visto que para a produção de etanol de primeira geração, apenas os colmos são necessários. As queimadas acarretam diversos problemas ambientais e na saúde da população. A fumaça carrega partículas sólidas carbonizadas além de gases nocivos como óxidos nítricos (NOx), hidrocarbonetos, monóxido de carbono, entre outros, que causam irritação nos olhos, ataques de asma, falta de ar, tosse e dores de cabeça. Além disso, causa danos à fauna e a flora, potencializa a erosão do solo e causa um desequilíbrio ecológico de insetos, aves, répteis e plantas (RIBEIRO; FICARELLI, 2010).

Santos et al. (2012) demonstra o rendimento teórico máximo em produção de etanol para cada hectare de cana-de-açúcar produzido no Brasil, com o aproveitamento de resíduos da palha e do bagaço (Figura 2). Como a produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare, sendo que para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca, ou seja, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço. Considerando que toda glicose vai ser convertida em etanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (colmo, palha e bagaço) poderá aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, passando dos atuais 7.000 L para aproximadamente 14.000 L, sem a necessidade de expansão da área cultivada.

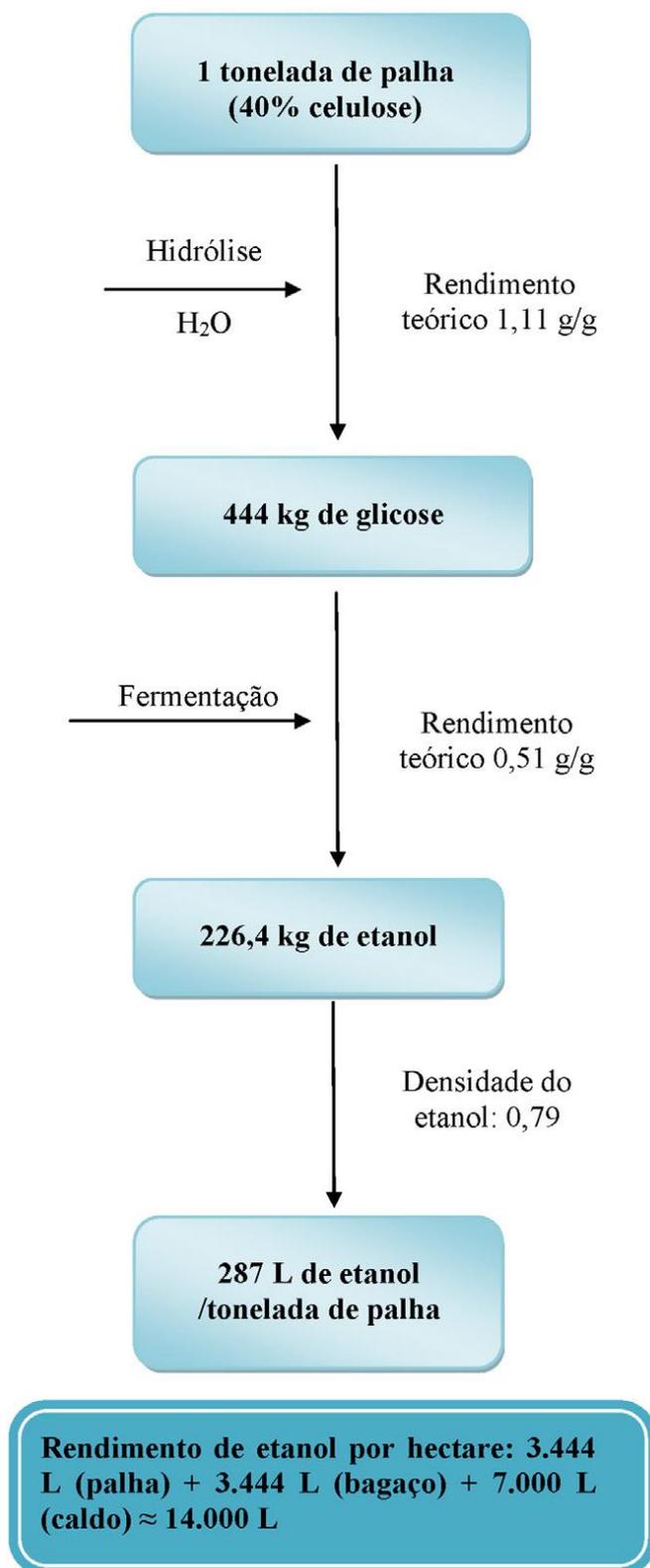


Figura 2 - Rendimento teórico da produção de etanol por hectare.

Fonte: SANTOS et al., 2012.

3.3 CELULOSE

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos e é o polissacarídeo em maior abundância na natureza. Foi descoberta e isolada de plantas verdes por Alselme Payen em 1838 na França. Compõe de um terço até a metade dos tecidos vegetais das plantas, com renovação feita através da fotossíntese. Isoladamente, a celulose corresponde a cerca de 40 % de toda a reserva de carbono disponível na biosfera (NAKASU, 2015; RABELO, 2007). Quimicamente, a celulose é monopolímero linear de alto peso molecular e de cadeia longa, e apresenta como principal constituinte o monômero $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o principal constituinte. A molécula da celulose é composta por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas, cuja unidade repetitiva é a celobiose (dímeros de glicose). A Figura 3 apresenta a estrutura da celulose (RABELO, 2010).

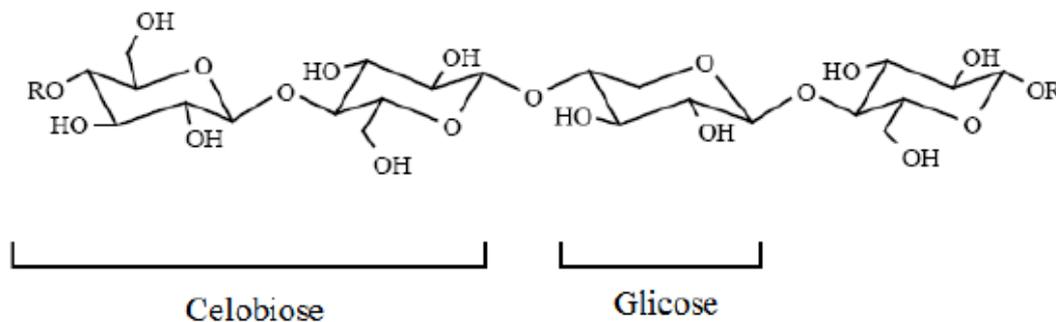


Figura 3 - Estrutura da celulose.

Fonte: RABELO, 2010.

Na celulose, as cadeias de glicose são unidas por forças de London e ligações de hidrogênio na estrutura cristalina chamada de fibrila elementar, que consiste de aproximadamente 40 cadeias de glicana. A junção destas fibrilas elementares, que essencialmente apresentam comprimento muito longo e uma largura de aproximadamente 250 Å, dá a formação das microfibrilas (NAKASU, 2015). As ligações intermoleculares entre as unidades de glicose na molécula da celulose, fazem com que a mesma apresente resistência à tração e grande rigidez. As longas cadeias de celobiose formam as microfibrilas do vegetal com

diâmetros variando entre 4-10 nm (MACHADO, 2013). Esse polímero apresenta interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio, devido à presença de hidroxilas na estrutura, desta forma as cadeias unem-se em formato de feixes com regiões nitidamente cristalinas e regiões amorfas. Estas interações conferem resistência a digestibilidade da parede do vegetal.

As regiões dentro das microfibrilas que apresentam uma ordem elevada são denominadas regiões cristalinas e, as menos organizadas, amorfas. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosas de origens diferentes. Áreas de celulose amorfa provavelmente apresentam algum grau de ordenação. Portanto, não podem ser consideradas verdadeiramente amorfas, uma vez que, por definição, um material amorfo é aquele que não apresenta forma ou tem ausência de forma definitiva.

A estrutura da celulose pode ser classificada em três níveis organizacionais:

1 Definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$.

2 Descrito pela conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas e, é caracterizado pelas distâncias das ligações com seus respectivos ângulos e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares.

3 Definido pela associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e em um grande número de outros solventes (SANTOS et al., 2012).

Quando se adiciona água ou certos solventes orgânicos às fibras de celulose, elas sofrem intumescimento, que pode ser intercrystalino ou intracrystalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões desordenadas (amorfas) da microfibrila de celulose e nos espaços entre elas; como exemplo pode-se citar o inchamento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões ordenadas (cristalinas) das microfibrilas; tal intumescimento pode ser efetuado por soluções concentradas de ácidos e bases fortes, além de alguns sais (RABELO, 2007).

3.4 HEMICELULOSES

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos, compostos por unidades de açúcares que podem ser subdivididos em grupos, como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (RABELO, 2010). Entre tais compostos, pode-se citar a D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico, que estão representados na Figura 4.

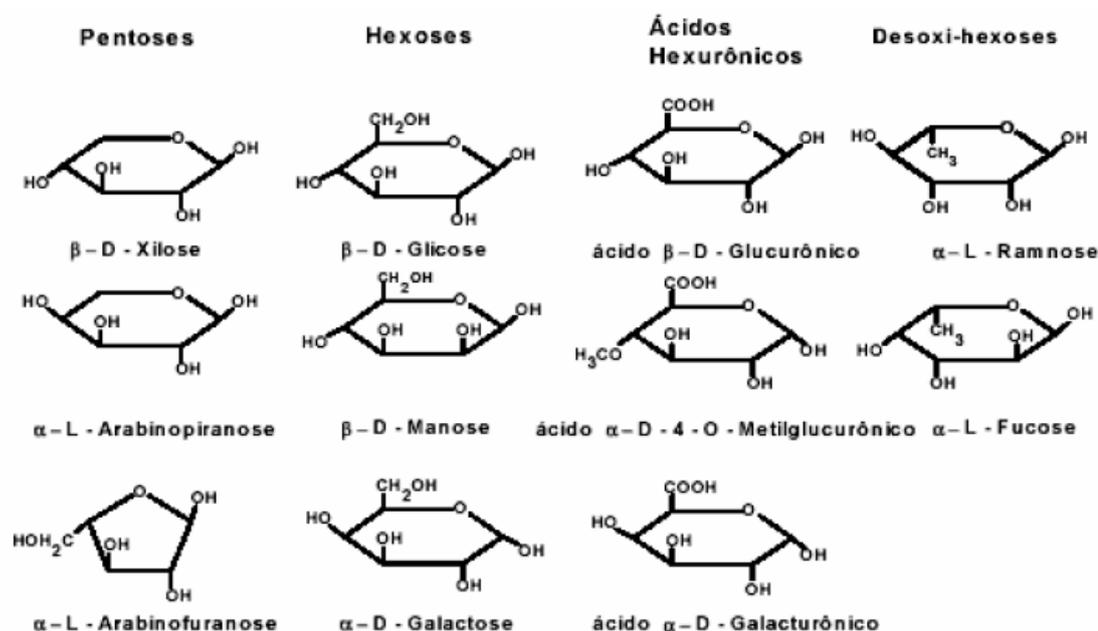


Figura 4 - Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.

Fonte: RABELO, 2007.

Entre os diversos polissacarídeos que compõem as hemiceluloses, a principal é a xilana – que é formada por xiloses. A xilana é um heteropolissacarídeo composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que é encontrada (RABELO, 2010). As xilanas apresentam grau de polimerização que variam de 100 a 200 unidades de repetição, com massa molecular menor que a da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). As

hemiceluloses são estruturalmente mais semelhante à celulose do que com a lignina (SANTOS et al., 2012).

O teor de hemiceluloses em diferentes tipos de vegetais sofre bastante variação. Na palha da cana-de-açúcar encontra-se uma proporção entre 30 – 32 % de hemiceluloses, enquanto que no bagaço da mesma biomassa de 19 – 24 %, conforme foi apresentado anteriormente na Tabela 2.

3.5 LIGNINA

A lignina é o segundo polímero mais abundante na terra entre os materiais lignocelulósicos. É composta por unidades de fenilpropanos como os alcoóis: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que formam a macromolécula tridimensional e amorfa que atribui grande resistência ao impacto, compressão e dobrada biomassa vegetal. A lignina atua como barreira protetora aos ataques microbiológicos e mecânicos e confere rigidez para a sustentação, impermeabilidade e também está ligada ao transporte interno de água da planta (RABELO, 2007).

A lignina é incorporada a planta durante o seu crescimento, o acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva devido aos mecanismos da biossíntese da lignina. A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não é conhecida completamente e sua composição varia entre as diferentes espécies de plantas. Portanto, devido a sua composição, a lignina representa uma barreira física que dificulta o acesso das enzimas à celulose e a hemiceluloses (MACHADO, 2013).

3.6 OUTROS COMPONENTES

Na composição de biomassas lignocelulósicas também são encontradas substâncias inorgânicas, que são as cinzas, além de algumas outras substâncias orgânicas passíveis de serem extraídas por solventes neutros (extrativos). Os extrativos incluem compostos como os terpenos, óleos, ácidos graxos, alcoóis,

resinas ácidas, taninos, entre outros. Os extrativos representam de 4 – 10 % do peso seco da biomassa. Após a incineração da biomassa em altas temperaturas, é possível encontrar nas cinzas carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos após a incineração da biomassa em altas temperaturas. As cinzas compõem cerca de 2 % do peso seco da biomassa. A proporção de tais componentes estruturais em resíduos agrícolas depende do tipo de biomassa, da sua idade, condições de crescimento, entre outros (RABELO, 2010).

3.7 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Para viabilizar a obtenção de etanol 2G a partir de biomassa, se faz necessário a transformação de polímeros fermentescíveis em seus monômeros, que podem ser convertidos em etanol pela ação de micro-organismos específicos. Todavia, a celulose e as hemiceluloses nativas encontram-se muito protegidas na matriz recalcitrante do vegetal, tornando tais estruturas pouco expostas para a ação de enzimas hidrolíticas ou agentes químicos. Deste modo, um pré-tratamento é imprescindível para expor as fibras de celulose e hemiceluloses, facilitando o acesso dos agentes hidrolíticos, sejam eles enzimáticos ou ácidos, conforme esquematizado na Figura 5 (RABELO, 2010; OVEREND; CHORNET, 1987).

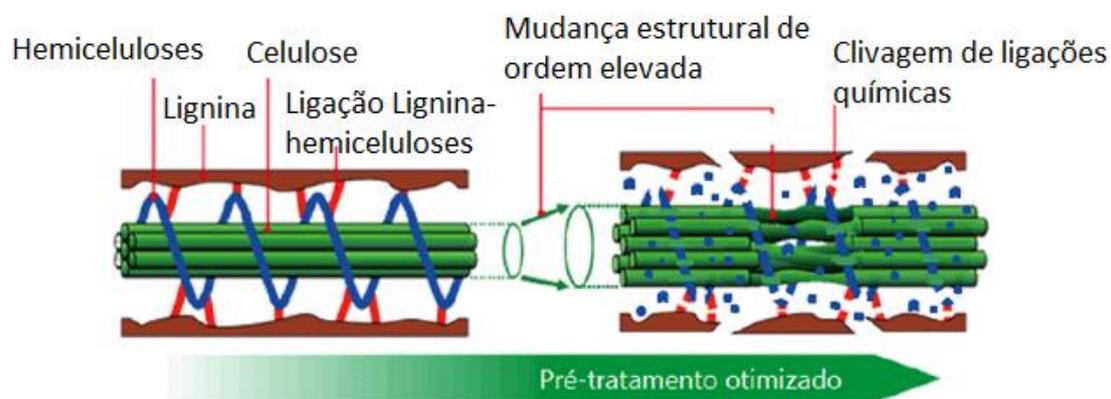


Figura 5 - Esquema do efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa.

Fonte: NAKASU, 2015.

Além de ser considerado crucial em um processo de conversão biológica do etanol, o pré-tratamento é a segunda etapa mais cara na conversão lignocelulósica quando seguido da hidrólise enzimática, sendo necessário adotar tecnologias adequadas de pré-tratamentos, visto que diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes propriedades físico-químicas. Vários métodos de pré-tratamentos vêm sendo estudados, não existe um método universal devido à complexidade do processo e a variedade de materiais lignocelulósicos (MACHADO, 2013). Balat et al. (2008) elenca as principais características que um pré-tratamento adequado deve possuir, entre elas: eficiência em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade, simplicidade operacional, segurança, higiene industrial, atributos ambientais, menor necessidade de consumo de insumos químicos, energia e utilidades.

O pré-tratamento pode ser classificado em físico, químico ou biológico, entretanto, também pode ser combinado com outros métodos, sejam eles de uma mesma categoria, ou de categorias diferentes. Na Tabela 3 está representado um comparativo entre os diversos tipos de pré-tratamentos existentes, bem como suas peculiaridades, vantagens e desvantagens.

Tabela 3 - Diferentes tipos de pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Características composicionais				Geração de compostos tóxicos	Vantagens	Desvantagens
	Celulose	Hemicelulose	Lignina				
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Não há	Redução da cristalinidade	Alto consumo de energia
	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção com mudança de estrutura	Alta formação	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	Hidrotérmico	Diminuição do grau de cristalinidade e aumento do tamanho dos poros da celulose	Alta solubilização	Pouca remoção, com moderada transformação na estrutura	Baixa formação	Não requer catalisadores e reatores são de baixo custo	Altos consumos de água e energia
Químico	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção com mudança de estrutura	Baixa formação	Condições médias, altas produções de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, > 50%	Baixa formação	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	Organosolve	Considerável inchaço	Solubilização significativa, quase completa	Solubilização significativa, pode ser completa	Média/baixa formação	Altas produções de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente, técnica relativamente cara
	Explosão de vapor de amônia	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Baixa formação	Menores perdas de xilanas	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilidade	~40% de deslignificação	Sem formação a baixa formação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

Fonte: MACHADO, 2013.

Neste trabalho, optou-se em trabalhar com um pré-tratamento químico com ácido sulfúrico diluído devido sua baixa capacidade de despolimerização da celulose na fração líquida do pré-tratamento. Além disso, há grande recuperação da fração sólida do pré-tratamento para a etapa seguinte: a hidrólise enzimática.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído também tem grande capacidade de remoção das hemiceluloses na fração líquida (licor), além de diminuir a formação de compostos tóxicos inibidores devido à decomposição de açúcares redutores.

Durante a etapa do pré-tratamento, pode haver a formação de compostos indesejados que apresentam propriedades inibitórias durante a fermentação e conversão biológica do etanol, por serem tóxicos ou causarem o envenenamento com posterior morte dos micro-organismos fermentadores. Tais compostos são originados pelo pré-tratamento excessivo dos materiais lignocelulósicos, ou em métodos que há combinação de condições drásticas, como altas concentrações de ácidos e temperaturas elevadas, nestes casos os açúcares fermentescíveis e até mesmo a lignina são degradados nestes ácidos orgânicos inibitórios. A Figura 6 ilustra a procedência de cada agente inibidor de diferentes constituintes de biomassa (RABELO, 2010).

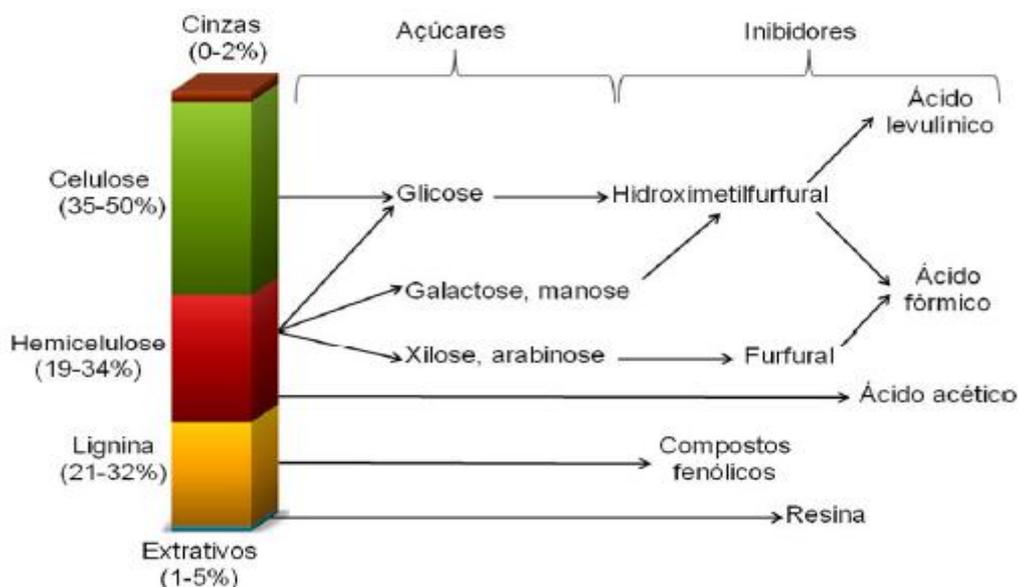


Figura 6 - Formação de componentes inibitórios.

Fonte: RABELO, 2010.

3.7.1 Pré-tratamento ácido

Entre os processos de pré-tratamento, o uso de ácidos diluídos como o sulfúrico, clorídrico, acético e o fosfórico, constituem os pré-tratamentos mais estudados atualmente. Neste tipo de processo, as hemiceluloses são solubilizadas, separando-se da biomassa em uma fração líquida contendo predominantemente pentoses e uma fração sólida composta majoritariamente por celulose e lignina. Dependendo das condições operacionais, a fração líquida será constituída de açúcares redutores como a xilose, glicose e arabinose, além de produtos da decomposição das hemiceluloses como os oligômeros dos polímeros e ácido acético gerados pela hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares, e/ou produtos da decomposição de monossacarídeos como o furfural, produto da desidratação de pentoses; e 5-hidroximetilfurfural (HMF), produto da desidratação de hexoses (SANTOS et al., 2012; SCHELL et al., 2003).

Entre as condições operacionais que afetam o pré-tratamento ácido estão concentração do ácido, o tempo e a temperatura. A variação nessas condições afeta a severidade do pré-tratamento e a composição da biomassa de modo diferente durante o processo. Além disso, a razão sólido/líquido também exerce influência no processo, tendo relação com a concentração de xilose e ácido acético na fração líquida.

Segundo Rabelo (2007), com a hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído tem sido amplamente utilizado no processamento de gramíneas com relativo sucesso. Para outros tipos de biomassa, como coníferas, esse pré-tratamento não tem se mostrado eficiente (SIQUEIRA, 2015). Deste modo, como a palha da cana-de-açúcar é oriunda de uma gramínea, optou-se em trabalhar com ácido sulfúrico diluído nesse trabalho.

3.8 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Na etapa da hidrólise, os polímeros de celulose e hemiceluloses serão quebrados em suas formas monoméricas. Tal quebra pode ser realizada por via enzimática ou química – através de ácidos diluídos ou concentrados. Na Tabela 4 estão demonstradas as características de cada tipo de hidrólise, onde observa-se que com a hidrólise enzimática é possível conseguir maiores rendimentos de glicose em faixas de tempo e temperatura intermediários, enquanto que na Tabela 5 elenca-se as vantagens e desvantagens das hidrólises químicas.

Observa-se também na Tabela 4 que a temperatura de 215 °C indicada para um maior rendimento de glicose, possivelmente acarreta a degradação de açúcares e favorece a formação de compostos inibidores. Diante do disposto, neste trabalho optou-se em utilizar a hidrólise enzimática.

Tabela 4 - Comparação das condições e desempenhos dos tipos de hidrólise.

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	<1 % H ₂ SO ₄	215	3 min	50 – 70 %
Ácido concentrado	30 – 70 % H ₂ SO ₄	40	2 – 6 h	90 %
Enzimática	Celulase	70	1,5 dias	75 – 95 %

Fonte: HAMELINCK et al., 2005.

Tabela 5 - Comparação entre os métodos químicos de hidrólise.

Método de hidrólise	Vantagens	Desvantagens
Ácido concentrado	Operação a baixas temperaturas. Altos rendimentos de açúcares.	Alto consumo de reagente. Corrosão de equipamentos. Alto consumo energético para recuperação do ácido. Tempos reacionais longos.
Ácido diluído	Baixo consumo de reagente. Tempos reacionais curtos.	Operação em altas temperaturas. Baixos rendimentos de açúcares. Corrosão de equipamentos. Formação de subprodutos indesejados.

Fonte: NAKASU, 2015.

3.8.1 Hidrólise enzimática

A etapa de hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses visa a obtenção de açúcares passíveis de fermentação. A eficiência deste processo é influenciada por fatores inerentes aos substratos como grau de lignificação, associação entre lignina e hemiceluloses, cristalinidade e grau de polimerização da celulose e área superficial (VANELLI, 2014). Além disso, temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido dependem do substrato escolhido e da enzima utilizada, e devem ser otimizados experimentalmente para cada caso (RABELO, 2010).

A hidrólise enzimática da celulose é feita por celulasas, cujo produto geralmente são açúcares redutores incluindo a glicose. O custo de uma hidrólise enzimática é menor que uma hidrólise ácida, pois é conduzida em condições de temperatura e pH suaves, não apresenta problemas de corrosão de tanques e equipamentos como na hidrólise ácida e por ser seletiva e específica, evita a degradação da glicose (RABELO, 2007; WYMAN; BRETHAUER, 2009).

Segundo Lee et al. (1980), a obtenção via enzimática de glicose a partir da celulose é dada em três etapas. Na primeira etapa a celulose nativa é convertida em celulose ativa a partir de endoglicanases. Na segunda etapa a celulose ativa é convertida em celobiose pela ação de exoglicanases. Por fim, na terceira etapa a celobiose é convertida a glicose pela ação da β -glicosidase.

Endoglicanases são enzimas que atuam no meio das cadeias de celulose, exoglicanases nas extremidades e β -glicosidase nas ligações 1,4 glicosídicas. Para haver a hidrólise completa da celulose, é necessário a ação sinérgica de endoglucanases, exoglucanases (incluindo cellodextrinases e celobiohidrolases) e B-glucosidases.

As endoglicanases atuam na celulose não cristalina ou em suas regiões amorfas gerando celobiose e celo-oligossacarídeos como produtos da hidrólise. As celobiohidrolases atuam nas regiões cristalinas da celulose e produzem celobiose como produto principal da hidrólise. Por sua vez, as β -glucosidases convertem celobiose e alguns celo-oligossacarídeos em glicose (PUTRINO, 2016).

A diferença entre o mecanismo de ação das exoglicanases (celobiohidrolases) e das endoglucanases está relacionada a estrutura tridimensional dessas enzimas. O sítio ativo das celobiohidrolases apresentam o formato de túnel (Figura 7 a), e conseqüentemente, apenas os terminais da celulose podem alcançar os aminoácidos responsáveis pela catálise. Já o formato de fenda do sítio ativo das endoglucanases (Figura 7 b), permite que a catálise ocorra em qualquer uma das ligações glicosídicas da molécula da celulose, desde que não haja impedimento estérico para a ação destas. Já as β -glicosidases ou celobiasas, apesar de não serem consideradas celulases verdadeiras por não atuarem diretamente na molécula da celulose, são indispensáveis para o processo de conversão enzimática da celulose em glicose, pois hidrolisam moléculas de celobiose e celodextrinas liberadas pelas celobiohidrolases. Além disso, seu efeito sinérgico no sistema celulítico está associado à diminuição da forte inibição das celulases, especialmente celobiohidrolases, causada pelo acúmulo de celobiose (SIQUEIRA, 2015).

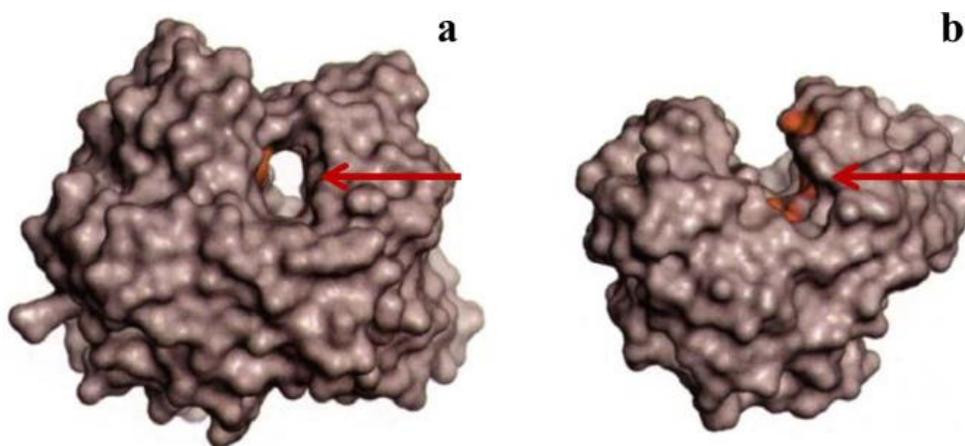


Figura 7 - Estrutura tridimensional da CBHIII de *T. reesei*:

(a), e fenda da endoglucanase II de *T. fusca*.

(b). As setas vermelhas indicam os sítios ativos da enzima.

Fonte: SIQUEIRA, 2015.

As hemiceluloses são degradadas em monossacarídeos e ácido acético. Para a obtenção da xilose – principal carboidrato das hemiceluloses, é necessário a ação de diversas enzimas hidrolíticas como a xilanase e enzimas

auxiliares como esterases (xilanaesterease, ferúlico e cumáricoesterase, α -arabinofuranosidase e α -4-metil glucuromidasas, entre outras). A hidrólise das hemiceluloses ocorre pela ação combinada de endoenzimas que quebram internamente sua cadeia principal, exoenzimas que liberam açúcares monoméricos e enzimas auxiliares que clivam as cadeias laterais dos polímeros ou oligossacarídeos condizendo a liberação de vários mono e dissacarídeos, dependendo do tipo de hemiceluloses. Como exemplo, a quebra da xilana envolve, pelo menos, a endo-1,4- β -D-xilanase e β -xilosidase atuando sobre a cadeia principal do açúcar e, dependendo do tipo de xilana, a cadeia lateral de clivagem de enzimas, tais como α -glucuronidase e acetilxilanaesterease (PUTRINO, 2016).

3.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Segundo Rodrigues e Iemma, 2009, o planejamento experimental é uma ferramenta muito poderosa, baseada em fundamentos estatísticos, capaz de indicar as condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas e também avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas. Os fatores são variáveis independentes a serem estudados ou avaliados em um processo, podendo ser controladas. As respostas são variáveis dependentes e podem ser determinadas experimentalmente.

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo com o propósito de minimizar o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX et al., 1978 apud RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Em geral, a estatística é usada quando a quantidade de informações é numerosa, porém a atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos e quando isso é feito de forma apropriada, muitas conclusões podem ser extraídas (BARROS NETO et al., 1996). Com o planejamento experimental há

uma redução significativa no número de ensaios necessários devido à análise multivariável que permite verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre as variáveis estudadas. Além disso, é possível otimizar mais de uma variável ao mesmo tempo.

Para a otimização de um processo, Rodrigues e Lemma (2009) sugerem a sequência de passos demonstrados no fluxograma representado na Figura 8, onde se inicia a análise do processo definindo os fatores (variáveis de entrada) e as respostas (variáveis de saída), posteriormente define-se o tipo de planejamento experimental mais adequado para o processo observando-se a quantidade de fatores e respostas do processo. As análises estatísticas devem ser realizadas fazendo-se uso do bom senso, através da qual será determinada a modelagem matemática bem como as superfícies de respostas. Após a otimização é necessário a realização da validação experimental dos resultados nas condições ótimas.

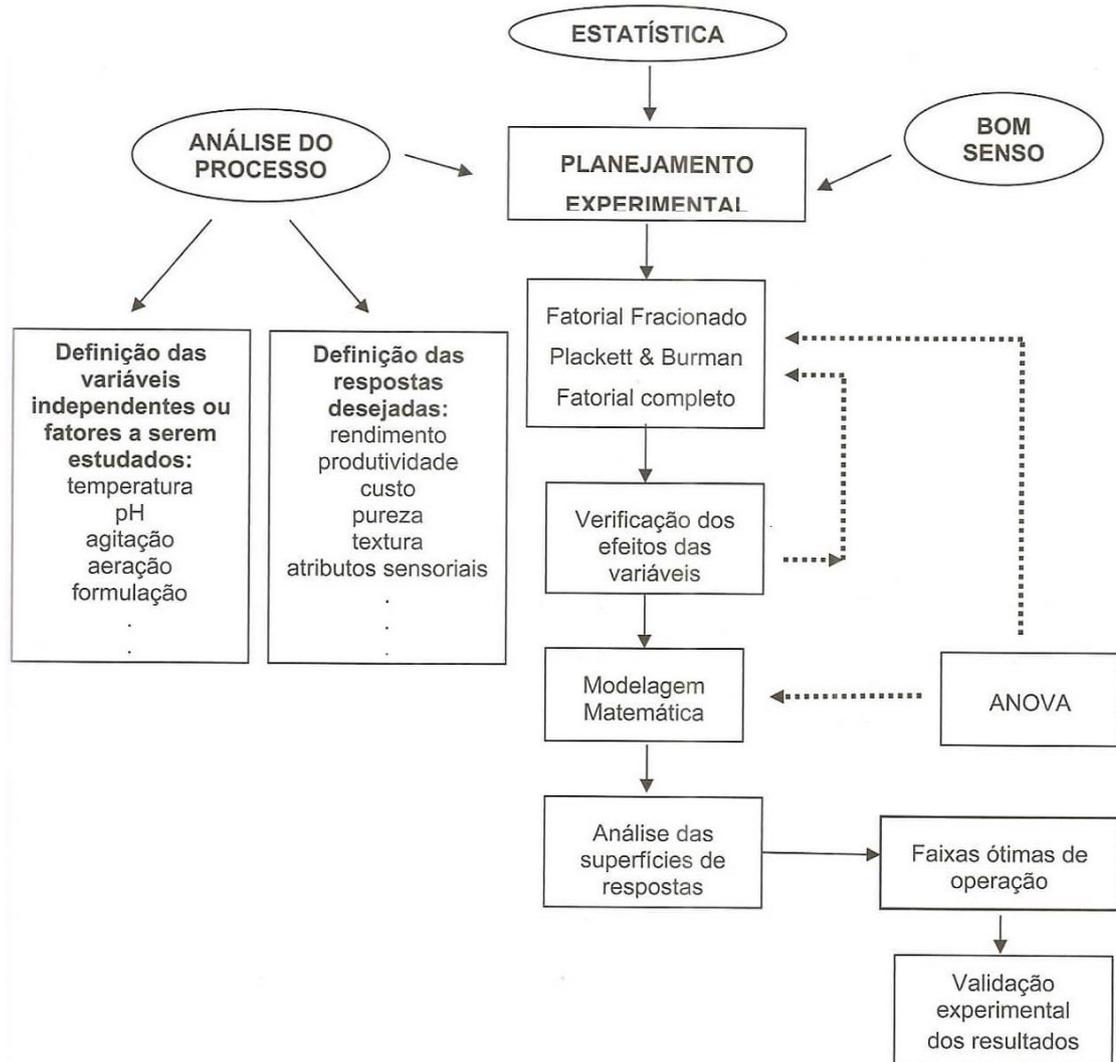


Figura 8 - Etapas envolvidas em uma otimização de processos.

Fonte: RODRIGUES; IEMMA, 2009.

O planejamento experimental mais comum é o composto central, também chamado de planejamento em estrela, no qual se calcula quais serão os novos valores ou pontos axiais determinados, representado pela Equação 1 (RABELO, 2007).

$$\alpha = (2^n)^{\frac{1}{4}} \quad (1)$$

Onde: α é a distância dos pontos axiais e n é o número de variáveis.

4 MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Coletou-se quantidade adequada de palha de cana-de-açúcar em um canavial proveniente da Usina Abegoa Bioenergia de São João da Boa Vista – São Paulo, Brasil), a fim de garantir que todos os experimentos fossem realizados com o mesmo tipo de amostra.

Fragmentou-se a palha de cana-de-açúcar em um moinho de facas durante 30 minutos. Após, mediu-se o comprimento e espessura médios de algumas fibras da palha de cana-de-açúcar com o auxílio de um paquímetro.

A palha da cana-de-açúcar foi seca em estufa de recirculação com renovação de ar a 60 °C durante 24 horas, em seguida verificou-se o teor de umidade residual em estufa de secagem a 105 °C por 24 h. O cálculo da umidade foi feito utilizando-se a Equação 2.

$$Umidade \% = \left(1 - \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

M1: massa do cadinho vazio, em gramas

M2: massa do cadinho + massa da biomassa úmida, em gramas

M3: massa do cadinho + massa da biomassa seca, em gramas

Após, armazenou-se a palha da cana-de-açúcar moída e seca em sacos fechados até o momento de sua utilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

4.2.1 Determinação de cinzas

O teor de cinza foi determinado baseando-se no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (SLUITER et al., 2005a) como o objetivo de quantificar o material inorgânico na biomassa, estrutural ou extraível, como parte da composição total.

Para determinação do teor de cinzas da biomassa pesou-se cerca de $1,00 \pm 0,001$ g da biomassa em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. A análise foi realizada com a biomassa seca a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ previamente.

A amostra foi então carbonizada em forno mufla a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Após este período a mufla foi desligada e o cadinho foi resfriado em dessecador por cerca de 1 h, sendo em seguida realizado a pesagem e posterior cálculo do conteúdo de cinzas na biomassa (Equação 3).

As análises foram realizadas em triplicata. Para o cálculo do teor de cinzas, tem-se:

$$\text{Cinzas \%} = \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

M1: massa do cadinho calcinado vazio, em gramas

M2: massa do cadinho + massa da biomassa seca a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, em gramas

M3: massa do cadinho com as cinzas, em gramas

4.2.2 Determinação dos extrativos

Os extrativos foram determinados baseando-se no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (SLUITER et al., 2005b) como o objetivo de quantificar os extrativos para a caracterização química da biomassa e remover o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos para que não haja interferência nestas etapas analíticas. Para determinação dos extrativos foi determinado o teor de umidade da palha da cana-de-açúcar como descrito no item 4.2. Adicionou-se aproximadamente 4,0 g de amostra ao cartucho de extração e introduzido no tubo de extração do Soxhlet. Adicionou-se 200 mL de água destilada no balão do extrator que foram submetidos ao aquecimento. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor. Após a extração em água, as amostras foram submetidas a extração utilizando álcool etílico e submetidas ao aquecimento. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração. Ao término da extração, os sólidos foram transferidos e lavados com 100 mL de etanol, filtrados à vácuo e secos em estufa a 105 °C até massa constante, determinada em balança analítica.

Para o cálculo do teor de extrativos (Equação 4), tem-se:

$$\text{Extrativos \%} = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

M1: massa da amostra descontado o teor de umidade, em gramas

M2: massa da amostra livre de extrativos, em gramas

4.2.3 Determinação dos carboidratos estruturais, grupos acetil, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina

A caracterização da palha da cana-de-açúcar foi feita com uma hidrólise em duas etapas, primeiramente foram pesados 0,300 g de palha em base seca em tubos de ensaio, depois adicionados à esta matéria-prima 3 mL de ácido sulfúrico com concentração de 72 %. Os tubos vedados com Parafilm® foram então incubados em banho termostático a 30 °C por 1 hora e com auxílio de um bastão de vidro as amostras foram homogeneizadas em intervalos de 10 minutos. Ao término da hidrólise, todo conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para um frasco reagente de 250 mL com tampa e anel de vedação e foram adicionados 84 mL de água destilada para obter a concentração final de 4 %. Posteriormente, o sistema reacional foi fechado e levado à autoclave a 121 °C durante 1 hora. Depois desta hidrólise o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro qualitativo previamente tarado; uma alíquota do filtrado foi retirada para análises de carboidratos, inibidores e lignina solúvel (SLUITER et al., 2008c,d).

4.2.4 Lignina insolúvel

O resíduo retido no filtro foi neutralizado com lavagens sucessivas usando 1,5 L de água deionizada; após neutralizado o filtro foi seco em estufa a 105 °C e posteriormente pesado. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado pela diferença entre o peso do resíduo insolúvel que permaneceu no papel filtro e o conteúdo de cinzas da biomassa. Posteriormente, os materiais (sólidos retidos em papel de filtro) foram calcinados em forno mufla a 400 °C durante 1 hora e a 800 °C por mais 2 horas. A massa obtida após cada processo foi mensurada a partir de uma balança analítica. A fração de lignina insolúvel presente nos resíduos foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Lignina insolúvel \%} = \left(\frac{M_1 - MPF}{M_0} \times 100 \right) - \text{Cinzas II (\%)} \quad (5)$$

Onde:

M1: massa do papel de filtro mais a lignina insolúvel após a secagem em estufa, em gramas

MPF: massa do papel de filtro seco, em gramas

M₀: massa inicial da amostra, em gramas

Cinzas II: percentual de cinzas obtida na calcinação dos sólidos retidos + papel de filtro.

4.2.5 Lignina solúvel

Para se obter o teor de lignina solúvel seguiu-se a metodologia de Gouveia et al. (2009): foi recolhida uma amostra de 50 µL do hidrolisado do licor e adicionada a um balão volumétrico de 50 mL completando o volume com água deionizada; foi então feita a medida em espectrofotômetro UV-visível na absorvância de 280 nm, garantindo a Lei de Beer-Lambert. A quantidade de lignina foi calculada conforme as Equações 6 e 7.

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \times 10^{-2}(AT - ApD) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (6)$$

Onde:

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

AT: absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm

ApD: $c_1\varepsilon_1 + c_2\varepsilon_2$ – absorvância, em um comprimento de onda de 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ε_1 e ε_2 são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 Lg⁻¹cm⁻¹.

$$Lignina\ solúvel\ \% = \left(\frac{C\ lig\ x\ V\ filtrado\ x\ FD}{M\ biomassa\ para\ caracterização} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

V filtrado: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L;

FD: Fator de diluição para leitura da absorbância

M biomassa para caracterização: Massa utilizada para a caracterização (aproximadamente 0,3000 g).

4.2.6 Quantificação de carboidratos

A análise cromatográfica dos carboidratos foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu (LC-10Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min, a 30°C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 20 minutos. A detecção se deu em detector de índice de refração (Shimadzu, modeloRID-10A). Uma alíquota de 20,0 µL da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal. As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose foram determinadas por meio de curvas de calibração obtidas por padrões analíticos. A curva foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após a injeção no cromatógrafo. Com esses resultados foi possível calcular a concentração desconhecida de açúcar dado a área obtida após a injeção no cromatógrafo. Foram preparadas soluções padrões de concentração de celobiose, glicose, xilose e arabinose.

Para o cálculo das concentrações de açúcares, tem-se a Equação 8:

$$\text{Açúcares \%} = \left(\frac{C_{CLAE} \times CA \times V_{filtrado}}{M_1} \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde:

C_{CLAE} : concentração do açúcar quantificador por CLAE, em g/L

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a celobiose, glicose, xilose e arabinose, tem-se: 0,95; 0,90; 0,88 e 0,88, respectivamente

$V_{filtrado}$: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_1 : massa da biomassa utilizada na hidrólise descontando o teor de umidade, em gramas.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Utilizou-se neste trabalho o planejamento experimental do tipo *Delineamento Central Composto Rotacional* (DCCR) para duas variáveis, sendo um planejamento fatorial 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando onze experimentos. Tal planejamento foi selecionado mediante a definição de dois fatores experimentais (concentração da solução de ácido sulfúrico e tempo de pré-tratamento em autoclave), tendo como variável resposta a concentração de glicose liberados em solução e a concentração de sólidos solúveis liberados e solução (°B). O mesmo tipo de planejamento experimental foi feito por Schultz et al. (2014) com o objetivo de otimizar o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para obter açúcares fermentescíveis, onde havia como fatores a concentração de ácido sulfúrico (%) e o tempo de pré-tratamento em minutos; a variável resposta era a concentração de glicose (g/L) liberados em solução. Segundo Rodrigues e lemma (2009) um DCCR com 2 fatores, 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais é capaz de fornecer informações de boa qualidade.

A matriz de interação entre os fatores codificados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental DCCR.

Experimentos	Variáveis codificadas	
	[H ₂ SO ₄] (%)	Tempo (min)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9 (C)*	0	0
10 (C)	0	0
11 (C)	0	0

Fonte: Do autor.

C*: Pontos centrais do planejamento experimental.

Na Tabela 7 são apresentados os valores reais das variáveis utilizadas nesse trabalho. Variou-se a concentração de ácido sulfúrico de 0,10 a 2,90 % em massa com tempos de permanência em autoclave variando de 14 a 56 minutos, mantendo-se a temperatura fixa em 120 °C, a pressão em 1 Kgf/cm² e uma carga de sólidos de palha de cana-de-açúcar de 5 % em massa. Ressalta-se que os valores reais das variáveis foram definidos com base no trabalho pelo trabalho de Schultz et al. (2014), onde otimizou-se o pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.

Tabela 7 - Variáveis reais do planejamento experimental.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
[H ₂ SO ₄] (%)	0,10	0,50	1,50	2,50	2,90
Tempo (MIN)	14,00	20,00	35,00	50,00	56,00

Fonte: Do autor.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

Tomou-se 5,00 g de amostra da palha da cana-de-açúcar triturada que foi transferida para um frasco do tipo *Scott Duran* de 250 mL, no qual adicionou-se 100 mL de solução de ácido sulfúrico conforme as concentrações apresentadas na Tabela 7, de acordo com as interações do planejamento experimental (Tabela 6). Deixou-se a amostra em autoclave a 120 °C com pressão de 1,0 Kgf/cm² pelo tempo especificado no planejamento experimental (Tabela 7). Ao término do pré-tratamento, inseriu-se os frascos do tipo *Scott Duran* em banho refrigerante contendo água e gelo para cessar a reação. Filtrou-se a mistura à vácuo, lavando-se a palha com 60 mL de água destilada para a remoção dos ARTs remanescentes no sólido. Mediu-se o volume final de licor obtido em uma proveta. Com o auxílio de um refratômetro de Abbe mediu-se a concentração de sólidos solúveis, expressos em °B. Realizou-se análise de glicose no licor em triplicata a partir da curva padrão de glicose fundamenta pelo método proposto por Miller (1959).

4.5 CURVA PADRÃO DE GLICOSE

A Solução padrão de D-glicose foi preparada a partir de 0,1000 g de sólido em um béquer, em seguida dissolveu-se em aproximadamente 20,0 ml de água destilada sob agitação constante, transferiu-se o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 100,0 ml, completou-se o volume com água destilada até o menisco e homogeneizou-se.

O Reagente DNS foi preparado pela diluição de 10,6 g de ácido dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em 1416 ml de água destilada. Em seguida adicionou-se 7,6 ml de fenol fundido a 50 °C e 8,3 g de metabissulfito de sódio. Homogeneizou-se e armazenou-se a solução em frasco âmbar a aproximadamente 4 °C (MALDONADI et al., 2013).

A solução de tartarato duplo de sódio e potássio foi preparada com 15,1 g do sal, transferiu-se para um balão volumétrico de 1,00 L e avolumou-se a solução com água destilada.

A partir da solução padrão de glicose 1,0 g/L foram preparadas as seguintes diluições: 0,10 g/L, 0,20 g/L, 0,40 g/L, 0,60 g/L, 0,70 g/L, 0,80 g/L e 0,90 g/L.

- Separou-se tubos de ensaio, numerando-os de acordo com as diluições;
- Pipetou-se uma alíquota de 1,0 ml de cada padrão de glicose e transferiu-se para cada tubo previamente identificado.
- Adicionou-se com o auxílio de pipetas volumétricas 1,0 ml de reagente DNS.
- Agitaram-se os tubos e aqueceu-se em banho-maria durante 5 minutos a temperatura de 100 °C.
- Após o tempo os tubos foram resfriados num banho de água fria.
- Adicionou-se 16,0 ml da solução de tartarato duplo sódio e potássio.
- Com o auxílio de uma cubeta de plástico realizou-se as leituras de cada solução em espectrofotômetro previamente zerado com um branco, no comprimento de onda de 540 nm em absorbância.

O mesmo procedimento foi utilizado para o branco, utilizou-se 1,0 ml de água destilada como amostra em lugar da solução padrão de glicose.

As amostras hidrolisadas foram diluídas em um balão volumétrico de 50,0 ml, foi transferido 1,0 ml da amostra e completado o volume com água destilada.

Em seguida foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a construção da curva padrão, o resultado obtido após a substituição da absorbância na equação da reta foi multiplicado pelo fator de diluição 50 obtendo-se a concentração de açúcares redutores totais.

4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Ao término do pré-tratamento, o sólido filtrado foi lavado com água destilada em excesso para a completa remoção do ácido sulfúrico indicado pelo pH da água de lavagem na ordem de 6. O resíduo sólido foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 100 mL de solução tampão de citrato 0,05 mol/L pH = 4,8 e mantidas em refrigeração (4 °C) por 36 h garantindo o inchamento das partículas dentro da matriz celulósica das biomassas.

Para o preparo do tampão de citrato 0,05 mol/L, 9,605 g de ácido cítrico anidro foram dissolvidos em 250 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1,00 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Em seguida, mediu-se o pH e foi adicionado NaOH sólido até que a solução atingisse o pH de 4,8.

Após o processo de inchamento da biomassa, os erlenmeyers foram incubados em um *shaker* orbital a temperatura de 50 °C com rotação de 180 rpm durante 1 h, para garantir um equilíbrio térmico apropriado para a adição da enzima. Posteriormente, nos erlenmeyers contendo o substrato e a solução tampão de citrato 0,05 mol/L pH = 4,8, foi adicionado a enzima.

Neste trabalho testou-se uma condição de hidrólise enzimática, utilizando-se a enzima comercial *Celluclast*[®] 1,5L, fabricada pela empresa *Novozymes*. Na hidrólise utilizou-se uma carga de 15 FPU/g de substrato. A *Celluclast*[®] possui uma atividade enzimática de 65 FPU/mL de acordo com o fabricante. Em seguida, os erlenmeyers foram fechados e levados à incubação em um *shaker* a temperatura de 50°C com rotação de 150 rpm por um período de 72 h. Durante a hidrólise, 1,0 mL foi coletado no tempo de 72 h para análises posteriores de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.6.1 Análise de açúcares e inibidores por CLAE

Antes da análise cromatográfica, as amostras dos hidrolisados foram filtradas em membranas Millipore (ésteres de celulose, 0,22 µm, 13 mm) e foram

mantidos em vials no congelador a aproximadamente $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise ($15\text{ }\mu\text{L}$). A composição química dos hidrolisados foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Ácidos acético, levulínico e fórmico foram quantificadas utilizando uma coluna de troca iônica Bio-Rad®, as concentrações de cada uma foram determinadas usando um detector de UV-vis a 210 nm . A coluna foi mantida a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5 mM de H_2SO_4 foi utilizado como eluente a uma vazão de 0.6 mL/min .

Uma série de padrões de calibração contendo os compostos a serem quantificados foi preparada nas concentrações sugeridas nos protocolos padrão NREL.

Os dados foram armazenados e processados usando o software de dados de cromatografia Edição OpenLAB CDS ChemStation (Waters Rev. 0.01.02).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Após a fragmentação da palha da cana-de-açúcar em um moinho de facas, secou-se a matéria prima a ser utilizada nos experimentos deste trabalho, de modo que sua umidade final não fosse propícia para o desenvolvimento de fungos e bolores, garantindo assim sua conservação por um maior período de tempo. A umidade residual média da palha utilizada foi de $3,38 \pm 0,28\%$, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Umidade residual da palha da cana-de-açúcar após secagem.

<i>Amostra nº</i>	<i>Umidade %</i>
1	3,56
2	2,98
3	3,61
Média ± SD	3,38 ± 0,28
Coefficiente de variação %	8,39

Fonte: Do autor.

Após, mediu-se o comprimento e espessura médios de algumas fibras da palha de cana-de-açúcar com o auxílio de um paquímetro, observou-se que suas dimensões médias eram, respectivamente, 21,6 mm e 1,2 mm.

Na Figura 9 têm-se a palha da cana-de-açúcar seca e moída utilizada neste trabalho. Optou-se em trabalhar com a palha da cana-de-açúcar com tais dimensões, simulando-se um processo industrial, no qual uma moagem muito eficiente provocaria um aumento de custo do processo. Segundo Rabelo (2010), que avaliou a influência do tamanho da partícula do bagaço de cana-de-açúcar durante o pré-tratamento químico, postulou, com ressalvas, que não há a necessidade de redução do tamanho das partículas para garantir a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à biomassa pré-tratada.



Figura 9 - Palha da cana-de-açúcar moída.

Fonte: Do autor.

A análise quantitativa dos componentes da palha da cana-de-açúcar, foi realizada segundo os protocolos disponibilizados pela *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (Tabela 9).

Tabela 9 - Caracterização química da palha da cana de açúcar.

Componente	% ± SD
<i>Celulose</i>	36,71 ± 3,16
<i>Hemiceluloses</i>	24,85 ± 1,62
<i>Lignina</i>	24,64 ± 0,84
<i>Cinzas</i>	9,56 ± 2,14
<i>Extrativos</i>	4,24 ± 1,75

Fonte: Do autor.

Observou-se (Tabela 9) que os polímeros capazes de liberar açúcares fermentescíveis após as devidas hidrólises, compõem mais de 60% da massa bruta da matéria-prima. Na Tabela 10 foi feito um comparativo entre a composição da palha da cana-de-açúcar in natura utilizada nesse trabalho (proveniente da região de São João da Boa Vista – SP), com a utilizada por outros autores. É possível verificar que o teor de celulose encontrado nesse trabalho (36,71 %) também foi praticamente encontrado por Pratto et al. (2014), que trabalhou com uma matéria-prima oriunda da região de Catanduva – SP. O teor de hemiceluloses encontrado nesse trabalho (24,85 %), foi menor que o observado por outros autores, enquanto que Moutta et al. (2013a), que trabalhou

com palha de cana-de-açúcar da região de São Paulo – SP, obteve o maior índice encontrado (31,38 %) de hemiceluloses. O teor de lignina encontrado nesse trabalho (24,64 %), está dentro da faixa de concentração prevista por Santos et al. (2012) de 22-25 %. O teor de cinzas encontrado nesse trabalho (9,56 %), foi maior que o observado por outros autores, enquanto que Moutta et al. (2013b), que trabalhou com palha de cana-de-açúcar da região de Jataí – GO, obteve o menor índice encontrado (2,67 %) de cinzas. O teor de extrativos encontrados nesse trabalho (4,24 %), é um valor intermediário entre aqueles que foram encontrados por Moutta et al. (2013b) e Pratto et al. (2014). A concentração dos componentes químicos estruturais de vegetais, sofrem variações de acordo com a região de plantio, clima, umidade, limitação de água e nutrientes pelo solo, idade do vegetal, entre outros (LYND et al., 1969). A determinação dos teores de celulose e hemiceluloses que compõem a palha da cana-de-açúcar utilizada foram importantes para o cálculo do rendimento de açúcares fermentescíveis liberados após a etapa da hidrólise enzimática.

Tabela 10 - Comparativo da composição da palha da cana-de-açúcar in natura

Autores	Celulose %	Hemiceluloses %	Lignina %	Cinzas %	Extrativos %
Este trabalho	36,71 ± 3,16	24,85 ± 1,62	24,64 ± 0,84	9,56 ± 2,14	4,24 ± 1,75
SANTOS et al., (2012)	40 – 44	30 - 32	22 - 25	-	-
MOUTTA et al., (2013a)	29,39 ± 8,20	31,38 ± 2,88	26,00 ± 0,60	4,83 ± 0,10	12,65 ± 0,09
MOUTTA et al., (2013b)	29,25 ± 1,08	30,34 ± 3,43	29,90 ± 0,28	2,67 ± 0,14	8,41 ± 2,15
PRATO et al., (2014)	36,70	29,88	19,74	6,15	6,24

Fonte: Do autor.

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

5.2.1 Curva para quantificação de glicose

Para a realização das leituras de concentração dos açúcares redutores totais liberados durante o pré-tratamento, foi construída uma curva analítica de calibração seguindo-se o método do DNS proposto por Miller (1959). Os resultados obtidos nas análises que foram feitas em triplicatas encontram-se na Tabela 11. Observa-se que o coeficiente de variação máximo obtido entre as repetições amostrais foram de 7,51%, sendo baixa a dispersão entre as análises demonstrando o rigor analítico dos resultados.

Tabela 11 - Curva de glicose

[Glicose] (g/L)	Amostras (Abs)			Média ± SD	Coeficiente de variação %
	1	2	3		
0,10	0,019	0,022	0,020	0,020 ±0,0015	7,51
0,20	0,073	0,072	0,076	0,074±0,0021	2,83
0,40	0,155	0,160	0,155	0,157±0,0029	1,84
0,60	0,266	0,265	0,269	0,267±0,0021	0,78
0,70	0,277	0,279	0,275	0,277±0,0020	0,72
0,80	0,335	0,329	0,330	0,331±0,00	0,97
0,90	0,385	0,379	0,369	0,378±0,01	2,14

Fonte: Do autor.

Deste modo, construiu-se o gráfico de dispersão da concentração média de glicose em função da absorbância, representado pela Figura 10, que de acordo com a Lei de Lamber-Beer é uma função linear. Observa-se que o coeficiente de regressão linear R^2 foi satisfatório de 99,4%. Portanto, para a quantificação de glicose durante a execução do planejamento experimental utilizou-se a Equação 9:

$$[\text{Glicose}]_{(g/L)} = 2,259 \times \text{Abs} + 0,0429 \quad (9)$$

Onde: [Glicose] é a concentração de glicose em g/L e Abs é a absorvância medida em uma faixa de comprimento de onda de 540 nm.

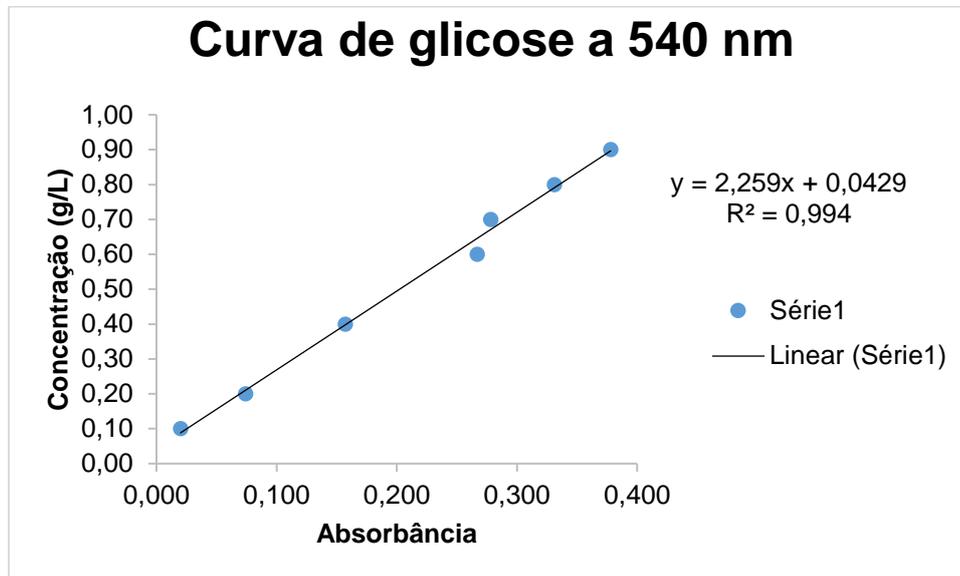


Figura 10: Curva para determinação de glicose.

Fonte: Do autor.

O teste do DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor.

5.2.2 Análise de sólidos solúveis

Foi avaliado em cada condição do planejamento experimental a concentração de sólidos solúveis liberados durante o pré-tratamento. Os resultados obtidos (Tabela 12) demonstram que na concentração de 2,5 % de ácido sulfúrico em um tempo de 20 minutos em autoclave, foram liberados 3,9 °B de sólidos solúveis em solução. Durante o pré-tratamento com ácido diluído é obtido uma fração líquida rica em hemiceluloses removidas da matriz celulósica da biomassa, e uma fração sólida constituída por lignina, além da celulose que será quebrada em glicose na etapa de hidrólise. A menor concentração de

sólidos solúveis foi obtida na condição de 0,10 % de ácido sulfúrico em um tempo de 35 minutos em autoclave, o que revela a necessidade no aumento da concentração do ácido para promover a solubilização das hemiceluloses e garantir o tratamento adequado da palha da cana-de-açúcar para a etapa de hidrólise.

Tabela 12 - Sólidos solúveis.

Exp	[H₂SO₄] %	Tempo (min)	°B
1	0,50	20	1,7
2	2,50	20	3,9
3	0,50	50	1,9
4	2,50	50	3,5
5	0,10	35	0,6
6	2,90	35	2,9
7	1,50	14	2,8
8	1,50	56	2,8
9 (C)*	1,50	35	2,9
10 (C)*	1,50	35	3,0
11 (C)*	1,50	35	2,9

Fonte: Do autor.

C*: pontos centrais do planejamento experimental

Com o teste de Shapiro Wilk ratificou-se a normalidade dos dados (concentrações em °B), onde foi obtido um W calculado de 0,8878 sendo maior que o W tabelado de 0,85 para um conjunto de dados de onze amostras.

Realizando-se as análises estatísticas observa-se que apenas as concentrações linear e quadrática de ácido sulfúrico foram estatisticamente significativas para o intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) para a variável repostas sólidos solúveis (°B) (Tabela 13).

Tabela 13 - Coeficientes da variável sólidos solúveis.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	-95%	95%
Média	2,931	0,183	16,00	0,000	2,46	3,40
(1)concentração(L)	0,883	0,112	7,86	0,001	0,59	1,17
concentração(Q)	-0,474	0,134	-3,53	0,017	-0,82	-0,13
(2)tempo (L)	-0,025	0,112	-0,22	0,832	-0,31	0,26
tempo (Q)	0,054	0,134	0,41	0,702	-0,29	0,40
1L por 2L	-0,150	0,159	-0,95	0,388	-0,56	0,26

Fonte: Do autor.

A partir do diagrama de Pareto foi possível avaliar as variáveis que apresentaram o maior efeito na concentração de sólidos solúveis (Figura 11).

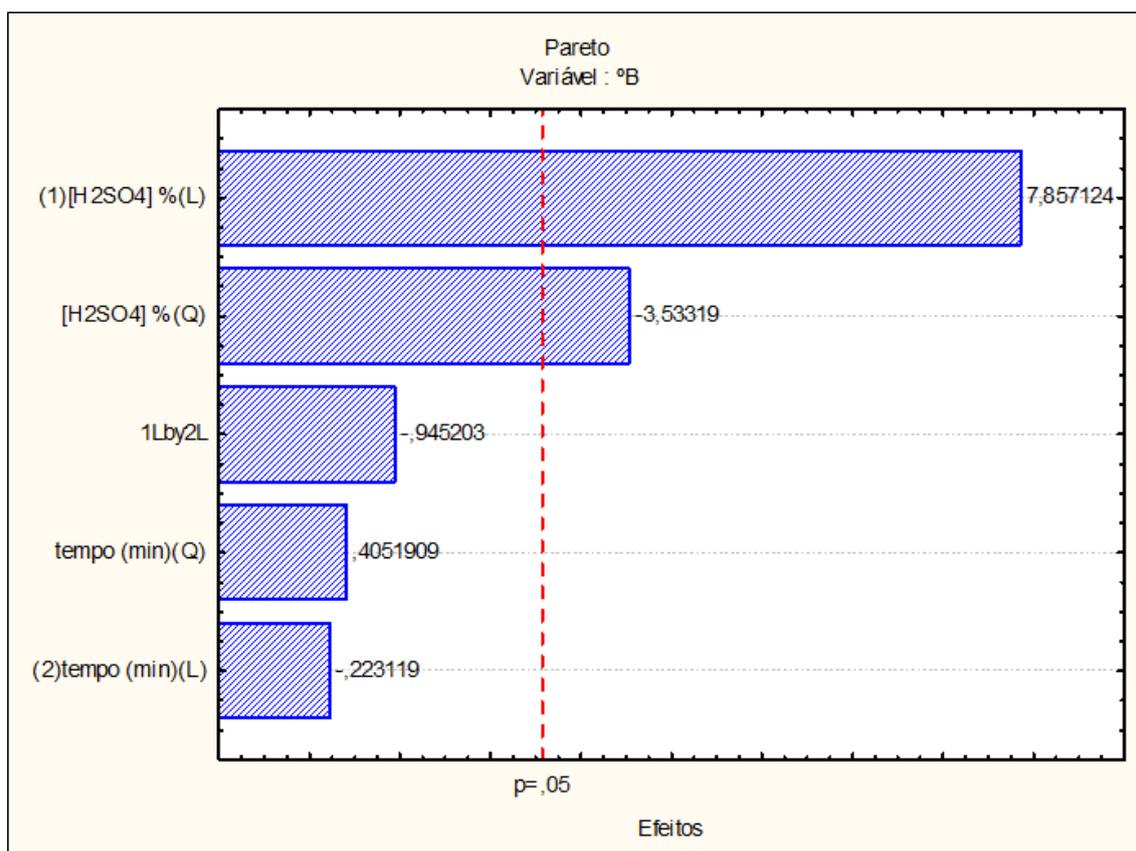


Figura 11 - Diagrama de Pareto dos fatores do planejamento experimental.

Fonte: Do autor.

Observou-se que a concentração linear de ácido sulfúrico é a variável com maior efeito nas respostas do planejamento experimental, seguido da

concentração quadrática de ácido sulfúrico. Observou-se também que os tempos de pré-tratamento linear e quadrático, não apresentaram efeitos significativos na variável resposta. Deste modo, para a construção da ANOVA e posteriormente obtenção de um modelo matemático, os tempos de pré-tratamento linear e quadrático e a interação linear entre concentração de ácido sulfúrico e tempo de pré-tratamento, foram excluídos da regressão e adicionados aos resíduos, pelo fato de não serem significantes pela análise do p-valor.

Foi construída a tabela da ANOVA que permite o cálculo dos efeitos com as variáveis significativas; e os resíduos com as variáveis não significativas. Observou-se que o R^2 obtido foi de 92,59 % e o F calculado é 11,03 vezes maior que o F tabelado, sendo o modelo proposto significativo (Tabela 14). Assim, é possível a construção da superfície para análise.

Tabela 14 - ANOVA do $^{\circ}B$.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc	p-valor
Regressão	7,6911	2	3,8456	50,38	0,00005
Resíduos	0,6107	8	0,0763		
Falta de ajuste	0,604				
Erro puro	0,0067				
Total	8,3018	10			
$R^2 = 92,64\%$; $F_{0,95;2,8} = 4,46$					

Fonte: Do autor.

Com isso pode-se obter a superfície de contorno com a otimização do processo, onde é possível verificar que a condição experimental de ácido sulfúrico a 2% e tempo de 40 min de pré-tratamento também está dentro da faixa de rendimento otimizada, assim como verificado com a variável resposta glicose / g palha de cana-de-açúcar (Figura 12). A Equação 10 descreve a variável resposta obtida pelo modelo.

$$^{\circ}B = 2,892 + 0,882 * C - 0,488 * C^2 \quad (10)$$

Onde:

C: concentração de ácido sulfúrico, em % em massa

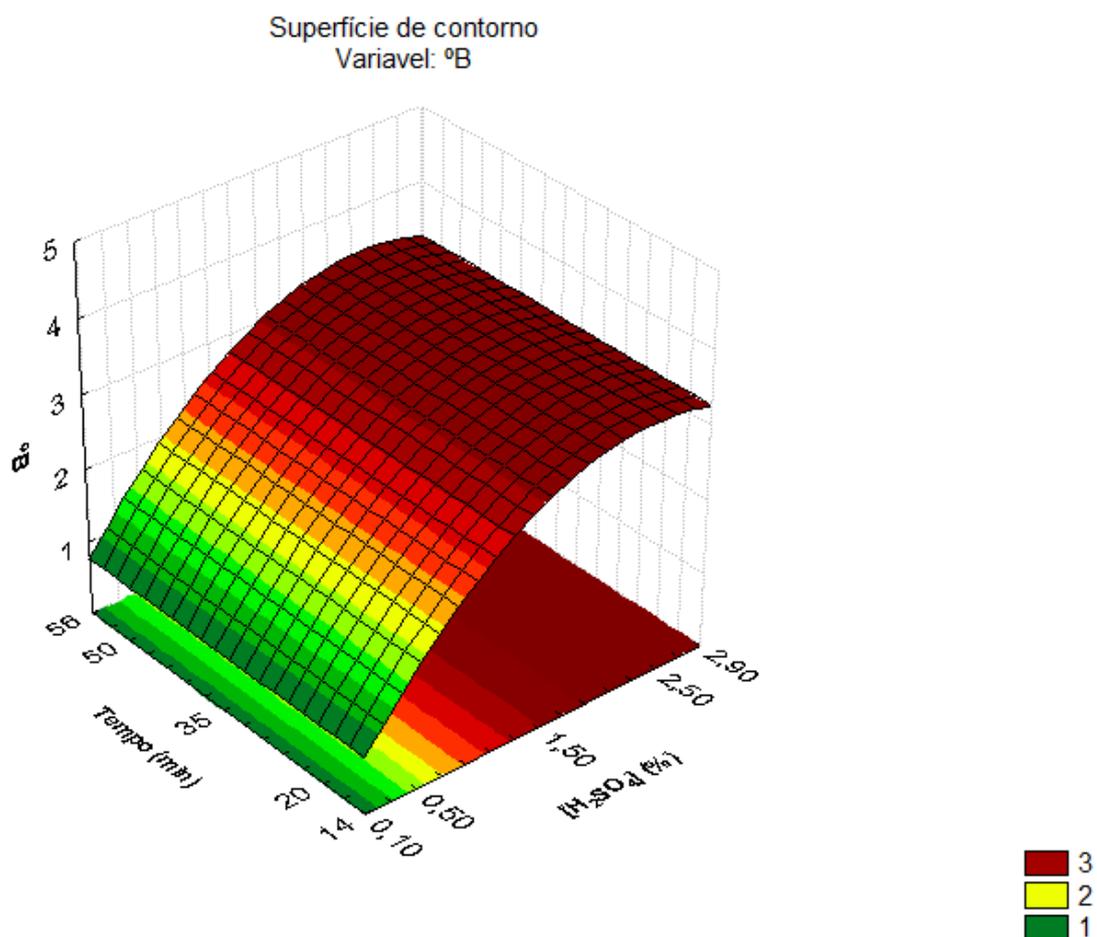


Figura 12 - Superfície de contorno do °B.

Fonte: Do autor.

5.2.3 Glicose liberada durante o pré-tratamento

O planejamento experimental foi executado para a otimização do pré-tratamento, as análises de glicose liberada em cada condição foram realizadas em triplicatas, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise de glicose no pré-tratamento ácido.

Exp	Absorbância 540nm			Média ± SD	Coefficiente de variação %
1	0,020	0,018	0,019	0,019 ± 0,0010	5,26
2	0,051	0,052	0,052	0,052 ± 0,0006	1,12
3	0,032	0,031	0,034	0,032 ± 0,0015	4,72
4	0,051	0,056	0,056	0,054 ± 0,0029	5,31
5	0,001	0,001	0,001	0,001 ± 0,0000	0,00
6	0,051	0,058	0,056	0,055 ± 0,0036	6,56
7	0,029	0,027	0,029	0,028 ± 0,0011	4,08
8	0,049	0,050	0,051	0,050 ± 0,0010	2,00
9 (C)*	0,054	0,053	0,056	0,054 ± 0,0015	2,81
10 (C)	0,059	0,050	0,051	0,053 ± 0,0049	9,25
11 (C)	0,053	0,051	0,058	0,054 ± 0,0036	6,68

Fonte: Do autor.

C*: Pontos centrais do planejamento experimental.

Analisando-se os resultados, observa-se que a dispersão entre as repetições nas análises de glicose foram baixas, inferiores a um coeficiente de variação de 10%.

O desvio padrão amostral (S) foi calculado pela Equação 11:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (11)$$

Sendo: X_i cada amostra, \bar{X} a média aritmética simples e n o número de amostras avaliadas.

O coeficiente de variação (CV %) foi calculado pela Equação 12:

$$CV \% = \left(\frac{S}{\bar{X}}\right) \times 100 \quad (12)$$

Sendo: S o desvio padrão amostral e \bar{X} a média aritmética simples das amostras avaliadas.

Com os valores de absorvância média de cada condição do planejamento experimental, calculou-se a concentração de glicose utilizando-se a equação obtida anteriormente ($[Glicose]_{(g/L)} = 2,259 \times Abs + 0,042$). A concentração de glicose em g/L foi multiplicada pelo volume em L de licor recuperado após a filtração à vácuo e separação da fração sólida. A massa de glicose obtida foi dividida pela massa inicial de palha de cana-de-açúcar pré-tratada. Assim, obteve-se uma relação entre a massa de glicose liberada no licor por massa de palha de cana-de-açúcar alimentada. Os resultados são apresentados na Tabela 16. Observou-se que a maior concentração de glicose foi obtida na condição de pré-tratamento na qual combinou-se uma concentração de ácido sulfúrico de 2,90 % com 35 minutos de autoclave (ensaio 6). Porém, devido à maior recuperação de licor nos experimentos com as condições centrais do planejamento experimental, a maior relação de massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar foi obtida na condição de ácido sulfúrico a 1,50 % com 35 minutos de autoclave (ensaios 9, 10 e 11).

Tabela 16 - Variável resposta massa glicose/g palha.

Exp	Média Absorbância	Glicose g/L	Volume licor (L)	g Glicose	g Glicose / g palha
1	0,019	4,29	0,115	0,493	0,099
2	0,052	7,98	0,130	1,037	0,207
3	0,032	5,80	0,125	0,725	0,145
4	0,054	8,28	0,145	1,201	0,240
5	0,001	2,26	0,137	0,309	0,062
6	0,055	8,36	0,128	1,070	0,214
7	0,028	5,35	0,120	0,641	0,128
8	0,050	7,79	0,127	0,990	0,198
9 (C)*	0,054	8,28	0,135	1,118	0,224
10 (C)	0,053	8,17	0,135	1,103	0,221
11 (C)	0,054	8,24	0,135	1,113	0,223

Fonte: Do autor.

C*: Pontos centrais do planejamento experimental.

As variáveis massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar e sólidos solúveis foram avaliadas estatisticamente, os resultados são apresentados na sequência.

Rabelo (2010) demonstrou que a partir dos resíduos gerados nas etapas de pré-tratamento e hidrólise, é possível obter biogás como fonte de energia para o processo produtivo, conforme necessidade da usina.

Inicialmente, os resultados obtidos foram avaliados através do teste de Shapiro Wilk afim de confirmar a distribuição normal dos dados, para que posteriormente fossem feitas as análises estatísticas para a otimização do pré-tratamento. Com o teste de Shapiro Wilk, a normalidade dos dados foi ratificada, pois, obteve-se um W calculado de 0,8587 sendo maior que o W tabelado de 0,85 para um conjunto de dados de onze amostras.

Realizando-se as análises estatísticas observa-se que a concentração de ácido sulfúrico, linear e quadrática, o tempo de pré-tratamento em autoclave, linear e quadrático, foram significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para a variável resposta g glicose/g palha (Tabela 17).

Tabela 17 - Coeficientes da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	-95%	95%
Média	0,224	0,009	25,894	0,000	0,202	0,246
(1)concentração(L)	0,052	0,005	9,895	0,000	0,039	0,066
concentração(Q)	-0,038	0,006	-5,929	0,002	-0,054	-0,021
(2)tempo (L)	0,022	0,005	4,188	0,009	0,009	0,036
tempo (Q)	-0,025	0,006	-3,925	0,011	-0,041	-0,009
1L por 2L	-0,003	0,007	-0,453	0,670	-0,023	0,016

Fonte: Do autor.

A partir do diagrama de Pareto foi possível avaliar as variáveis que apresentaram o maior efeito na variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar (Figura 13).

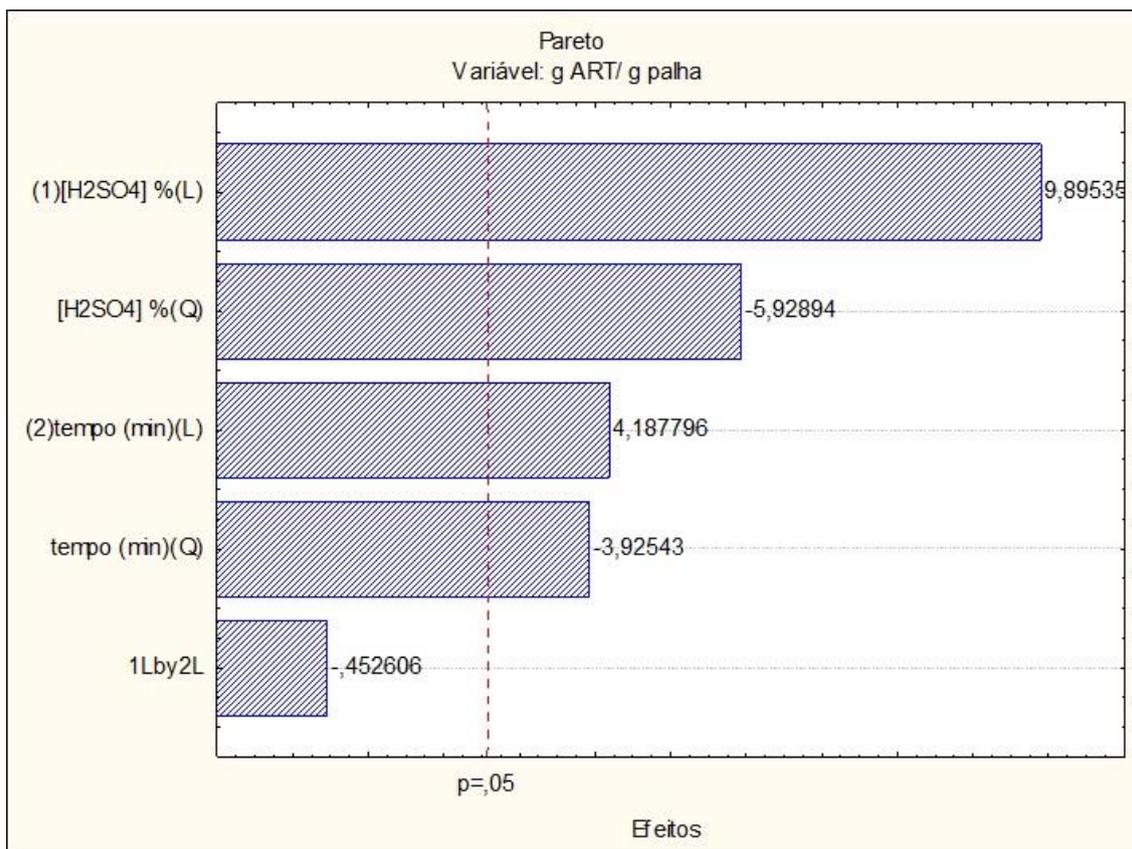


Figura 13 - Diagrama de Pareto da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Do autor.

Observou-se que a concentração linear de ácido sulfúrico é a variável com maior efeito nas respostas do planejamento experimental. Observou-se também que a concentração de ácido sulfúrico quadrático, além dos tempos de pré-tratamento linear e quadrático, também apresentaram efeitos significativos na variável resposta. Deste modo, para a construção da ANOVA e posteriormente obtenção de um modelo matemático, apenas a interação linear entre concentração de ácido sulfúrico e tempo de pré-tratamento foi excluída da regressão e adicionada aos resíduos, pelo fato de não ser significativa pela análise do p-valor.

Foi construída a tabela da ANOVA que permite o cálculo dos efeitos com as variáveis significativas; e os resíduos com as variáveis não significativas. Observou-se que o R^2 obtido foi de 96,77 % e o F calculado é 9,92 vezes maior que o F tabelado, sendo o modelo proposto significativo (Tabela 18). Assim, é possível a construção da superfície para análise estatística.

Tabela 18 - ANOVA da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc	p-valor
Regressão	0,0346	4	0,0087	47,18	0,0001
Resíduos	0,0011	6	0,0002		
Falta de ajuste	0,0011				
Erro puro	0,0000				
Total	0,0357	10			
R² = 96,90%; F_{0,95;4,6} = 4,53					

Fonte: Do autor.

Com isso pode-se obter a superfície de contorno com a otimização do processo, onde é possível verificar que a melhor condição experimental é de ácido sulfúrico a 2 % e tempo de 40 min de pré-tratamento (Figura 14). A Equação 13 descreve a variável repostada obtida pelo modelo.

$$\text{Glicose (g/L)} = 0,223 + 0,052 \cdot C - 0,037 \cdot C^2 + 0,022 \cdot t - 0,024 \cdot t^2 \quad (13)$$

Onde:

C: concentração de ácido sulfúrico, em % em massa

t: tempo, em minutos

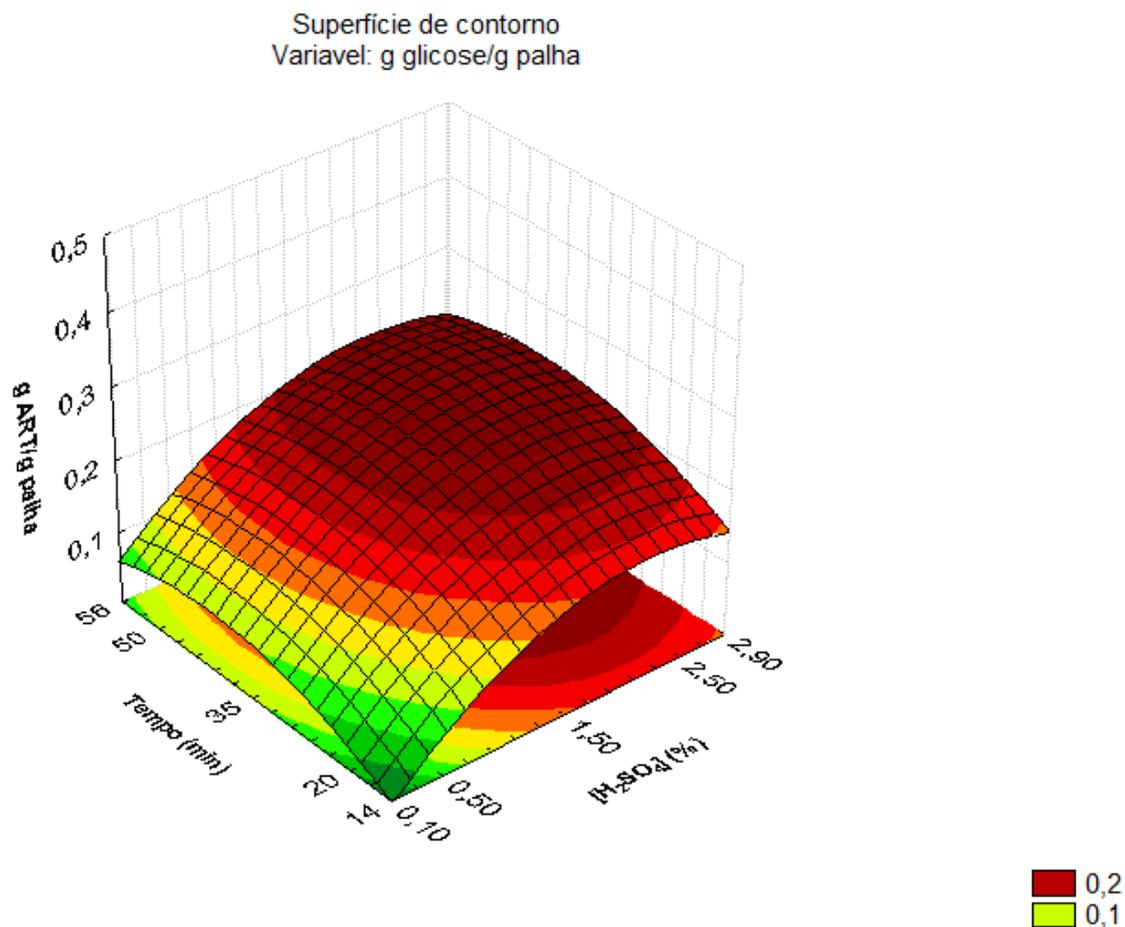


Figura 14 - Superfície de contorno da variável g glicose/ g palha de cana-de-açúcar.

Fonte: Do autor.

Schultz et al. (2014) realizaram um planejamento experimental semelhante ao deste trabalho, porém para a otimização do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com uma carga de sólidos de 1:10. Após realizar uma hidrólise enzimática em todos os sólidos pré-tratados, fixando uma carga enzimática de *Cellic® CTec3* (Novozymes) em 15 FPU/g de biomassa, a 50 °C durante 48h, foi verificado que a condição ótima de pré-tratamento para o bagaço da cana-de-açúcar foi a condição onde utilizou-se ácido sulfúrico a 1,5 % com um tempo de autoclave de 56 min. Tais condições otimizadas são semelhantes às obtidas neste trabalho para a palha da cana-de-açúcar, sendo uma concentração de ácido sulfúrico a 2 % e tempo de pré-tratamento de 40 min em autoclave. Tal fato pode ser atribuído a semelhança quantitativa entre os componentes estruturais de ambas biomassas.

5.2.4 Validação do planejamento experimental no ponto central

Para avaliar a eficácia do modelo proposto pelo planejamento experimental, realizou-se um pré-tratamento na condição ótima fornecida pela superfície de contorno: ácido sulfúrico a 2 % e tempo de 40 min. Os resultados obtidos nas análises de glicose do licor do pré-tratamento da condição central (Tabela 19) revelaram uma absorvância média de $0,052 \pm \text{SD } 0,0021$ com um coeficiente de variação de 4,19 %.

Tabela 19: Análise de glicose no ponto central medido em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Experimento	Absorbância			Média \pm SD	Coeficiente de variação %
Ponto central [H₂SO₄] 2% Tempo 40 min	0,049	0,048	0,046	$0,052 \pm 0,0021$	4,19

Fonte: Do autor.

Com a absorvância média do licor da condição central fornecida pela superfície de contorno, foi calculado o rendimento de g glicose / g de palha de cana-de-açúcar de acordo com a metodologia descrita no item 5.2.3. Observou-se a liberação de 0,194 g glicose/g palha, sendo uma concentração equivalente a 97 % do esperado (0,2 g glicose/ g palha) de acordo com a superfície de contorno gerada pelo modelo (Tabela 20).

Tabela 20 - Rendimento de glicose no ponto central.

Experimento	Média Absorbância	glicose g/L	Volum e licor (L)	g glicose	g glicose / g palha
Ponto central [H₂SO₄] 2% Tempo 40 min	0,052	7,75	0,125	0,969	0,194

Fonte: Do autor.

Em relação a segunda variável resposta: concentração de sólidos solúveis (°B) do licor do pré-tratamento, foi obtido uma concentração de 3,2 °B na condição ótima de ácido sulfúrico a 2 % e tempo de 40 min, sendo também um resultado satisfatório, pois a concentração estimada pelo modelo era 3 °B.

Com o intuito de ratificar a qualidade das informações fornecidas por ambos os planejamentos experimentais, avaliou-se isoladamente a influência do tempo de pré-tratamento nas duas variáveis respostas deste trabalho: massa de glicose por grama de palha de cana de açúcar e liberação de sólidos solúveis em °B. Para a realização deste teste, fixou-se a concentração da solução de ácido sulfúrico em 2 % (m/V), que é a concentração ótima verificada nos dois planejamentos experimentais, e variou-se o tempo de pré-tratamento no intervalo de -1 até +1 do planejamento experimental, ou seja, testou-se os tempos: 20, 35 e 50 minutos de pré-tratamento. Este teste foi feito pelo fato de a variável tempo ter sido estatisticamente significativa apenas na variável resposta massa de glicose por grama de palha de cana de açúcar, e não sendo significativa para a liberação de sólidos solúveis em °B. Os resultados obtidos (Tabela 21) ratificam que a liberação de sólidos solúveis em °B não sofre influência do tempo de pré-tratamento, devido à baixa variação de concentração observada. Porém, para a variável massa de glicose por grama de palha de cana de açúcar, observou-se uma amplitude de variação de apenas 0,005 g glicose/g palha, o que demonstra que apenas a concentração da solução de ácido sulfúrico tem influência nas variáveis repostas avaliadas neste trabalho.

Observa-se que no tempo de 20 minutos a reação já havia atingido o estado estacionário, o que justifica a baixa variação observada nas variáveis respostas, mesmo alternando-se o tempo reacional.

Tabela 21 - Influência do tempo no planejamento experimental

[H ₂ SO ₄] %	Tempo (min)	T 540 médio	Glicose g/L	Vol licor (L)	Glicose (g)	g glicose/g palha	°B
2	50	0,0763	10,77	0,127	1,367	0,273	3,5
	35	0,0680	9,83	0,140	1,376	0,275	3,3
	20	0,0790	11,07	0,122	1,350	0,270	3,5

Fonte: Do autor.

5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A palha da cana-de-açúcar pré-tratada na condição ótima fornecida pelos planejamentos experimentais (concentração de ácido sulfúrico a 2% m/v por 40 minutos em autoclave), foi submetida à hidrólise enzimática utilizando-se a enzima comercial Celluclast® 1,5 L, com a carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa. Os resultados de concentrações de açúcares redutores obtidos após 72 h de hidrólise encontram-se na Tabela 22. É possível observar que houve a hidrólise de aproximadamente 14 g/L de glicose da celulose contida na estrutura da biomassa. Obteve-se também 4,67 g do polímero celobiose, que consiste na união de duas moléculas de glicose. A grande quantidade de celobiose não convertida em glicose obtida nesse ensaio pode ser atribuída à baixa concentração de B-glucosidases na enzima Celluclast® 1,5 L. Ressalta-se que para haver a hidrólise completa da celulose da biomassa, é necessário a ação sinérgica de endoglucanases, exoglucanases além de B-glucosidases.

Nos resultados da Tabela 22, também é possível observar a identificação de uma pequena quantidade de arabinose (0,080 g/L), o açúcar xilose não foi identificado. Foram identificados os ácidos fórmico (0,173 g/L) e levulínico (0,027 g/L), que são obtidos pela decomposição das hemiceluloses e celulose, respectivamente. Ácido acético não foi identificado. A baixa concentração de inibidores é importante para que não caia o rendimento da conversão de celulose em glicose, além de não intoxicar os micro-organismos fermentadores durante a etapa de fermentação.

Tabela 22 - Concentração de açúcares após 72 h de hidrólise enzimática.

Enzima	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido Fórmico (g/L)	Ácido Levulínico (g/L)
Celluclast®	4,670	13,998	0,080	0,173	0,027

Fonte: Do autor.

A digestibilidade percentual da celulose da biomassa após a hidrólise enzimática foi calculada utilizando-se a Equação 14, onde foi verificado que

68,71 % da celulose inicial da palha da cana-de-açúcar foi transformada em outros componentes.

$$D = \frac{GLC}{1,11 * F_{cell_{wo}} * I_{wo}} * 100 \quad (14)$$

Onde:

GLC: Concentração de glicose após hidrólise enzimática em g/L.

$F_{cell_{wo}}$: Fração de celulose contida na biomassa (proveniente da análise de caracterização da matéria-prima).

I_{wo} : Concentração inicial de substrato na hidrólise em g/L.

$$D = \frac{14}{1,11 * 0,3671 * \frac{5}{0,1}} * 100 = 68,71 \%$$

A partir do resultado da digestibilidade da celulose, foi calculado o rendimento global de conversão de celulose em glicose utilizando-se a Equação 15. Para tal, foi necessário conhecer a fração de palha de cana-de-açúcar recuperado após o pré-tratamento, que é a carga de sólidos que inicia a hidrólise enzimática. Deste modo, o sólido residual de uma amostra pré-tratada na condição ótima dos planejamentos experimentais foi filtrado a vácuo em um papel de filtro previamente seco e de massa conhecida, lavado abundantemente com água destilada, seco em estufa a 105 °C por 24 h e por fim, pesado novamente para o cálculo da porcentagem de sólidos remanescentes. Neste experimento, foi recuperado 51,8 % da palha da cana-de-açúcar após pré-tratamento. Com isso, o rendimento global de conversão de celulose em glicose foi de 35,59 %.

$$Y_{GLC} = D * F_{sol_rec} \quad (15)$$

Onde:

D: Digestibilidade percentual da celulose calculada anteriormente pela equação 14.

F_sol_rec: Fração de sólidos recuperados após pré-tratamento.

$$Y_{GLC} = 68,71 * 0,518 = 35,59 \%$$

No trabalho de Schultz et al. (2014), cujas condições de pré-tratamento com ácido diluído e hidrólise enzimática foram descritas no item 5.2.3, observou-se que a conversão máxima de celulose em glicose obtida após 48 h de hidrólise foi de 42,1 %. Moutta et al. (2013a), realizaram um pré-tratamento hidrotérmico em palha de cana-de-açúcar com uma carga de sólidos de 1:10. Após, realizou uma hidrólise enzimática também com Celluclast® 1,5 L suplementada com a enzima Novozym 188 β -glucosidase. Foi verificado após 24 h de hidrólise a liberação de 17,20 g/L de glicose com um rendimento global de 84,40 %.

Provavelmente, o maior rendimento verificado por Moutta et al. (2013a), foi devido a adição da enzima Novozym 188 β -glucosidase que têm a função de quebrar a celobiose em glicose.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, a palha da cana-de-açúcar utilizada nos experimentos pode ser caracterizada quantitativamente, onde foi constatado variações na sua composição química que podem ser justificadas pela variação da região de plantio da cana-de-açúcar, do clima, da umidade local, limitação de água e nutrientes do solo, idade do vegetal, entre outros.

Os resultados obtidos na etapa do pré-tratamento foram satisfatórios, onde a condição otimizada encontrada para a liberação de glicose e também sólidos solúveis, foi a condição onde utilizou-se ácido sulfúrico a 2,0 % m/v de concentração com o tempo de 40 minutos em autoclave, onde obteve-se uma concentração de 0,194 g glicose/g de palha de cana-de-açúcar e 3,2 °B. As análises estatísticas realizadas demonstraram que a concentração de ácido sulfúrico (linear e quadrático) e tempo de autoclave (linear e quadrático) foram estatisticamente significativos (pela análise do p-valor) em um intervalo de confiança de 95 % para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar; enquanto que para a variável concentração de sólidos solúveis, apenas a concentração de ácido sulfúrico (linear e quadrático) foram estatisticamente significativos. Além disso, a análise da ANOVA (análise de variância) demonstrou que o modelo previsto é estatisticamente significativo com R^2 de 96,77 % para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar, e 92,59 % para a variável concentração de sólidos solúveis. Observou-se também que o F calculado é 9,92 vezes maior do que o F tabelado para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cana-de-açúcar, e 11,03 vezes maior para a variável concentração de sólidos solúveis, confirmando em ambos os casos a significância dos modelos matemáticos propostos.

Na hidrólise enzimática realizada com a enzima comercial Celluclast® 1,5L com carga de 15 FPU/g de biomassa, foi verificado uma digestibilidade de 68,71 % da celulose da palha da cana-de-açúcar utilizada, enquanto que 35,59 % da celulose total da biomassa foram convertidas em glicose. Altas concentrações de glicose são desejadas para que durante a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* seja produzido etanol. Foi observado também que

maiores concentrações de glicose poderiam ter sido alcançadas nestes experimentos, com a adição de enzimas com atividades β -glicosídicas, onde a grande quantidade de celobiose produzida (4,67 g/L) também seria convertida em glicose.

Deste modo, foi demonstrado que a palha da cana-de-açúcar é uma biomassa com grande potencial para a produção de etanol de segunda geração e sua utilização para este fim permite a ampliação da produção de etanol por hectare de plantio sem a necessidade de aumento da área de cultivo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, seguem algumas atividades que podem ser realizadas após esse trabalho de dissertação de mestrado complementando assim os dados estudados:

- a) Realizar ensaios de fermentação nos hidrolisados obtidos e avaliar o rendimento em produção de etanol.
- b) Avaliar a conversão de glicose na condição otimizada suplementando-se a hidrólise enzimática com uma enzima com atividade β -glicosídicas.
- c) Avaliar a conversão de glicose na condição otimizada utilizando-se maiores cargas de palha de cana-de-açúcar no início do pré-tratamento.
- d) Buscar uma otimização multivariável que contemple simultaneamente a obtenção de açúcares fermentescíveis da celulose e hemicelulose.
- e) Remover a variável tempo do planejamento experimental e adicionar a variável carga de sólidos totais buscando maiores concentrações de açúcares fermentescíveis.

REFERÊNCIAS

- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v.34, n. 23, p.551- 573, 2008.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1996.
- BRASIL. **Safra de cana 2016/17 cresce em produção e área**. Brasília, abr. 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/04/safra-de-cana-2016-17-cresce-em-producao-e-area>>. Acesso em: 06 out. 2017.
- CANILHA, L. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré hidrólise acida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-53, 2010.
- CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.74, p.135–159, 1998.
- CHATUVERDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **Biotech**, v. 3, n. 5, p. 415–431, 2013.
- COPERATICA DE AÇÚCAR (COPERSUCAR). **Curso básico sobre tratamento do caldo**. Piracicaba, 1989.
- DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n.2, p.249 –260, 1997.
- DIAS, M. O. S. **Desenvolvimento e otimização de processos de produção de etanol de primeira e segunda geração e eletricidade a partir da cana-de-açúcar**. 2011. 277f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2011.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry ultra-structure Reactions**. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.
- GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T. do., SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p.1500-1503, 2009.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, 2006.
- 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
- HSU, T. A., LADISCH, M. R., TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v. 10, n.5, p. 315–319, 1980.

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

LOPES, E. S. **Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído**. 2015. 210f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2015.

LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n.58, p.741– 761, 1996.

MACHADO, D. L. **Estudo da adsorção das enzimas do complexo celulolítico em bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e avicel**. 2013. 153. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2013.

MALDONADI, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método DNS**. Brasília: EMBRAPA, 2013.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.426–432, 2007

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

MOUTTA, R. O. et al. Comparative response and structural characterization of sugarcane bagasse, straw and bagasse-straw 1:1 mixtures subjected to hydrothermal pretreatment and enzymatic conversion. **Microbial & Biochemical Technology**, v. 5, S12:005, 2013a.

MOUTTA, R. O.; LEITÃO, V. S. F.; BON, E. B. da S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n.1, p. 93-100, 2013b.

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

MUSSATO, S. I. e al. Technological trends, global Market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnol.Adv.**, v. 28, p. 817-830, 2010.

NAKASU, P. Y. S. **Cinética da hidrólise ácida do licor obtido após pré-tratamento hidrotérmico**. 2015. 176f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2015.

OVEREND, R.P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, n. 1561, p. 523-536,1987.

- PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. 2015. 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFScar, São Carlos, 2015.
- PRATTO, B. et al. Estudo cinético da etapa de hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar: efeito da velocidade de agitação e da concentração de substrato. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, Blucher, 2014.
- PUTRINO, F. M. **Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir da casca de coco verde utilizando CO₂ supercrítico**. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, USP, Pirassununga, 2016.
- RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2007.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, UNICAMP, 2010.
- RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. **Saúde Soc**, v. 19, n. 1, p. 48-63, 2010.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2009.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SCHELL, D. J. et al. Dilute-Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105- 108, p. 69-85, 2003.
- SCHULTZ, E. L. et al. Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de açúcares fermentescíveis. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20, 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, Blucher, 2014.
- SIQUEIRA, G. A. **Efeito da lignina de bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose**. 2015. 141f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2015.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 1-8, 2005a.

- SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 1-12, 2005b.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 1-12, 2005c.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 1-16, 2008d.
- SOUSA, V. M. Z. **Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico**. 2014. 44f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Energia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- TOVAR, L. P. et al. Prediction of overall glucose yield in hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using a single artificial neural network: good insight for process development. **Journal of Chemical and Biotechnology**, doi:10.1002/jctb.5456, 2017.
- VANELLI, B. A. **Aplicação de líquido iônico e etanol em CO₂ supercrítico para o pré-tratamento e hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. 2014. 116f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2014.
- WYMAN, C.E.; BRETHAUER, S. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n.13, p.4862- 4874, 2009.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioprod. Biorefin.**, v. 6, p. 465-482, 2012.