

**SOLANGE MARIA DE VASCONCELOS**

**PRÉ-TRATAMENTOS HIDROTÉRMICO E COM ÁCIDO  
FOSFÓRICO DILUÍDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA  
APLICAÇÃO EM BIORREFINARIAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Souto-Maior

Co-orientador: Prof. George J. Moraes Rocha

Recife  
2012

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Marcos Aurélio Soares da Silva, CRB-4 / 1175

V331p Vasconcelos, Solange Maria de.  
Pré-tratamentos hidrotérmico e com ácido fosfórico diluído de  
bagaço de cana-de-açúcar para aplicação em biorrefinarias /  
Solange Maria de Vasconcelos. - Recife: O Autor, 2012.  
187 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Souto-Maior.  
Co-Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. George J. Moraes Rocha.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.  
Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Química. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Ácido  
Diluído. 4. Hidrotérmico. 5. Hidrólise Enzimática. I. Souto-Maior,  
Ana Maria (orientadora). II. Título.

660.2 CDD (22. ed.)

UFPE  
BCTG/2013 - 057

**SOLANGE MARIA DE VASCONCELOS**

**PRÉ-TRATAMENTOS HIDROTÉRMICO E COM ÁCIDO  
FOSFÓRICO DILUÍDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
PARA APLICAÇÃO EM BIORREFINARIAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 21 de dezembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Souto-Maior – Antibióticos/UFPE

---

Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho – DEQ/UFPE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ester Ribeiro Gouveia – Antibióticos/UFPE

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gorete Ribeiro de Macedo – DEQ/UFRN

---

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro – DCF/UPE

*Aos meus pais Gabriel e Luzia,*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar saúde e forças para a execução dos meus projetos ao longo da vida.

Aos meus pais, Gabriel e Luzia, pela educação e por tudo que me proporcionaram ao longo de minha vida; e aos meus irmãos Vera, Bete, Daniel e Bel, pelo incentivo, confiança e amizade.

Ao meu namorado, por sua presença constante, incentivo, carinho e compreensão.

À professora Ana Maria Souto-Maior pelas orientações, confiança e apoio concedidos para o desenvolvimento desta tese.

Ao professor George Jackson, por todo o apoio e pelas grandes contribuições dadas para a realização deste trabalho, mostrando-se incansável e sempre pronto a ajudar.

A todos os colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos (aos que passaram e aos atuais), com os quais tive a felicidade de conviver e pude contar com a ajuda diversas vezes, seja no desenvolvimento do trabalho e até mesmo com palavras amigas.

De forma especial e carinhosa, agradeço a Lia Pinheiro que diversas vezes me ouviu e me ajudou; Márcia Josefa e Grasielly Karine. A ajuda de vocês foi de fundamental importância para tornar possível esta tese;  *muito obrigada!*

Aos colegas do Doutorado, em especial a Andréa Galindo (amiga de longas datas), Aleks, Espedito, Flávia, Isaias e Leonardo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFPE e à Capes pela bolsa concedida.

À Usina Central Olho D'água por ceder todo o bagaço utilizado neste estudo.

À Novozymes Latin America Ltda. por ceder gentilmente as enzimas utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFRJ, que cedeu o micro-organismo *Trichoderma reesei* RUT C30.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais–CNPEM) e a Sidnei Ramis, por todo o apoio prestado na realização das análises de MEV.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena, e ao professor Paulo Suzuki, pela colaboração prestada nas análises de DRX.

A Cibele Rosa e ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pela realização das análises de FTIR.

E enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Devido à natureza recalcitrante da biomassa, uma etapa normalmente essencial em uma biorrefinaria lignocelulósica, por rota bioquímica, é o pré-tratamento da matéria-prima. O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com ácido fosfórico diluído de forma a encontrar as melhores condições em termos de solubilização de hemicelulose o que, por sua vez, facilita o acesso das enzimas à celulose, na etapa de hidrólise enzimática. Melhores condições de tratamento ácido foram comparadas com tratamento hidrotérmico. Realizou-se, também, a produção de enzimas celulolíticas através da utilização do micro-organismo *Trichoderma reesei* RUT C30 e hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados em diferentes condições, com as enzimas produzidas no laboratório e com enzimas comerciais (Celluclast® 1,5 L e Novozym® 188). Por fim, foi verificada a fermentabilidade do hidrolisado enzimático que apresentou o melhor resultado em termos de conversão de celulose em glicose. Na primeira etapa, o pré-tratamento foi realizado de acordo com um planejamento experimental  $2^3$ , cujas variáveis estudadas foram: tempo (8–24 minutos), temperatura (144–186 °C) e concentração de ácido fosfórico (0,05–0,20%, m/v). Pré-tratamentos adicionais foram realizados, a 186 °C e 195 °C, na ausência e na presença de ácido fosfórico (1%, m/v), por 8 minutos. Todos os pré-tratamentos foram realizados em um reator batelada de 20 L (Regmed AU/E-20), com volume de trabalho de 10 L e carga de sólidos de 5% (m/v). A eficiência dos pré-tratamentos foi verificada através da comparação de análises físico-químicas dos bagaços *in natura* e pré-tratados e da conversão de celulose em glicose por hidrólise enzimática. As hidrólises foram realizadas a 50 °C e pH 4,8. A produção de enzimas se deu em meio de lactose (10 g/L) solubilizado em hidrolisado hemicelulósico, sendo conduzida em biorreator de bancada com volume útil de 2 L, agitação de 500 rpm, aeração de 2 vvm, temperatura de 28 °C, pH 5,0, durante 48 horas. A fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático foi realizada em biorreator de bancada, com volume útil de 1 L, a 35 °C, pH 4,8, 300 rpm, utilizando-se a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* UPEDEA 1238. Em relação ao planejamento experimental, os pré-tratamentos com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20% a 186 °C, durante 8 e 24 minutos, mostraram-se eficientes na remoção de hemicelulose, alcançando solubilizações de 96% e 98%, respectivamente. Modelos, preditivos e significativos, foram obtidos para as concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, na fração sólida de bagaço, assim como para a hemicelulose solubilizada. Nos pré-tratamentos adicionais, as maiores solubilizações de hemicelulose foram de 97% e 98%, para os bagaços pré-tratados a 186 °C e 195 °C, com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% (m/v), respectivamente. A enzima produzida no laboratório apresentou-se eficiente na hidrólise dos bagaços pré-tratados, quando comparada às enzimas comerciais. Para ambos os tipos de enzimas, as maiores conversões de celulose em glicose foram obtidas a partir dos bagaços pré-tratados nas condições mais drásticas.

**Palavras-chave:** Bagaço de cana-de-açúcar; Pré-tratamento ácido diluído; Pré-tratamento hidrotérmico; Hidrólise enzimática; Fermentação.

## ABSTRACT

Due to biomass recalcitrance to deconstruction, feedstock pre-treatment is usually an essential step in lignocellulosic biorefineries based on biochemical conversion technology. The aim of this work was the investigation of the pre-treatment of sugarcane bagasse with dilute phosphoric acid to find best conditions for hemicellulose solubilisation that, consequently, facilitates cellulose-degrading enzymes access to cellulose during the enzymatic hydrolysis step. Best conditions of diluted acid pre-treatment were then compared to hydrothermal pre-treatments. Enzymes production was carried out using *Trichoderma reesei* RUT C30 and the enzymatic hydrolysis of the pre-treated bagasse was performed using the enzymes produced in the laboratory and commercial enzymes (Celluclast® 1,5 L and Novozym® 188). Finally, the fermentability of the enzymatic hydrolysate that presented the highest cellulose-to-glucose conversion was investigated. Pre-treatments were carried out according to a factorial design 2<sup>3</sup>, with the following variables: time (8–24 minutes), temperature (144–186 °C) and phosphoric acid concentration (0.05–0.20%, w/v). Additional pre-treatments were carried out with and without phosphoric acid (1%, w/v), at 186 °C and 195 °C, for 8 minutes. All pre-treatments were performed in a 20 L batch reactor (Regmed AU/E-20), with 10 L working volume and 5% (w/v) solids loading. Efficiency of the pre-treatments was verified through physical-chemical analyses of treated and non-treated bagasse and through enzymatic conversion of cellulose to glucose. Hydrolysis was carried out at 50 °C and pH 4.8. Enzyme production was performed in a 2 L working-volume bioreactor, with 500 rpm agitation, 2 vvm aeration, 28 °C, pH 5.0, for 48 hours, on medium consisting of lactose (10 g/L) solubilised in hemicellulose hydrolysate. Alcoholic fermentation was performed in a 1 L working-volume bioreactor using *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. In relation to the experimental design, pre-treatments with with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.20% at 186 °C, during 8 and 24 minutes, were efficient in removing hemicellulose, reaching solubilisation of 96% and 98%, respectively. Predictive and significant models were obtained for the concentrations of cellulose, hemicellulose and lignin in the solid fraction of the treated bagasse, as well as for the solubilised hemicellulose. In the additional pre-treatments, the higher hemicellulose solubilisation were 97% and 98%, for bagasse pre-treated at 186 °C and 195 °C, with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% (w/v), respectively. Enzymes produced in the laboratory were efficient in hydrolyzing the pre-treated bagasse when compared to commercial enzymes. For both enzymes, the highest conversions of cellulose were achieved under the most drastic conditions.

**Palavras-chave:** Sugarcane bagasse; Diluted acid pretreatment; Hydrothermal pretreatment; Enzymatic hydrolysis; Fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b>	Tecnologias para utilização de biomassa renovável.....	25
<b>Figura 2.2</b>	Produção brasileira de cana-de-açúcar.....	26
<b>Figura 2.3</b>	Ilustração esquemática de biomassa lignocelulósica.....	28
<b>Figura 2.4</b>	Estrutura de um fragmento de celulose.....	29
<b>Figura 2.5</b>	Esquema da estrutura básica de hemicelulose.....	30
<b>Figura 2.6</b>	Unidades fenilpropano precursoras da lignina.....	30
<b>Figura 2.7</b>	Diagrama esquemático dos objetivos de pré-tratamento aplicado a biomassa lignocelulósica.....	32
<b>Figura 2.8</b>	Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos.....	40
<b>Figura 2.9</b>	Representação esquemática da hidrólise de celulose amorfa e microcristalina.....	43
<b>Figura 2.10</b>	Configurações de processos para a produção de etanol lignocelulósico	49
<b>Figura 3.1</b>	Reator de 20 L (Regmed, AU/E-20), utilizado nos experimentos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar.....	54
<b>Figura 3.2</b>	Procedimento de análise empregado para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.....	55
<b>Figura 3.3</b>	Esquema de extração com aparelho Soxhlet.....	56
<b>Figura 3.4</b>	Representação de um difratograma de raios-X tipicamente obtido para amostras de celulose, bem como a identificação dos diferentes sinais de acordo com os índices de Miller.....	61
<b>Figura 3.5</b>	Parâmetros do cristalito que podem ser obtidos através dos dados obtidos para os difratogramas das amostras de celulose.....	62
<b>Figura 3.6</b>	Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado na produção das enzimas.....	66
<b>Figura 3.7</b>	Hidrólise enzimática realizada em minirreatores encamisados.....	72
<b>Figura 3.8</b>	Hidrólise enzimática realizada em frasco Erlenmeyer (250 mL) em mesa agitadora (New Brunswick Scientific, modelo C25KC).....	74

<b>Figura 4.1</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de celulose ( $C\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).....	87
<b>Figura 4.2</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de hemicelulose ( $H\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).....	89
<b>Figura 4.3</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de lignina ( $L\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).....	91
<b>Figura 4.4</b>	Superfícies de resposta e curvas de contorno para a hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) a partir da fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).....	93
<b>Figura 4.5</b>	Micrografia da fibra de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	98
<b>Figura 4.6</b>	Micrografia do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado: (a) Ensaio 03; (b) Ensaio 04; (c) Ensaio 07; e (d) Ensaio 08.....	98
<b>Figura 4.7</b>	Difratogramas de raios-X para o bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado. Condições de pré-tratamento: Ensaio 01 (8 min; 144 °C; $H_3PO_4$ 0,05%); Ensaio 03 (8 min; 186 °C; $H_3PO_4$ 0,05%); Ensaio 07 (8 min; 186 °C; $H_3PO_4$ 0,20%).....	99
<b>Figura 4.8</b>	Espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier do bagaço cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado. Condições de pré-tratamento: Ensaio 01 (8 min; 144 °C; $H_3PO_4$ 0,05%); Ensaio 03 (8 min; 186 °C; $H_3PO_4$ 0,05%); Ensaio 07 (8 min; 186 °C; $H_3PO_4$ 0,20%).....	103

<b>Figura 4.9</b>	Perfis de lactose e concentração celular durante o processo de produção de enzimas por <i>T. reesei</i> RUT C30.....	111
<b>Figura 4.10</b>	Perfis de atividade de FPase, $\beta$ -glicosidase, CMCase e xilanase produzidas por <i>T reesei</i> RUT C30 em meio de lactose e hidrolisado hemicelulósico.....	112
<b>Figura 4.11</b>	Perfis de concentrações de celobiose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	113
<b>Figura 4.12</b>	Perfis de concentrações de glicose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado em diferentes condições, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	115
<b>Figura 4.13</b>	Perfis de concentrações de xilose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	116
<b>Figura 4.14</b>	Conversões de celulose em glicose obtidas por hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	117
<b>Figura 4.15</b>	Perfis de concentrações de celobiose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaços de cana pré-tratados de acordo com condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	118
<b>Figura 4.16</b>	Concentrações de glicose liberadas na hidrólise enzimática de bagaços de cana pré-tratados de acordo com as condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	119
<b>Figura 4.17</b>	Perfis de concentrações de xilose liberadas na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado de acordo com as condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.....	120

<b>Figura 4.18</b>	Conversão de celulose em glicose, obtida na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188) e enzimas produzidas no laboratório. Hidrólise realizada em frascos agitados durante 72 horas..	124
<b>Figura 4.19</b>	Perfis de concentrações de celobiose, glicose e xilose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório. Cb: Celobiose; Gli: Glicose; Xl: Xilose.....	125
<b>Figura 4.20</b>	Conversão de celulose em glicose, obtida na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.....	126
<b>Figura 4.21</b>	Perfis de concentrações dos componentes celobiose, glicose e xilose, obtidas durante o processo de hidrólise enzimática realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific). Condições operacionais: 50 °C, pH 4,8 e agitação de 300 rpm.....	127
<b>Figura 4.22</b>	Perfil de conversão enzimática de celulose em glicose durante o processo de hidrólise realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific).....	128
<b>Figura 4.23</b>	Perfis de concentrações de glicose e etanol, obtidos durante o processo de fermentação alcoólica de hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado. Fermentação realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific).....	129

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	52
<b>Tabela 3.2</b>	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ .....	52
<b>Tabela 3.3</b>	Fatores de conversão dos componentes precursores de celulose (C) e hemicelulose (H).....	59
<b>Tabela 3.4</b>	Condições experimentais aplicadas aos pré-tratamentos (hidrotérmico e ácido) de bagaço de cana-de-açúcar.....	63
<b>Tabela 3.5</b>	Composição do meio BDA.....	64
<b>Tabela 3.6</b>	Composição do meio de produção de enzimas.....	65
<b>Tabela 3.7</b>	Composição do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar.....	65
<b>Tabela 4.1</b>	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	79
<b>Tabela 4.2</b>	Composição química (m/m) da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada em diferentes condições.....	80
<b>Tabela 4.3</b>	Rendimento da fração sólida e solubilização dos componentes macromoleculares de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.....	82
<b>Tabela 4.4</b>	Composição química (m/m) e solubilização dos componentes macromoleculares (m/m) da fração sólida de bagaço após pré-tratamento com ácido diluído e hidrotérmico, em um reator batelada de 20L.....	84
<b>Tabela 4.5</b>	ANOVA para a resposta concentração de celulose ( $C\%$ ) na fração sólida de bagaço.....	86
<b>Tabela 4.6</b>	ANOVA para a resposta concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço.....	88
<b>Tabela 4.7</b>	ANOVA para a resposta concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço.....	90
<b>Tabela 4.8</b>	ANOVA para a resposta teor de hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) a partir da fração sólida de bagaço de cana pré-tratado.....	92
<b>Tabela 4.9</b>	Composição química dos hidrolisados ácidos obtidos após cada ensaio de pré-tratamento.....	96
<b>Tabela 4.10</b>	Valores de largura a meia altura ( $w_1$ ) e de $2\theta$ na intensidade máxima ( $x_1$ ) obtidos pelo ajuste de acordo com a distribuição gaussiana para o primeiro pico ( $hkl = 1\bar{1}0/110$ ), bem como o valor de $L_{1\bar{1}0/110}$ calculado.....	101

<b>Tabela 4.11</b>	Valores de largura a meia altura ( $w_2$ ) e de $2\theta$ na intensidade máxima ( $x_2$ ) obtidos pelo ajuste de acordo com a distribuição gaussiana para o segundo pico ( $hkl = 200$ ), bem como o valor de $L_{200}$ calculado.....	101
<b>Tabela 4.12</b>	Picos de absorção detectados e seus correspondentes grupos funcionais.....	103
<b>Tabela 4.13</b>	Composição química de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> utilizado nos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico e com ácido mais concentrado.....	104
<b>Tabela 4.14</b>	Composição química (m/m) de bagaço pré-tratado em diferentes condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.....	105
<b>Tabela 4.15</b>	Rendimento da fração insolúvel e solubilização de celulose, hemicelulose e lignina de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamentos hidrotérmico e ácido.....	107
<b>Tabela 4.16</b>	Composição química dos hidrolisados obtidos nos pré-tratamentos hidrotérmico e ácido de bagaço de cana-de-açúcar.....	109
<b>Tabela 4.17</b>	Conversão enzimática de celulose em glicose obtida por hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.....	121
<b>Tabela 4.18</b>	Concentrações de glicose e xilose durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em frascos agitados, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188). .....	122
<b>Tabela 4.19</b>	Concentrações de celobiose, glicose e xilose durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em frascos agitados, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcA	Ácido Acético
AcF	Ácido Fórmico
AFEX	Explosão da fibra por amônia ( <i>Ammonia fiber explosion</i> )
Ara	Arabinose
BDA	Batata dextrose agar
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
Cb	Celobiose
CBP	Bioprocesso consolidado ( <i>Consolidated bioprocessing</i> )
C (%)	Concentração de celulose
CC (%)	Conversão enzimática de celulose em glicose
C <sub>S</sub> (%)	Celulose solubilizada
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de endoglucanases sobre CMC
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DNSA	Ácido 3,5-dinitro salicílico
DRX	Difratometria de raios-X
FPase	Atividade de celulase total sobre papel de filtro ( <i>Filter paper activity</i> )
FPU	Unidade de papel de filtro ( <i>Filter paper unit</i> )
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
Fur	Furfural
Gli	Glicose

$H$ (%)	Concentração de hemicelulose
HMF	Hidroximetilfurfural
$H_S$ (%)	Hemicelulose solubilizada
LHW	Água quente líquida ( <i>Liquid hot water</i> )
$L$ (%)	Concentração de lignina
Lig	Lignina
$L_S$ (%)	Lignina solubilizada
m/m	massa por massa
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
m/v	massa por volume
$P$ (g/L)	Concentração de produto
$Q_P$ (g/L/h)	Produtividade de etanol
$R^2$	Coefficiente de determinação ou explicação
rpm	Rotações por minuto
$S$ (g/L)	Concentração de substrato
$S_{cm}$ (%)	Solubilização do componente macromolecular
SHCF	Hidrólise em separado e co-fermentação ( <i>separate hydrolysis and co-fermentation</i> )
SHF	Hidrólise e fermentação em separado ( <i>separate hydrolysis and fermentation</i> )
SSCF	Sacarificação com co-fermentação simultâneas ( <i>simultaneous saccharification and co-fermentation</i> )
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas ( <i>simultaneous saccharification and fermentation</i> )
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

UI	Unidade internacional
v/v	volume por volume
$X_1$	Variável codificada referente ao tempo
$X_2$	Variável codificada referente à temperatura
$X_3$	Variável codificada referente à concentração de ácido fosfórico
$X_i$ (%)	Componente macromolecular no bagaço de cana <i>in natura</i>
$X_f$ (%)	Componente macromolecular no bagaço de cana pré-tratado
Xl	Xilose
$Y$ (%)	Rendimento da fração sólida de bagaço
$Y_{P/S}$ (g/g)	Rendimento de produto em substrato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
2.1	BIORREFINARIA.....	25
<b>2.1.1</b>	<b>Produção de etanol combustível.....</b>	<b>26</b>
2.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	28
<b>2.2.1</b>	<b>Celulose.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Hemicelulose.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Lignina.....</b>	<b>30</b>
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	31
<b>2.3.1</b>	<b>Pré-tratamentos físicos.....</b>	<b>32</b>
2.3.1.1	<i>Pré-tratamento mecânico.....</i>	32
2.3.1.2	<i>Micro-ondas e irradiação por feixe de elétrons.....</i>	33
<b>2.3.2</b>	<b>Pré-tratamentos físico-químicos.....</b>	<b>33</b>
2.3.2.1	<i>Explosão a vapor (autohidrólise).....</i>	33
2.3.2.2	<i>Explosão da fibra por amônia (ammonia fiber explosion–AFEX).....</i>	35
2.3.2.3	<i>Água líquida quente (liquid hot water–LHW).....</i>	36
<b>2.3.3</b>	<b>Pré-tratamento químico.....</b>	<b>37</b>
2.3.3.1	<i>Ozonólise.....</i>	37
2.3.3.2	<i>Pré-tratamento alcalino.....</i>	38
2.3.3.3	<i>Oxidação úmida.....</i>	38
2.3.3.4	<i>Pré-tratamento organossolve.....</i>	39
2.3.3.5	<i>Pré-tratamento ácido.....</i>	39
2.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	42
2.5	PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	45
<b>2.5.1</b>	<b>Micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo <i>T. reesei</i> RUT C30.....</b>	<b>45</b>
2.6	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	47
2.7	CONFIGURAÇÕES DE PROCESSOS.....	47

<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
3.1	BIOMASSA.....	51
3.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
<b>3.2.1</b>	<b>Pré-tratamento.....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Caracterização de bagaço de cana-de-açúcar.....</b>	<b>55</b>
3.2.2.1	<i>Determinação do peso seco de bagaço de cana-de-açúcar.....</i>	56
3.2.2.2	<i>Análise de extrativos.....</i>	56
3.2.2.3	<i>Hidrólise de bagaço com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%.....</i>	56
3.2.2.4	<i>Determinação do teor de lignina solúvel.....</i>	57
3.2.2.5	<i>Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.....</i>	57
3.2.2.6	<i>Determinação do teor de cinzas da lignina.....</i>	58
3.2.2.7	<i>Determinação do teor de cinzas totais.....</i>	58
3.2.2.8	<i>Quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação.....</i>	58
3.2.2.9	<i>Análise química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado).....</i>	59
<b>3.2.3</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Difratometria de raios-X (DRX).....</b>	<b>60</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).</b>	<b>62</b>
3.3	PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E COM ÁCIDO MAIS CONCENTRADO.....	63
3.4	PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	64
3.4.1	<b>Determinação das atividades enzimáticas.....</b>	<b>67</b>
3.4.1.1	<i>Atividade em papel de filtro.....</i>	67
3.4.1.2	<i>Atividade em carboximetilcelulose (CMCase).....</i>	69
3.4.1.3	<i>Atividade de β-glicosidase.....</i>	69
3.4.1.4	<i>Atividade de xilanase.....</i>	70
3.5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO.....	71
<b>3.5.1</b>	<b>Estudo da cinética enzimática.....</b>	<b>71</b>
3.5.1.1	<i>Hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado sob condições do planejamento experimental.....</i>	71

3.5.1.2	<i>Hidrólise de bagaço pré-tratado sob condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.....</i>	73
<b>3.5.2</b>	<b>Comparação de hidrólise enzimática realizada com enzimas comerciais e com enzimas produzidas no laboratório.....</b>	73
<b>3.5.3</b>	<b>Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica em biorreator.....</b>	74
3.5.3.1	<i>Hidrólise enzimática.....</i>	74
3.5.3.2	<i>Fermentação alcoólica.....</i>	75
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	78
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO DE ACORDO COM APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	78
4.1.1	Caracterização química da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar...	78
4.1.2	Solubilização dos componentes de bagaço de cana-de-açúcar determinada a partir da caracterização química da fração sólida.....	81
4.1.3	Análise estatística do planejamento experimental.....	84
4.1.3.1	<i>Concentração de celulose (C%) na fração sólida de bagaço .....</i>	85
4.1.3.2	<i>Concentração de hemicelulose (H%) na fração sólida de bagaço.....</i>	87
4.1.3.3	<i>Concentração de lignina (L%) na fração sólida de bagaço .....</i>	89
4.1.3.4	<i>Teor de solubilização dos componentes macromoleculares.....</i>	91
4.1.4	Caracterização química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado).....	95
4.1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	97
4.1.6	Difratometria de raios-X (DRX).....	99
4.1.7	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	101
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO HIDROTERMICAMENTE COM ÁCIDO MAIS CONCENTRADO.....	104
4.2.1	Caracterização química da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar...	104
4.2.2	Solubilização dos componentes macromoleculares de bagaço de cana-de-açúcar.....	107

<b>4.2.3</b>	<b>Caracterização química dos hidrolisados obtidos no pré-tratamento.....</b>	<b>108</b>
4.3	PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	110
4.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	112
<b>4.4.1</b>	<b>Estudo da cinética enzimática.....</b>	<b>112</b>
4.4.1.1	<i>Hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado sob condições do planejamento experimental.....</i>	112
4.4.1.2	<i>Hidrólise de bagaço pré-tratado sob condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.....</i>	117
4.4.2	<b>Comparação de hidrólise enzimática realizada com enzimas comerciais e com enzimas produzidas no laboratório .....</b>	<b>121</b>
4.4.3	<b>Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica em biorreator.....</b>	<b>127</b>
4.4.3.1	<i>Hidrólise enzimática.....</i>	127
4.4.3.2	<i>Fermentação alcoólica.....</i>	129
<b>5</b>	<b>RESUMO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>135</b>
	<b>SUGESTÕES.....</b>	<b>136</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>138</b>
	<b>APÊNDICE A – Rampas características de aquecimento do reator de 20 L (Regmed, AU/E-20).....</b>	<b>146</b>
	<b>APÊNDICE B – Difractometria de raios-X.....</b>	<b>149</b>
	<b>APÊNDICE C – Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar.....</b>	<b>154</b>
	<b>APÊNDICE D – Análise estatística.....</b>	<b>162</b>
	<b>APÊNDICE E – Produção de enzimas.....</b>	<b>168</b>
	<b>APÊNDICE F – Hidrólise enzimática.....</b>	<b>170</b>
	<b>APÊNDICE G – Fermentação alcoólica.....</b>	<b>183</b>
	<b>APÊNDICE H – Cromatograma–curva padrão.....</b>	<b>185</b>
	<b>APÊNDICE I – Artigo publicado.....</b>	<b>187</b>

---

# *CAPÍTULO 1*

---

## 1. INTRODUÇÃO

*O presente capítulo faz uma introdução geral sobre os temas abordados nesta Tese. Destaca o conceito de biorrefinaria e a importância do Brasil neste cenário, dando ênfase à produção de etanol de segunda geração. Faz uma descrição sobre a estrutura dos materiais lignocelulósicos e a importância da realização de uma etapa de pré-tratamento sobre os mesmos. Por fim, são apresentados os objetivos deste trabalho.*

A economia mundial atual é altamente dependente de várias fontes de energias fósseis, as quais estão sendo utilizadas para a produção de eletricidade, combustível e outros bens. Neste caso, destaca-se o setor de transportes, que em todo o mundo é quase totalmente dependente de combustíveis derivados do petróleo (BALAT, 2011; SARKAR *et al.*, 2012). Esses fatores vêm levando a grandes expectativas com relação à diminuição das reservas de petróleo, aliadas às crescentes preocupações com a preservação ambiental, o que exige soluções tecnológicas às necessidades de consumo. Assim, tem se verificado um interesse crescente nas biomassas, como fontes de matérias-primas para a produção de energias alternativas, uma vez que suas composições apresentam um elevado potencial tecnológico. Diante destes fatos, o conceito de biorrefinaria desponta como aposta promissora, uma vez que tem como base a integração de processos para a produção de energia, de combustíveis - destacando-se neste caso o etanol de segunda geração - e de uma ampla variedade de produtos químicos de altos valores agregados, a partir do aproveitamento integral de biomassas renováveis (CGEE, 2010).

O Brasil encontra-se em posição bastante privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral de biomassas, devido ao fato de ser um dos maiores produtores de matérias-primas renováveis do planeta, com destaque para a cultura de cana-de-açúcar, o qual se apresenta como maior produtor mundial, alcançando uma produção de 571,4 milhões de toneladas na safra de 2011/2012 e com uma previsão de 602,2 milhões de toneladas na safra de 2012/2013 (CONAB, 2012).

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas. É composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana. No entanto, apenas a sacarose que representa de 10

– 17% da biomassa de cana e está presente no caldo que corresponde a aproximadamente um terço da biomassa da cana-de-açúcar, é utilizada para a produção de açúcar e etanol. Os outros dois terços representam o bagaço, subproduto obtido após o processo de moagem dos colmos para a extração do caldo rico em sacarose, e a palha. A quantidade de bagaço obtida por tonelada de cana varia de 240 a 280 kg (com 50% de umidade), representando o principal material lignocelulósico gerado no Brasil, composto principalmente por carboidratos (BNDES; CGEE, 2008; CGEE, 2009).

Matérias-primas sacarinas ou a base de amido são bastante utilizadas para a produção de etanol de primeira geração por diversos países, como é o caso da União Europeia, que utiliza o trigo e a beterraba sacarina, os Estados Unidos, que utilizam o milho, e o Canadá e a China, que utilizam duas matérias-primas, o milho e o trigo. Diante desse cenário, a utilização de biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol de segunda geração poderá ser preferível sobre a produção de etanol à base das matérias-primas citadas, uma vez que, apresentam uma concorrência limitada com a produção de alimentos além de menor desmatamento (BALAT, 2011; DIAS *et al.*, 2011). No caso do Brasil, a implantação da tecnologia de etanol de segunda geração é favorecida porque o processo de produção pode ser anexado às unidades de açúcar/etanol já existentes, o que exige investimentos mais baixos em infra-estrutura, logística e fornecimento de energia, além de o bagaço ser gerado nas unidades industriais, o que livra os custos com transporte (SOCCOL *et al.*, 2010).

A biomassa lignocelulósica apresenta uma estrutura complexa, sendo constituída, principalmente, por três frações orgânicas: celulose (35–50%), hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%), além de pequenas quantidades de minerais (cinzas) e extrativos. As cadeias de celulose são unidas por ligações de hidrogênio, denominadas microfibrilas, as quais são presas umas as outras por hemicelulose, e recobertas por lignina. Essas microfibrilas estão frequentemente associadas sob a forma de macrofibrilas. Devido a esta complexidade, o pré-tratamento destes materiais lignocelulósicos é normalmente necessário antes da hidrólise enzimática e fermentação a etanol (HIMMEL, 2008; OJEDA *et al.*, 2011; SOCCOL *et al.*, 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O pré-tratamento é principalmente destinado à desorganização do complexo lignocelulósico, através da redução do teor de lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade, provocando assim, a abertura da estrutura da parede celular de lignocelulose, de forma a promover uma maior

digestibilidade da fração de celulose na etapa de hidrólise enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). O pré-tratamento pode ser realizado por meios físicos, físico-químicos ou químicos (AGBOR *et al.*, 2011; ALVIRA *et al.*, 2010). O pré-tratamento com ácido diluído é um dos métodos químicos mais utilizados, cujo objetivo principal consiste em solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática. Dependendo do substrato e das condições aplicadas, de 80 a 95% dos açúcares hemicelulósicos podem ser recuperados a partir da matéria-prima lignocelulósica pelo pré-tratamento ácido diluído (BALAT *et al.*, 2008).

A utilização de ácido fosfórico diluído para o pré-tratamento químico de diferentes biomassas foi investigada (GÁMEZ *et al.*, 2004, 2006; UM *et al.*, 2003; VÁZQUEZ *et al.*, 2007). Esses estudos demonstraram que os pré-tratamentos realizados a temperaturas baixas e tempos de residência longos podem ser eficazes utilizando concentrações de ácido fosfórico relativamente elevadas (2-6%). No entanto, o ácido fosfórico é mais caro que o ácido sulfúrico, que é o mais barato e é o catalisador ácido mais amplamente estudado. Recentemente, o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor associada ao ácido fosfórico diluído foi investigado em menores tempos de residência e temperaturas mais elevadas, e apresentou-se como um método eficaz para hidrolisar hemiceluloses (GEDDES *et al.*, 2010).

Sendo assim, no propósito de melhorar o aproveitamento da biomassa de cana-de-açúcar, este trabalho teve como principal objetivo realizar um estudo para determinar as melhores condições de pré-tratamento com ácido fosfórico diluído aplicado ao bagaço de cana. Foram utilizadas concentrações de ácido em níveis adequados para a fermentação microbiana do hidrolisado hemicelulósico. Um planejamento experimental foi aplicado para avaliar os efeitos do tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico sobre os pré-tratamentos, sendo a eficiência destes verificada através de análises físico-químicas dos bagaços *in natura* e pré-tratados, e através da conversão de celulose em glicose, do bagaço pré-tratado em diferentes condições, por hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas comerciais e produzidas em laboratório.

---

## ***CAPÍTULO 2***

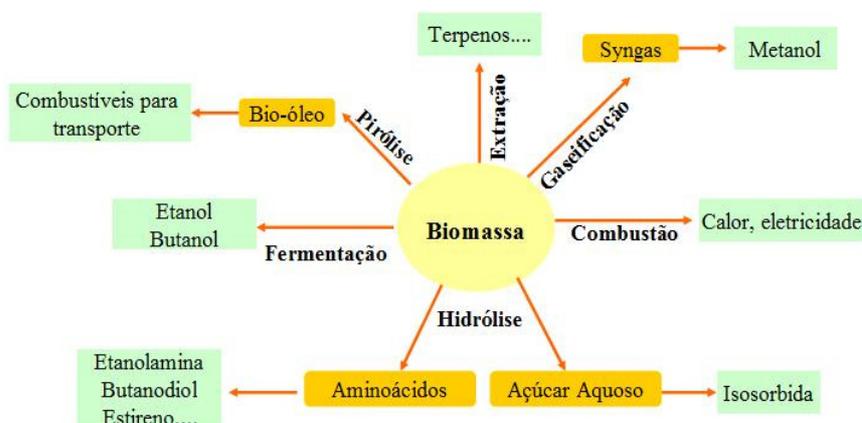
---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O capítulo 2 faz uma ampla revisão, incluindo o conceito de biorrefinaria com destaque para a indústria do etanol e a sua importância no cenário brasileiro. Destaca-se ainda, os diferentes tipos de pré-tratamentos aplicados à biomassa lignocelulósica, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, a produção de enzimas celulolíticas, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica. As configurações sugeridas para a integração das diferentes etapas de processos, objetivando a produção de etanol de segunda geração, também são enfatizadas.

### 2.1 BIORREFINARIA

O conceito de biorrefinaria corresponde à integração de processos e equipamentos na conversão de biomassa para a produção de energia, combustível e produtos químicos. Em essência, a biorrefinaria moderna se assemelha à refinaria de petróleo: uma matéria-prima abundante que consiste principalmente de polissacarídeos renováveis e lignina entra na biorrefinaria e através de uma matriz de processos, é fracionada e convertida em uma mistura de produtos, incluindo produtos químicos importantes, como, por exemplo, polímeros, produtos farmacêuticos, bem como energia e combustíveis líquidos, tais como etanol (ALVARADO-MORALES *et al.*, 2009; RAGAUSKAS *et al.*, 2006). A Figura 2.1 mostra as várias tecnologias potenciais para a utilização de biomassa como matéria-prima para diversos produtos.

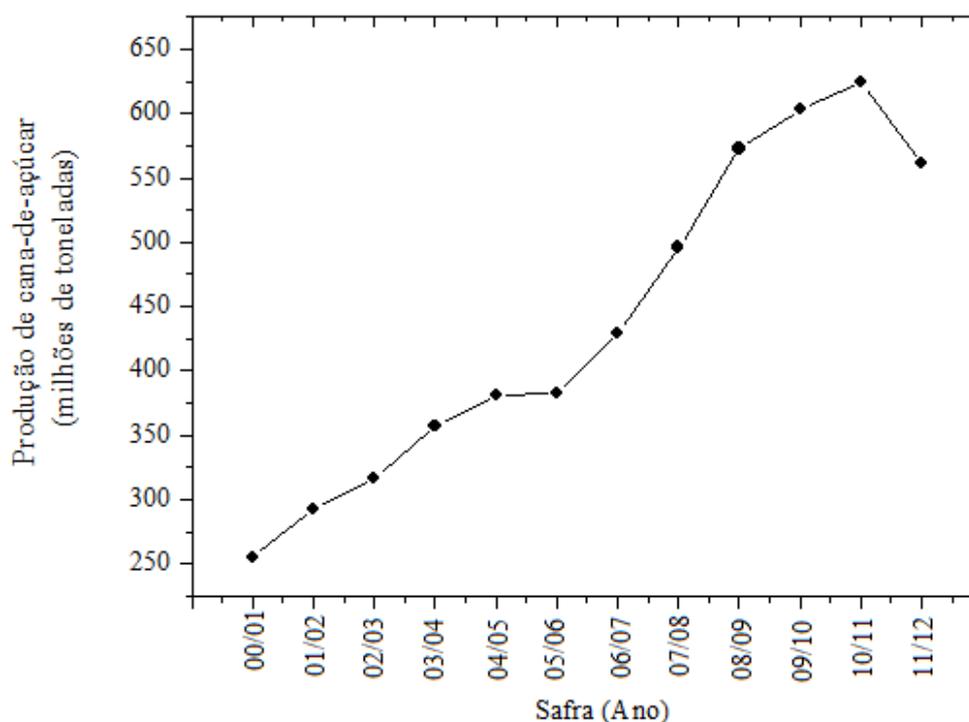


**Figura 2.1** - Tecnologias para utilização de biomassa renovável. (Adaptado de SANDERS *et al.*, 2012).

### 2.1.1 Produção de etanol combustível

Entre os produtos que podem ser obtidos através da biorrefinaria, o etanol combustível é o exemplo bem conhecido (ALVARADO-MORALES *et al.*, 2009), sendo que a sua produção vem aumentando nos últimos anos, destacando-se como maiores produtores mundiais, os Estados Unidos, a partir do milho, e o Brasil, a partir da cana-de-açúcar (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

O Brasil encontra-se em situação bastante favorável quanto à produção de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial, seguido pela Índia e China, respectivamente (FAO, 2012), sendo que esta produção vem aumentando ano após ano, o que faz do Brasil o segundo maior produtor de etanol combustível no mundo. A evolução no aumento da produção de cana no Brasil está evidenciada na Figura 2.2.



**Figura 2.2** - Produção brasileira de cana-de-açúcar. (Adaptado–União dos Produtores de Bionergia).

A produção de etanol de primeira geração envolve as seguintes etapas: limpeza da cana-de-açúcar, extração do caldo de cana, rico em sacarose, tratamento do caldo de cana, concentração do caldo, fermentação, destilação e desidratação (DIAS *et al.*, 2009).

No Brasil, a produção de etanol ocorre em destilarias anexas às usinas de açúcar e em destilarias autônomas, as quais produzem apenas etanol. As melhores destilarias produzem aproximadamente 85 litros de etanol anidro por tonelada de cana. As usinas têm produção em torno de 71 kg de açúcar e 43 litros de etanol para cada tonelada de cana processada (CGEE, 2008).

Normalmente, no processamento de cana-de-açúcar, grandes quantidades de bagaço são produzidas (entre 240 e 280 kg de bagaço por tonelada de cana, com 50% de umidade), os quais são queimados em caldeiras para a geração de vapor e eletricidade. Porém, as pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de melhores tecnologias de cogeração e otimização do processo de produção de etanol poderão permitir um excedente de bagaço, o qual poderá ser usado como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (CGEE, 2008; DIAS *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, com o objetivo de se aumentar a participação do etanol na matriz energética brasileira, sem o aumento de área plantada, diferentes configurações de processos para a produção de etanol de segunda geração têm sido avaliadas através de técnicas de modelagem e simulação, por diversos pesquisadores. Dias *et al.* (2012) propuseram diferentes cenários para a produção de etanol de segunda geração, sendo este produzido de forma autônoma ou integrado à produção de etanol convencional, ou de primeira geração. Concluíram que a produção integrada de etanol (primeira e segunda geração), com fermentação das pentoses, apresentou vantagens de maior produção de etanol e melhores resultados econômicos, quando comparadas às plantas autônomas de etanol de segunda geração.

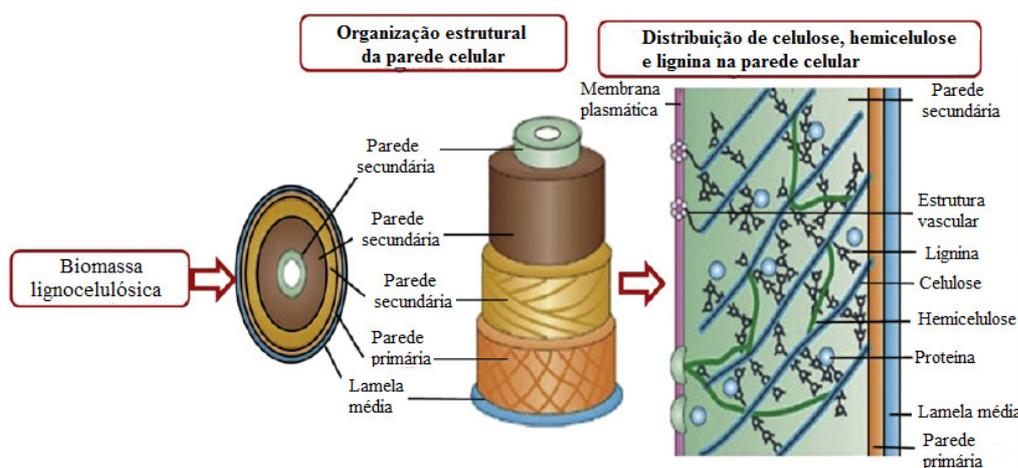
Para a produção de etanol de segunda geração, além das etapas envolvidas na produção de etanol de primeira geração, etapas adicionais são necessárias, entre elas destacam-se o pré-tratamento e hidrólise enzimática (DIAS *et al.*, 2009).

Quando se consideram os processos de forma integrada, o licor obtido no processo de hidrólise enzimática, rico em glicose, poderá ser misturado ao caldo de cana, obtido no processo de extração ou ao melaço, subproduto da indústria do açúcar. Assim, as operações de concentração, fermentação, destilação e desidratação são partilhadas entre ambos os processos, além das instalações de cogeração. Outra vantagem da produção de etanol de segunda geração de forma integrada é que os potenciais inibidores de fermentação, gerados durante a etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico, podem ter os seus efeitos reduzidos sobre o rendimento da fermentação uma vez que o licor hidrolisado adicionado

ao caldo de cana fará com que tais inibidores sejam diluídos (DIAS *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2012).

## 2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é composta por três componentes principais: celulose, 35–50%; hemicelulose, 20–35% e lignina, 10–25% (OJEDA *et al.*, 2011). Um diagrama representativo da biomassa lignocelulósica está apresentado na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Ilustração esquemática de biomassa lignocelulósica. (Adaptado de MENON; RAO, 2012).

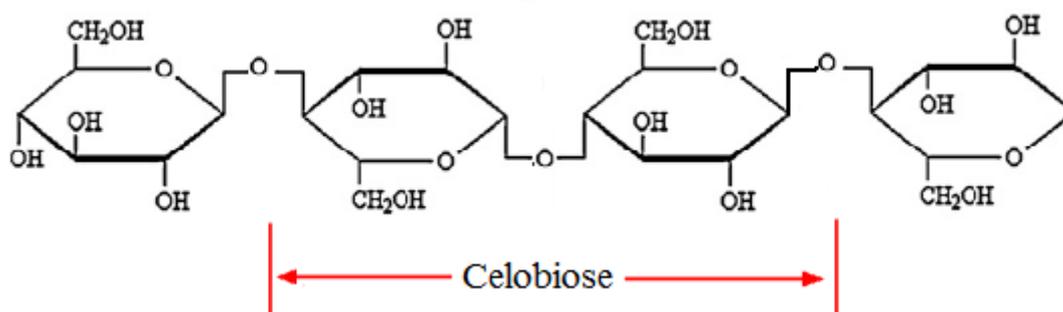
Trabalhos desenvolvidos por diversos pesquisadores, acerca da caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar, indicaram percentuais de celulose no intervalo de 40,7– 43,1%, hemicelulose entre 25,2–30,4% e lignina entre 18,8–22,9% (GUO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Celulose

Encontrada em maior quantidade na biomassa lignocelulósica, a celulose consiste de uma cadeia polimérica formada por subunidades de glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas, apresentando como unidade repetitiva, a celobiose. Ocorre em espécies vegetais superiores como árvores e em organismos primitivos como algas marinhas e bactérias (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). As cadeias de celulose são unidas por ligações

de hidrogênio, sendo denominadas como elementares e microfibrilas. Estas fibrilas são presas umas as outras através da hemicelulose e revestidas pela lignina. As microfibrilas são frequentemente associadas na forma de macrofibrilas. Esta estrutura complexa torna a celulose resistente a tratamentos biológicos e químicos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

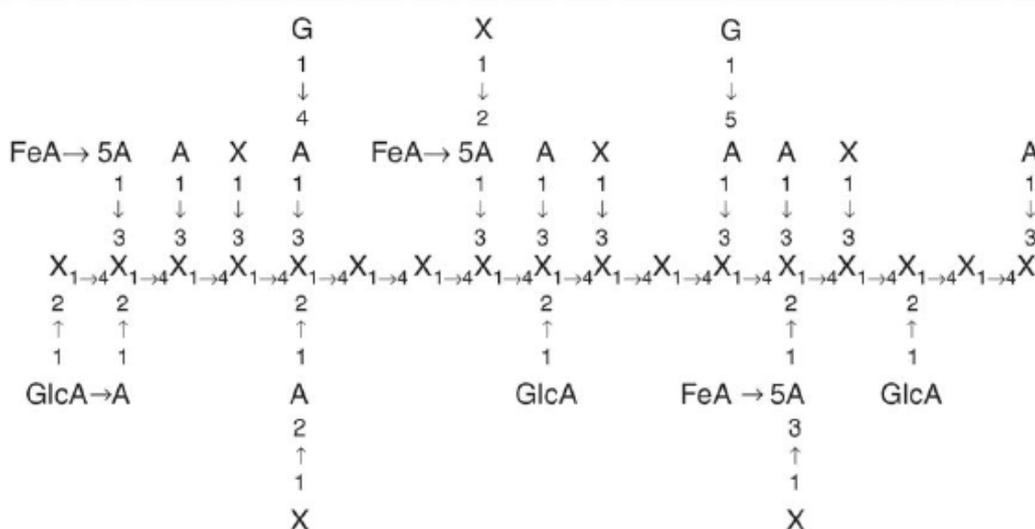
De uma forma geral, a maneira como a celulose está disposta sobre a parede celular das plantas é variável, consistindo de partes com uma estrutura cristalina (organizada), e partes não tão bem organizadas, denominada, estrutura amorfa (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Um fragmento de celulose é mostrado na Figura 2.4.



**Figura 2.4** - Estrutura de um fragmento de celulose. (Adaptado de SANDERS *et al.*, 2012).

### 2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses referem-se a uma mistura de polímeros de hexoses e pentoses. Em geral, consistem de uma cadeia principal de xilana, a espinha dorsal (acoplamento  $\beta$ -1,4), com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, glicose e ácidos urônicos ( $\alpha$ -D-glucurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico). Grupos hidroxilas dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetilas. A estrutura ramificada da hemicelulose confere pouca resistência à hidrólise, tornando-a mais facilmente hidrolisável a seus monômeros através da utilização de ácidos. O grau de ramificação e a identidade dos açúcares secundários na hemicelulose tendem a variar dependendo do tipo de planta. As xilanas e as glucomananas são os componentes mais relevantes na hemicelulose, sendo as xilanas as mais abundantes, e estas são geralmente disponíveis em grandes quantidades nas madeiras duras e nos resíduos da agricultura (GÍRIO *et al.*, 2010; GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A Figura 2.5 apresenta uma estrutura básica de hemicelulose.

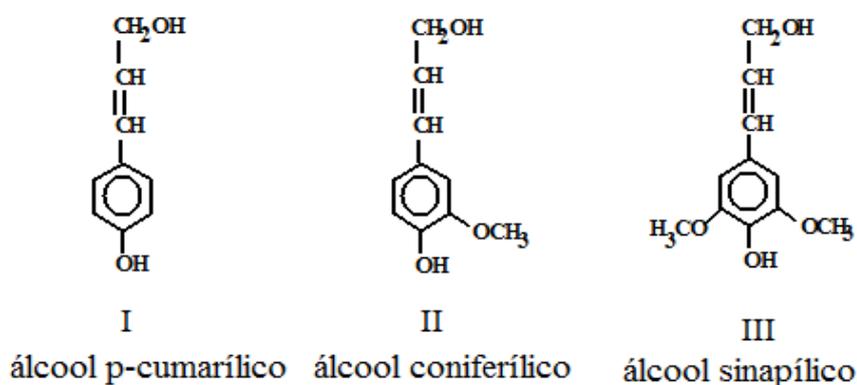


**Figura 2.5** - Esquema da estrutura básica de hemicelulose. A, arabinose; FeA, ácido ferúlico; G, galactose; Glc, ácido glucurônico; X, xilose. (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

### 2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa, consistindo de precursores de unidades de fenilpropanóides, sendo, após a celulose e a hemicelulose, um dos polímeros mais abundantes na natureza, estando presente na parede celular das plantas. Têm as funções de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Os precursores da biossíntese das ligninas são os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (ROCHA, 2000).



**Figura 2.6** - Unidades fenilpropano precursoras da lignina (ROCHA, 2000).

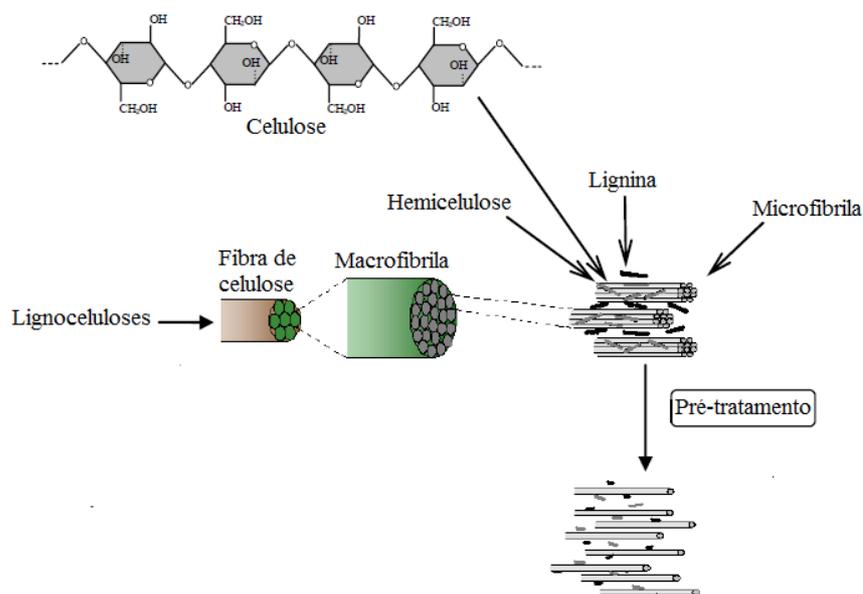
### 2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A hidrólise de materiais lignocelulósicos no estado nativo é lenta, principalmente por causa da interassociação da lignina, hemicelulose e celulose, que forma uma barreira contra o ataque biológico. Conseqüentemente, o estágio de pré-tratamento é necessário para alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica, de forma a tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis (MONIRUZZAMAN, 1996; MOSIER *et al.*, 2005). Um diagrama esquemático do processo de pré-tratamento é representado na Figura 2.7.

O efeito do pré-tratamento é usualmente analisado através: (i) da quantificação da hemicelulose e celulose liberada durante o pré-tratamento; e (ii) através da digestibilidade ou da conversão da celulose na etapa de hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é influenciada por diversos fatores como, por exemplo, a cristalinidade da celulose, grau de polimerização, umidade, área superficial disponível e quantidade de lignina (GALBE; ZACCHI, 2002; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Segundo Taherzadeh e Karimi (2008), um pré-tratamento eficiente e econômico deve atender a alguns requisitos, entre eles, destacam-se:

- i) produzir fibra celulósica reativa para o ataque enzimático;
- ii) evitar a formação de possíveis inibidores de enzimas hidrolíticas e micro-organismos de fermentação;
- iii) minimizar os custos com a redução de tamanho da matéria-prima;
- iv) reduzir os custos com material de construção dos reatores de pré-tratamento;
- v) produzir menos resíduos.



**Figura 2.7** - Diagrama esquemático dos objetivos de pré-tratamento aplicado a biomassa lignocelulósica. (Adaptado de TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Processos físicos, físico-químicos, e químicos tem sido usados como pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (AGBOR *et al.*, 2011; ALVIRA *et al.*, 2010)

### 2.3.1 Pré-tratamentos físicos

#### 2.3.1.1 Pré-tratamento mecânico

O pré-tratamento mecânico, realizado através de moagem, tem por objetivo a redução do tamanho da partícula e da cristalinidade da celulose. A redução do tamanho da partícula conduz a um aumento da superfície específica disponível e a uma redução no grau de polimerização. Tais fatores são responsáveis pelo aumento do rendimento de hidrólise total da biomassa lignocelulósica, na maioria dos casos de 5 a 25% (dependendo do tipo de biomassa, do tipo e do tempo de moagem) e, também pelo aumento na taxa de hidrólise, devido à redução do tempo de digestão de 23-59% (AGBOR *et al.*, 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

### 2.3.1.2 Micro-ondas e irradiação por feixe de elétrons

A combinação de métodos de radiação com outros, tais como tratamento com ácido, pode acelerar a hidrólise enzimática. O pré-tratamento por micro-ondas utiliza efeitos térmicos e não térmicos gerados em ambientes aquosos. No método térmico, ocorre a geração de calor interno na biomassa por radiação de micro-ondas, resultante das vibrações das ligações polares na biomassa e do meio aquoso circundante. Esta característica de aquecimento resulta em um efeito de explosão entre as partículas e melhora o rompimento das estruturas recalcitrantes da biomassa lignocelulósica. Outro mecanismo que ocorre no método térmico é a formação de um ambiente ácido por autohidrólise, o que resulta na liberação de ácido acético a partir dos materiais lignocelulósicos (SARKAR *et al.*, 2012; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

De acordo com Sarkar *et al.* (2012), o método não-térmico corresponde ao método de irradiação com feixe de elétrons. Nesse método, ligações polares vibram à medida que são alinhadas com um campo magnético variável de forma contínua e a ruptura das ligações polares acelera os processos químicos, físicos e biológicos. Ocorrem mudanças na biomassa celulósica, incluindo o aumento da área superficial específica, redução de grau de polimerização e cristalinidade da celulose, hidrólise da hemicelulose e despolimerização parcial da lignina.

A celulose, componente da biomassa lignocelulósica, pode ser degradada por irradiação em fibras mais frágeis e em oligossacarídeos de baixo peso molecular e até mesmo em celobiose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

## 2.3.2 Pré-tratamentos físico-químicos

### 2.3.2.1 Explosão a vapor (autohidrólise)

Pré-tratamento a vapor é o método mais comumente usado como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Neste método, a biomassa é tratada com vapor saturado de alta pressão e, em seguida, a pressão é rapidamente reduzida, o que faz com que a biomassa sofra uma descompressão explosiva. O pré-tratamento é iniciado a uma temperatura de 160–240 °C com uma pressão correspondente de 0,69–4,83 MPa, por poucos segundos (por exemplo, 30 segundos) a poucos minutos (por exemplo, 20 minutos) antes de o material ser exposto à pressão atmosférica, o que faz com que a reação seja interrompida. O objetivo do pré-tratamento por explosão a vapor é solubilizar a hemicelulose de forma a

tornar a celulose mais acessível às enzimas, através do aumento da digestibilidade do material lignocelulósico (AGBOR *et al.*, 2011; BALAT, 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Durante o pré-tratamento, o vapor se expande dentro da matriz lignocelulósica fazendo com que haja a separação das fibras em suas formas individuais. A hidrólise da hemicelulose é provocada pelo ácido acético gerado a partir dos grupos acetilas associados com a hemicelulose e outros ácidos liberados durante o pré-tratamento, que podem catalisar a hidrólise da hemicelulose, resultando na liberação de monômeros e oligômeros de glicose, xilose, manose, a partir das hemiceluloses ricas em mananas, de galactose e arabinose, daí o nome autohidrólise. A hemicelulose é a fração de carboidratos predominantemente solubilizada na fase líquida durante o pré-tratamento (AGBOR *et al.*, 2011; SARKAR *et al.*, 2012).

Rocha *et al.* (2012) aplicaram o pré-tratamento por explosão a vapor a diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar, em escala piloto. Os pré-tratamentos foram realizados em reator de 200 L, a 190 °C com uma pressão correspondente de 1,3 MPa, durante 15 minutos. Entre os componentes do bagaço de cana, o que sofreu maior solubilização foi a hemicelulose com uma média de 82,7% (m/m). Para a celulose e lignina a solubilização média foi de 11,8% (m/m) e 7,9% (m/m), respectivamente.

A explosão a vapor também pode ser aplicada em associação com a utilização de catalisadores químicos. A adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou SO<sub>2</sub> na explosão a vapor pode reduzir o tempo e a temperatura de pré-tratamento (BALAT, 2011). Martín *et al.* (2002) fizeram um estudo comparativo do pré-tratamento a vapor aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar, sem a adição de catalisador químico e utilizando os catalisadores H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e SO<sub>2</sub>. Em todos os casos foi aplicada uma temperatura de 205 °C, durante 10 minutos. Observaram que o rendimento em glicose após o pré-tratamento foi muito maior quando se impregnou o bagaço com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comparado ao impregnado com SO<sub>2</sub> ou sem nenhuma impregnação. O rendimento das fibras ou fração de sólidos insolúveis do bagaço impregnado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi menor que nas amostras submetidas às outras duas condições de pré-tratamento. Carrasco *et al.* (2010) aplicaram o pré-tratamento a vapor ao bagaço de cana-de-açúcar sem a adição de catalisador químico e na presença de SO<sub>2</sub> 2% (m/m), em diferentes temperaturas (180, 190 e 205 °C) em tempos de pré-tratamento de 5 e 10 minutos. Como resultados obtiveram que o emprego de SO<sub>2</sub> levou a um aumento da xilose liberada no hidrolisado, na forma de monômeros, quando comparado ao pré-tratamento sem a adição

de catalisador químico, para todas as condições de temperatura e tempo. Por outro lado, os maiores rendimentos de subprodutos (ácido acético e furfural) foram encontrados, quando se utilizou  $\text{SO}_2$  nas temperaturas de 190 e 205 °C, no tempo de 10 minutos.

Mais recentemente, Geddes *et al.* (2010) utilizaram o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  como catalisador químico associado à explosão a vapor com o objetivo de se produzir açúcares fermentáveis a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Para a realização do pré-tratamento, o bagaço de cana com 55% de umidade foi imerso durante 2 horas em uma solução de ácido fosfórico (1% m/m). Após 2 horas, o excesso de líquido foi removido através da passagem do material por uma prensa hidráulica. O bagaço impregnado com ácido ficou com uma umidade final de 52%. A matéria-prima depois de impregnada com ácido sofreu um processo de explosão a vapor, em diferentes temperaturas (140–190 °C), durante 10 minutos. Após a etapa de pré-tratamento, a análise em termos de sólidos insolúveis em água mostrou uma redução na massa de sólido, rico em celulose, que alcançou de 17–34%. Nesse caso, nas temperaturas de 140, 160 e 180 °C, a fração de sólidos insolúveis alcançou 820, 830 e 660 g/kg<sub>bagaço</sub>, respectivamente. Esses autores verificaram ainda que a maioria do açúcar solubilizado em ácido foi derivada da hemicelulose, sendo a xilose o açúcar dominante.

Ramos, Pitarelo e Silva (2008) submeteram o bagaço de cana-de-açúcar a um processo de explosão a vapor, com e sem a adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Em tal estudo, foi aplicado um planejamento experimental  $2^3$ , cujos fatores avaliados foram temperatura (195–210 °C), tempo de pré-tratamento (4–8 minutos) e concentração de ácido fosfórico (0–38 mg/g<sub>bagaço seco</sub>). Foi verificado que o rendimento da fração de sólidos insolúveis em água decresceu de 65,5% na autohidrólise para 49,5%, quando se aplicou as condições de 38 mg  $\text{H}_3\text{PO}_4$ /g, 210 °C e 8 minutos, que correspondeu à condição mais drástica de pré-tratamento, o que indica um aumento na solubilização do material lignocelulósico na fração solúvel.

#### 2.3.2.2 Explosão da fibra por amônia (*ammonia fiber explosion*–AFEX)

A explosão da fibra por amônia (AFEX) é um tipo de pré-tratamento físico-químico alcalino, no qual a biomassa é exposta a amônia líquida a uma temperatura relativamente alta (90–100 °C) por um período de tempo determinado (por exemplo, 30 minutos) seguido pela redução da pressão (BALAT, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os parâmetros eficazes no processo de AFEX são a carga de amônia, temperatura, carga de água, pressão de descarga, tempo e números de tratamentos. Geralmente, neste tipo de processo, o material lignocelulósico, com um teor de umidade de 15–30%, é colocado em um reator sob pressão, contendo amônia líquida, com uma massa de 1–2 kg de  $\text{NH}_3/\text{kg}_{\text{biomassa seca}}$ , temperatura de 90 °C e tempo de residência de 30 minutos (BALAT *et al.*, 2008; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Este tipo de pré-tratamento apresenta as desvantagens de ser menos eficiente quando a biomassa contém teores mais elevados de lignina, e causa a solubilização de uma fração muito pequena de material sólido, particularmente hemicelulose. Por outro lado, tem como vantagens a simplicidade e tempo curto de processo. É mais eficaz para o tratamento de substratos que apresentam menores teores de lignina. Em condições ótimas, o AFEX pode melhorar significativamente a hidrólise enzimática. As condições ótimas dependem do tipo de material lignocelulósico. A economia do pré-tratamento é fortemente influenciada pela produção de açúcar total alcançada, e pela perda de inibição nos processos posteriores, causada pelos produtos de degradação dos açúcares. Em temperaturas moderadas (< 90 °C) e valores de pH < 12,0 o pré-tratamento AFEX pode minimizar a formação de produtos de degradação e gerar altos rendimentos (MOSIER *et al.*, 2005; SARKAR *et al.*, 2012).

A viabilidade do processo exige a eficiente recuperação da amônia após o processo de pré-tratamento, devido ao seu alto custo, bem como devido à proteção ambiental. Uma possível maneira é recuperar a amônia através do processo de evaporação (BALAT *et al.*, 2008; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

### 2.3.2.3 Água líquida quente (*liquid hot water–LHW*)

Este método utiliza água líquida comprimida (pressão acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose. É um método de pré-tratamento hidrotérmico que libera grande fração de açúcares da hemicelulose, sob a forma de oligômeros. O tratamento geralmente ocorre a uma temperatura de 170–230 °C durante 20 minutos. No entanto, esse tipo de pré-tratamento também contribui para a produção de pequenas quantidades de compostos de degradação indesejados, tais como furfural e ácidos carboxílicos, que são muito tóxicos para a fermentação, já que eles normalmente inibem os micro-organismos. Como a recuperação da xilose é relativamente elevada (88–98%), e nenhum produto

químico é necessário, é um método ambientalmente atrativo e economicamente interessante (SARKAR *et al.*, 2012).

O pré-tratamento com água quente líquida (ou tratamento hidrotérmico) não requer descompressão rápida e não emprega qualquer catalisador ou produtos químicos. A pressão é aplicada para manter a água no estado líquido em temperaturas elevadas, o que provoca alterações na estrutura da lignocelulose. A lama gerada após o pré-tratamento pode ser filtrada para se obter duas frações: uma sólida, rica em celulose e lignina, e uma fração líquida rica em açúcares da hemicelulose. A formação de monossacarídeos e a subsequente formação de produtos de degradação pode ser minimizada mantendo-se o pH entre 4 e 7 (AGBOR *et al.*, 2011; ALVIRA *et al.*, 2010). Porém, é importante lembrar que, em geral, os pré-tratamentos visam à produção de monossacarídeos. Uma exceção, entretanto, é quando se pretende utilizar o hidrolisado para a produção de enzimas.

### **2.3.3 Pré-tratamento químico**

Alguns métodos de pré-tratamentos químicos envolvem o uso de um ácido, álcali, amônia, solvente orgânico, SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ou outros produtos químicos. Estes métodos são de fácil aplicação e apresentam bons rendimentos de conversão em curto espaço de tempo (SARKAR *et al.*, 2012).

#### *2.3.3.1 Ozonólise*

A ozonólise corresponde ao uso do gás ozônio para degradar a lignina e a hemicelulose de muitos materiais lignocelulósicos, e por sua vez aumentar a biodegradabilidade de celulose. Como em qualquer processo, este tipo de pré-tratamento apresenta vantagens e desvantagens. As principais vantagens são: (1) remove efetivamente a lignina; (2) não produz compostos tóxicos que possam ser inibidores em processos subsequentes, como, por exemplos, processos de fermentação; e (3) o pré-tratamento é realizado em grandes intervalos de temperatura e pressão. Entretanto, a principal desvantagem é do ponto de vista econômico, uma vez que é necessária uma grande quantidade de ozônio, tornando o processo oneroso. Os principais parâmetros no pré-tratamento por ozonólise são o teor de umidade da amostra, tamanho da partícula, e concentração de ozônio. Entre estes parâmetros, um fator essencial é a percentagem de

água na matéria-prima, o qual apresenta um efeito significativo sobre a solubilização (BALAT, 2011; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

#### 2.3.3.2 *Pré-tratamento alcalino*

Pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais efetivos para a solubilização da lignina, apresentando menor solubilização da celulose e hemicelulose que os processos ácidos ou hidrotérmicos (ALVIRA *et al.*, 2010). Alguns agentes alcalinos podem ser usados para o pré-tratamento de material lignocelulósico e o efeito deste tipo de pré-tratamento depende do teor de lignina no material (SUN; CHENG, 2002).

Este processo utiliza baixas temperatura e pressão quando comparado a outras tecnologias de pré-tratamento. O pré-tratamento alcalino pode ser realizado em condições ambientais, mas o tempo de pré-tratamento é medido em horas ou dias, ao invés de minutos ou segundos. Independentemente das vantagens, este método apresenta dificuldades do ponto de vista da economia de processo para obtenção de combustíveis. Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são produtos químicos apropriados para o pré-tratamento. Destes quatro, o NaOH tem sido o mais estudado. O tratamento da biomassa lignocelulósica com NaOH diluído provoca um tipo de “inchaço” na biomassa, levando a um aumento da área superficial interna, uma diminuição na cristalinidade e separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos, perturbando a estrutura da lignina (BALAT, 2011).

#### 2.3.3.3 *Oxidação úmida*

Na oxidação úmida, o material é pré-tratado com água e também por ar ou oxigênio em temperaturas acima de 120 °C. A água é adicionada à biomassa na relação de 1 L para 6 g de biomassa. A transferência da hemicelulose da fase sólida para a fase líquida é promovida por esta técnica. Os produtos da hidrólise de hemicelulose durante a oxidação úmida são oligômeros de açúcares (SARKAR *et al.*, 2012).

O processo é exotérmico e, portanto, se torna auto-suficiente com relação ao calor quando a reação é iniciada. As principais reações de oxidação úmida são a formação de ácidos, provenientes de processos hidrolíticos e reações oxidativas. Os produtos fenólicos

não são produtos finais obtidos durante a oxidação úmida porque são degradados a ácidos carboxílicos. No entanto, a produção de HMF e furfural é menor durante a oxidação úmida quando comparado com a explosão a vapor ou com o método LHW. No geral, baixa formação de inibidores e remoção eficiente de lignina são alcançadas com a oxidação úmida. Por outro lado, o custo do oxigênio é considerado uma desvantagem para o desenvolvimento da tecnologia de oxidação úmida (ALVIRA *et al.*, 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

#### 2.3.3.4 *Pré-tratamento organossolve*

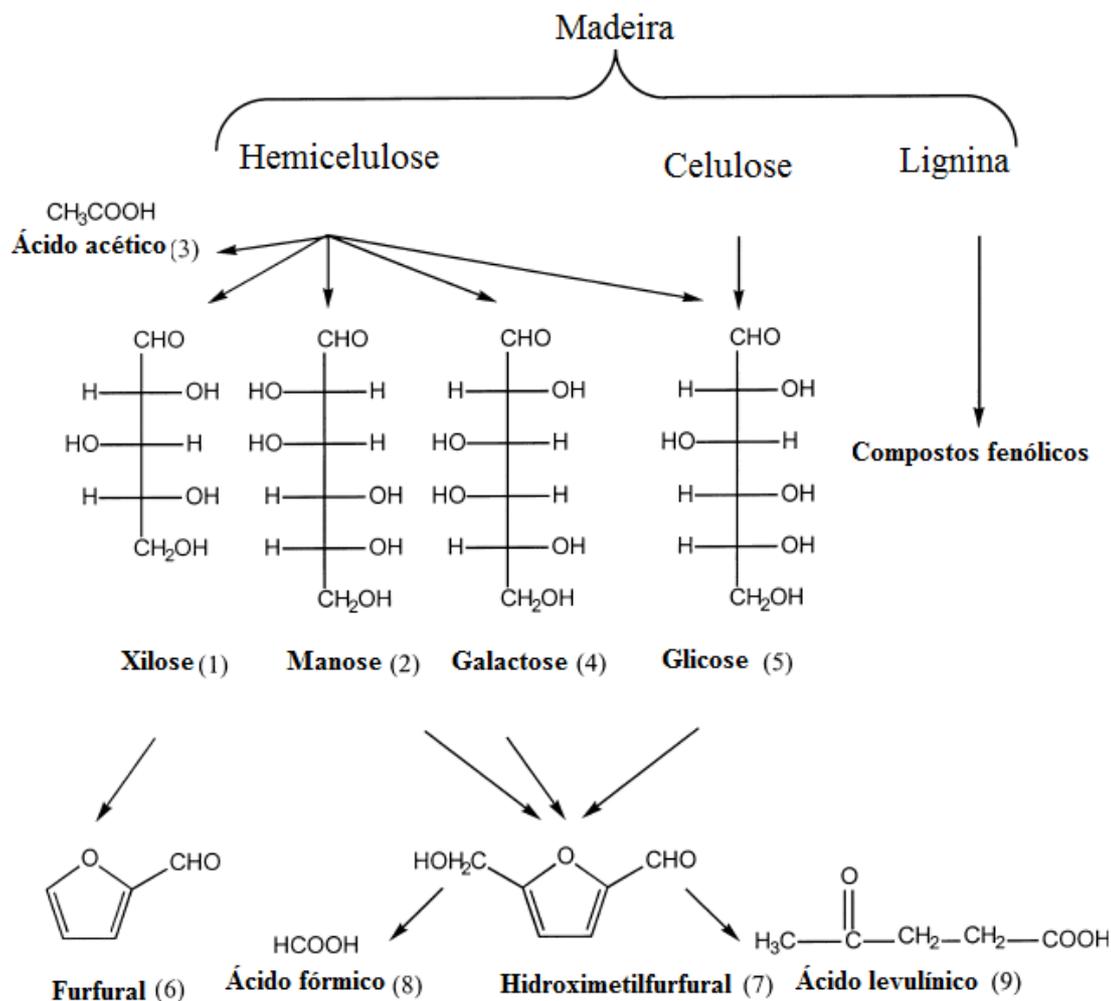
A utilização de solventes orgânicos, ou processo de polpação organossolve, são métodos alternativos para a deslignificação de biomassa lignocelulósica. A utilização de mistura de solventes orgânicos/água permite o isolamento da lignina, através da destilação do solvente orgânico (SARKAR *et al.*, 2012).

No processo organossolve, um solvente orgânico ou uma mistura de solventes orgânicos, misturado a um catalisador ácido inorgânico (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), é usado para romper as ligações internas de lignina e hemicelulose. Os solventes orgânicos usados neste processo incluem metanol, etanol, acetona, etileno glicol, trietileno glicol e álcool tetrahidrofurfurílico. Ácidos orgânicos como oxálico, acetilsalicílico e salicílico também podem ser usados como catalisadores no processo organossolve. Após o pré-tratamento, a remoção dos solventes é necessária, pois, os solventes podem atuar como inibidores ao crescimento de micro-organismos, hidrólise enzimática e fermentação (SUN; CHENG, 2002).

#### 2.3.3.5 *Pré-tratamento ácido*

O principal objetivo dos pré-tratamentos ácidos é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas, uma vez que ocorre um aumento no tamanho do poro do substrato. O pré-tratamento com ácido diluído aparece como o método mais favorável para aplicações industriais e tem sido estudado em uma grande variedade de biomassas lignocelulósicas. A principal reação que ocorre durante o pré-tratamento ácido é a hidrólise da hemicelulose. Reações hidrolíticas produzem oligômeros e monômeros. A desidratação dos monômeros, por sua vez, produz furfural, HMF e outros produtos voláteis em ambientes ácidos (ALVIRA *et al.*, 2010;

HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Os principais produtos que podem se formar a partir da degradação dos açúcares liberados durante o pré-tratamento ácido da madeira, foram estudados por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), cujo diagrama esquemático é ilustrado pela Figura 2.8.



**Figura 2.8** - Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos. (Adaptado de PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Embora, o pré-tratamento com ácido sulfúrico venha sendo o mais empregado, outros tipos de ácidos, como, o ácido nítrico, ácido peracético ou ácido fosfórico são citados como alternativas para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

A aplicação de ácido às biomassas lignocelulósicas pode ser realizada tanto a alta temperatura e baixa concentração (pré-tratamento com ácido diluído) ou a baixa temperatura e alta concentração (ácido concentrado), nesse último caso funcionando como hidrólise propriamente dita. O ácido diluído é provavelmente o método mais aplicado entre

os métodos de pré-tratamentos químicos. A uma temperatura elevada (140–190 °C) e baixa concentração de ácido (ácido sulfúrico 0,1–1%) o pré-tratamento com ácido diluído pode alcançar elevadas taxas de reação e melhorar significativamente a hidrólise da celulose, na etapa posterior de hidrólise enzimática. Quase 100% de remoção da hemicelulose é possível através do pré-tratamento com ácido diluído. O pré-tratamento não é eficaz na dissolução de lignina, mas pode provocar uma perturbação na sua estrutura, aumentando a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Há principalmente dois tipos de processos de pré-tratamento com ácido diluído: altas temperaturas (maiores que 160 °C), processo em fluxo contínuo para baixas concentrações de sólido (5–10% [massa de substrato/massa de mistura reacional]), e baixas temperaturas (menores que 160 °C), processo em batelada para altas concentrações de sólido (10–40%). Em geral, o pré-tratamento realizado a temperaturas mais altas e menores tempos de residência, resulta em alto rendimento de recuperação de xilose solúvel e maior digestibilidade enzimática da celulose. Dependendo do substrato e das condições usadas, entre 80 e 95% dos açúcares de hemicelulose podem ser recuperados a partir do pré-tratamento com ácido diluído (SUN; CHENG, 2002; BALAT, 2011).

De acordo com trabalho de Wyman *et al.* (2005), o emprego de ácido sulfúrico diluído (~ 0,5–1,0%) a temperaturas moderadas (~140–190 °C) efetivamente remove e recupera a maioria da hemicelulose dissolvida como açúcares, e o rendimento em glicose a partir da celulose aumenta com a remoção de hemicelulose.

Em trabalho desenvolvido por Rocha *et al.* (2011), a utilização da mistura ácido sulfúrico 1% (m/v) e ácido acético 1% (m/v) aplicada ao bagaço de cana-de-açúcar numa relação 1:10 (sólido:líquido) e uma temperatura de 190 °C, durante 10 minutos, levou a uma solubilização de 14,6% de celulose e 93,4% de hemicelulose.

Os hidrolisados obtidos após a hidrólise ácida necessitam de algumas etapas de processos antes de serem utilizados como meios de fermentação. Em geral, as seguintes operações são necessárias: concentração, detoxificação, neutralização e suplementação com nutrientes. Na operação de neutralização, usualmente se adicionam produtos químicos com o objetivo de neutralizar os ácidos presentes nos hidrolisados, formando sais. O uso de  $H_3PO_4$  como catalisador pode constituir uma fonte adicional de nutrientes para os processos fermentativos, uma vez que a neutralização do hidrolisado com NaOH, forma o fosfato de sódio, que pode permanecer no hidrolisado e ser utilizado como nutriente pelos micro-organismos (GÁMEZ *et al.*, 2006). Além disso, a utilização de ácido fosfórico

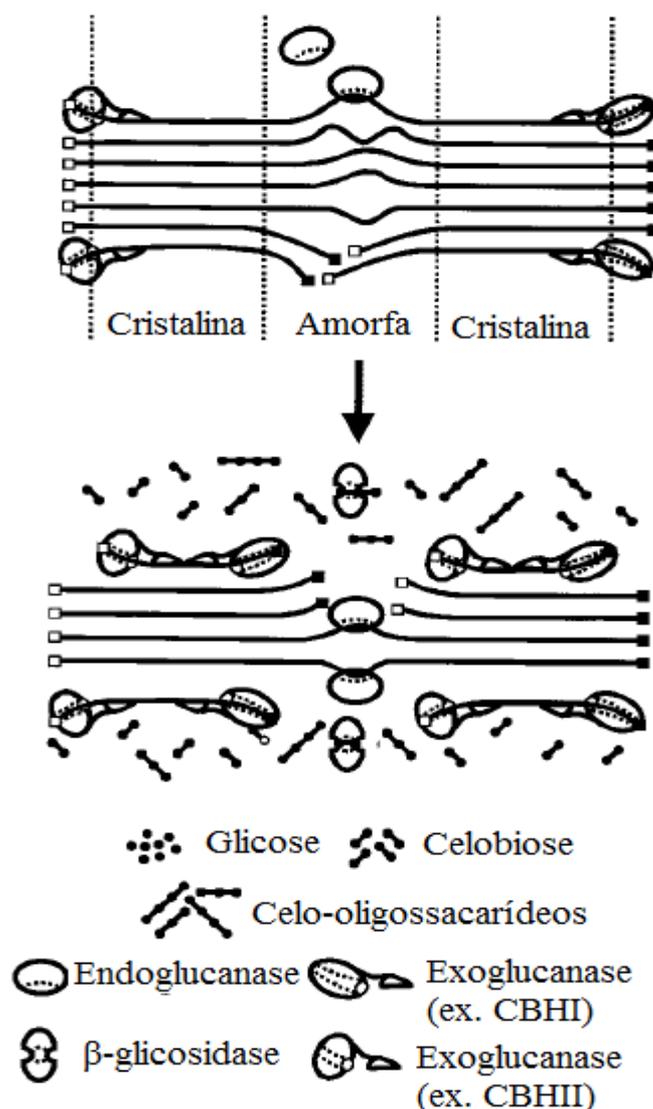
aplicado ao pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar poderá oferecer uma oportunidade de geração de subproduto, como componente para fertilizantes de plantas, quando se considera todos os processos ocorrendo de forma integrada durante a produção de etanol, como já ocorre no processo de produção de etanol de primeira geração, através da formação da vinhaça. Outra vantagem no uso de ácido fosfórico no processo de pré-tratamento ocorre devido à não exigência de ligas especiais para a construção dos reatores, como ocorre com a utilização de outros ácidos, como, por exemplo, o ácido sulfúrico (GEDDES *et al.*, 2010; GEDDES; NIEVES; INGRAM, 2011).

## 2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo de hidrólise enzimática é responsável pela despolimerização da celulose e hemicelulose, liberando assim os açúcares monoméricos (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006). Em tal processo, as enzimas celulasas e hemicelulasas atuam como catalisadores. A hidrólise eficiente da celulose requer certo número de enzimas. Os componentes do sistema de enzimas celulasas, de uma forma geral, foram classificados como base no modo de ação catalítica e com base nas propriedades estruturais. Três tipos principais de atividades enzimáticas foram encontrados (LYND *et al.*, 2004; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007):

- i) endoglucanases ou 1,4-  $\beta$ -D-glucana-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4);
- ii) exoglucanases, incluindo 1,4- $\beta$ -D-glucana glucanohidrolases (também conhecidas como celodextrinases) (EC 3.2.1.74) e 1,4- $\beta$ -D-glucana celobiohidrolases (celobiohidrolases) (EC 3.2.1.91);
- iii)  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21).

As endoglucanases atuam nos sítios amorfos, internos, da cadeia polissacarídica da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novas terminações de cadeias. As exoglucanases atuam sobre as terminações redutíveis e não-redutíveis das cadeias do polissacarídeo celulose, liberando então glicose (glucanohidrolase ou celodextrinase) ou celobiose (celobiohidrolase) como produtos principais. Também atuam na celulose microcristalina. As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam celodextrinas solúveis e celobiose para glicose (LYND *et al.*, 2004). A Figura 2.9 ilustra as etapas que ocorrem durante a hidrólise enzimática da celulose.



**Figura 2.9** – Representação esquemática da hidrólise de celulose amorfa e microcristalina. (Adaptado de LYND *et al.*, 2002).

A ação das celulases é sinérgica, o que significa que a atividade combinada das enzimas é maior que a soma dos componentes individuais. Tal ação se faz necessária para a completa hidrólise da celulose cristalina à glicose (ESTERBAUER *et al.*, 1991; GALBE; ZACCHI, 2002). Algumas formas de sinergismo têm sido relatadas: (i) sinergia endo-exo entre endoglucanases e exoglucanases, (ii) sinergia exo-exo entre o processamento de exoglucanases das extremidades redutoras e não-redutoras de cadeias de celulose, (iii) sinergia entre exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases que remove celobiose (e celodextrinas) como produtos das duas primeiras enzimas (LYND *et al.*, 2002).

As hemicelulases incluem as enzimas que quebram as ligações  $\beta$ -1,4-xilana (xilanas e  $\beta$ -xilosidas), além de endo-1,4- $\beta$ -D-mananas e 1,4- $\beta$ -D-manosidas,  $\alpha$ -D-galactosidas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidas,  $\alpha$ -glucuronidas e esterases acetil xilana (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Alguns fatores afetam a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e estes incluem desde as características do substrato até a natureza do complexo enzimático utilizado. Os fatores relacionados ao substrato incluem a porosidade, grau de polimerização da celulose, teor de lignina, teor de hemicelulose e tamanho das partículas. Em relação ao complexo enzimático, destacam-se a carga de enzimas, inibição do complexo pelo acúmulo de produto intermediário (celobiose) e produto final (glicose) e perda de atividade devido à desnaturação (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; PERI *et al.*, 2007; VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

Sun e Cheng (2002) sugeriram que o mecanismo presente no processo de hidrólise enzimática de celulose consiste das seguintes etapas: adsorção das celulasas sobre a superfície da celulose, a degradação da celulose em açúcares fermentáveis e por fim, a dessorção das celulasas. Ocorre ainda, a redução da atividade enzimática durante o processo de hidrólise, o que é atribuído, em parte à adsorção irreversível das celulasas sobre a lignina presente no material pré-tratado. Dessa forma, a taxa de hidrólise decai durante o seu curso.

Gan, Allen e Taylor (2003) consideraram que a velocidade global de reação durante o processo hidrolítico da celulose pode ser influenciada por meio da resistência à transferência de massa. Nesse sentido, levaram em consideração tanto a transferência de massa das enzimas por meio da camada de líquido, que envolve as partículas de sólidos de celulose (transferência de massa externa), quanto a difusão interna das enzimas. Esses autores sugeriram que no início da reação hidrolítica em um reator descontínuo agitado, o conjunto de velocidades de reação é determinado por três eventos na sequência: (i) transferência de massa externa; (ii) taxa de adsorção da enzima na superfície do substrato; e (iii) taxa de catálise da celulase. Supuseram ainda que a continuação da hidrólise, após a fase inicial de uma reação rápida, depende do acesso e difusão de enzima livre no interior do substrato sólido, uma vez que este sofre uma mudança estrutural, quando a primeira camada de celulose é hidrolisada. Finalmente, propuseram que a importância da resistência à transferência de massa externa e interna deve ser vista em um ciclo dinâmico de difusão da enzima  $\rightarrow$  adsorção  $\rightarrow$  catálise  $\rightarrow$  dessorção  $\rightarrow$  difusão para outro sítio ativo.

De uma forma mais simplista, Peri *et al.* (2007) relataram que a hidrólise enzimática pode ser dividida em duas fases: estágio inicial, em que a taxa de hidrólise é quase linear, e estágio final, onde a taxa continuamente decai. No estágio inicial, a inibição pelo produto não é importante; e a resistência à transferência de massa no caso de sistemas diluídos, é menor nessa fase. No estágio final, a taxa de hidrólise é reduzida, provavelmente devido à inibição da enzima pelo produto final.

No caso da produção de etanol, a eficiência do processo de hidrólise irá influenciar na etapa de fermentação, uma vez que o alto rendimento em etanol celulósico requer a hidrólise completa da celulose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

## 2.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

### 2.5.1 Micro-organismos produtores de enzimas celulolíticas

Sistemas celulolíticos completos são produzidos por diferentes gêneros e espécies de fungos e bactérias. As bactérias celulolíticas incluem espécies aeróbias, como os actinomicetos, anaeróbias facultativas, como *Bacillus* e *Cellulomonas* e anaeróbias estritas, como *Clostridium*. A produção de celulases por fungos é amplamente disseminada na natureza, incluindo uma grande variedade de espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* (BON; GÍRIO, PEREIRA Jr., 2008).

Fungos celulolíticos pertencentes ao gênero *Trichoderma* (*T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*) têm sido considerados os mais produtivos e poderosos agentes de digestão da celulose cristalina. Celulases comerciais baseadas em linhagens mutantes de *T. reesei* (também conhecidas como *Hypocrea jecorina*) são produzidas numa escala industrial por muitas empresas em todo o mundo (GUSAKOV, 2011).

### 2.5.2 Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *T. reesei* RUT C30

O sistema de celulase de *Trichoderma reesei*, particularmente, produz pelo menos duas exoglucanases (CBHI e CBHII), cinco endoglucanases (EGI-EGV) e duas  $\beta$ -glicosidasases (BGLI e BGLII) (LYND *et al.*, 2002).

O sistema celulolítico extracelular de *T. reesei* é composto de 60–80% de exoglucanases, 20–36% de endoglucanases e 1% de  $\beta$ -glicosidase, os quais atuam sinergicamente na conversão de celulose em glicose (AHMED; VERMETTE, 2008).

Diferentes linhagens de *T. reesei* têm sido desenvolvidas; a linhagem RUT C30 é uma das linhagens mais bem caracterizadas, e tornou-se uma linhagem de referência entre os produtores de celulase de *T. reesei*; é uma linhagem mutante que produz enzimas celulolíticas de forma mais eficiente do que a *T. reesei* do tipo selvagem, e a expressão da celulase não é reprimida por glicose na mesma extensão como em algumas outras linhagens. Vários fatores são conhecidos por influenciar a produção da enzima e estes incluem: concentração e qualidade da fonte de carbono, linhagens melhoradas geneticamente, condições de crescimento, aeração, temperatura e pH (DOMINGUES *et al.*, 2000; AHMED; VERMETTE, 2008; GUSAKOV, 2011).

Em relação à fonte de carbono, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se encontrar o substrato mais adequado ao processo de produção de celulases pelo *T. reesei* RUT C30. A celulose foi considerada, em potencial, um dos melhores indutores para a formação do complexo de celulases (AHMED; VERMETTE, 2008). A lactose também é utilizada, nos processos biotecnológicos para a produção de enzimas, por ser um bom indutor de celulases (XIONG *et al.*, 2004; SEIBOTH *et al.*, 2007; GOTTSCHALK; OLIVEIRA; BON, 2010).

Substratos lignocelulósicos sólidos têm sido bastante estudados, uma vez que a matéria-prima ideal para a produção de enzimas deve apresentar baixo custo, ser de fácil disponibilidade e a sua composição deve ser adequada tanto para a produção de enzimas quanto para o processo de hidrólise enzimática (JUHÁSZ *et al.*, 2005). Tem sido reportado que di-/oligosacarídeos e seus derivados, tais como celobiose, sofrorose e xilobiose, liberados a partir de polímeros lignocelulósicos tem desempenhando papel importante na indução de celulase natural. Devido a este fato, materiais sólidos celulósicos têm sido utilizados muitas vezes como substrato e fonte de indutores nos processos de fermentação para a produção de celulase (LO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto, a presença destes substratos sólidos pode requerer uma maior agitação e provocar uma redução na eficiência de transferência de oxigênio nos biorreatores. Uma alternativa que tem se mostrado atraente na tentativa de minimizar tais problemas é a utilização de meios preparados com hidrolisados de materiais lignocelulósicos os quais contêm teores elevados de oligossacarídeos e proporcionam uma adequada indução (LO *et al.*, 2010).

A adição de hidrolisado hemicelulósico ao processo de produção de enzimas em meio de lactose, por *T. reesei* RUT C30, proporcionou um aumento de quase 4 vezes na atividade de xilanase produzida quando comparado ao meio contendo apenas lactose,

solubilizado em água, sendo as atividades de 69,2 UI/mL (meio de lactose e hidrolisado) e 17,9 UI/mL (meio de lactose solubilizado em água) (SILVA; SANTOS; SOUTO-MAIOR, 2011).

## 2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Os micro-organismos usados na fermentação alcoólica podem ser melhor descritos em termos de seus parâmetros de desempenho e outros requisitos, tais como a compatibilidade com produtos existentes no meio reacional, processos e equipamentos. Os parâmetros de desempenho da fermentação correspondem ao intervalo de temperatura e pH, tolerância do micro-organismo ao etanol, velocidade de crescimento, produtividade e tolerância osmótica.

Em processos industriais de primeira geração, o micro-organismo utilizado para a fermentação a etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para a produção de etanol de segunda geração, *S. cerevisiae* permanece como o micro-organismo mais explorado. *Zymomonas mobilis*, uma bactéria Gram-negativa anaeróbia, também têm sido extensivamente estudada. (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; BALAT, 2011).

Estudo sobre a produção de etanol foi realizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos (UFPE) utilizando-se 10 linhagens industriais de *S. cerevisiae* e 10 linhagens de *Z. mobilis*, pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos. Produtividades e rendimentos de etanol foram comparados em meios a base de glicose e de glicose na presença de hidrolisado hemicelulósico. Duas linhagens, sendo uma de cada grupo (*S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *Z. mobilis* ZAP), foram selecionadas por apresentarem melhores características fermentativas (SÁ, 2012). Através de estudo cinético, Sá (2012) verificou que *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 é mais robusta que *Z. mobilis* ZAP para fermentação na presença de hidrolisado hemicelulósico.

## 2.7 CONFIGURAÇÕES DE PROCESSOS

A produção de etanol de segunda geração (etanol lignocelulósico) pode ser realizada através de diferentes configurações de processos, tais como:

- i) hidrólise e fermentação em separado (SHF);
- ii) sacarificação e fermentação simultâneas (SSF);

- iii) hidrólise em separado e co-fermentação (SHCF);
- iv) sacarificação com co-fermentação simultâneas (SSCF);
- v) bioprocesso consolidado (CBP).

A hidrólise e fermentação em separado (SHF) é um processo convencional, que consiste de duas etapas, onde o material lignocelulósico, contendo principalmente celulose, é primeiramente hidrolisado a glicose e então, a glicose é fermentada a etanol. A vantagem de tal processo é a possibilidade de se conduzir cada etapa sob condições ótimas; a desvantagem é que as enzimas celulolíticas são inibidas pelo seu produto final, de forma que a taxa de hidrólise é progressivamente reduzida quando a glicose e a celobiose se acumulam no meio (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; MENON; RAO, 2012).

No processo SSF, a hidrólise e fermentação ocorrem simultaneamente no mesmo reator e, assim, a inibição das enzimas pelo produto final é reduzida, uma vez que o micro-organismo responsável pela fermentação consome imediatamente os açúcares liberados na etapa de hidrólise. Além disso, a fermentação parece reduzir a inibição das enzimas, através da conversão de alguns compostos tóxicos presentes nos hidrolisados. Isto aumenta a produtividade global em etanol. A principal desvantagem do processo é a exigência de condições ótimas a ambos os processos tais como: temperatura, pH e concentração do substrato (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; HASUNUMA; KONDO, 2012; MENON; RAO, 2012; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

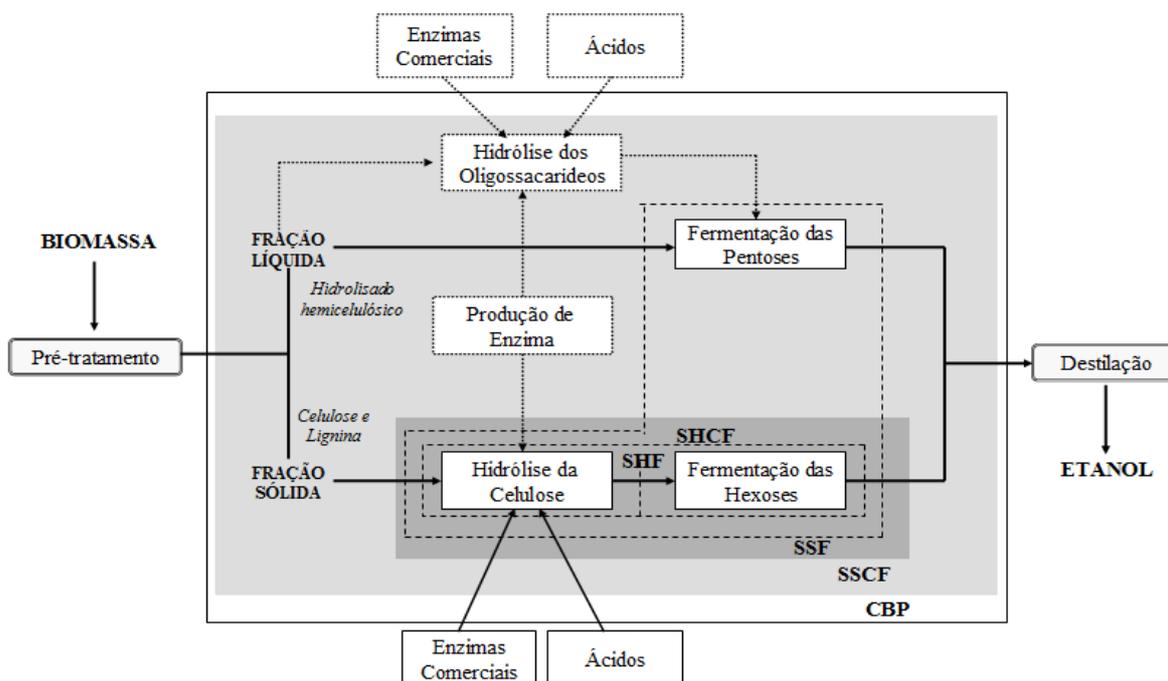
No processo denominado de hidrólise em separado e co-fermentação (SHCF), a fração de pentose é fermentada em conjunto com a fração de hexose, após serem hidrolisadas de forma separada (GÍRIO *et al.*, 2010).

O processo SSCF é considerado como uma melhoria do processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e tem sido reconhecido como uma opção viável para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica rica em xilose. Refere-se à fermentação de hexoses e pentoses para a produção de etanol, em que o hidrolisado de hemicelulose e os sólidos, ricos em celulose, obtidos durante a etapa de pré-tratamento não são separados. Porém, poucas linhagens de leveduras têm demonstrado a capacidade de fermentar de forma eficiente a xilose presente em hidrolisados lignocelulósicos. Dessa forma, a sacarificação simultânea da celulose e hemicelulose e co-fermentação dos produtos finais glicose e xilose tem sido descrita para ser realizada por micro-organismos

geneticamente modificados (MENON; RAO, 2012; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008; PENG *et al.*, 2012;).

O bioprocesso consolidado (CBP) corresponde à integração do processo através da realização de hidrólise e fermentação em um único reator, utilizando um ou uma mistura de micro-organismos capazes de produzir todas as enzimas necessárias e fermentar todos os açúcares (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006). A Figura 2.10 ilustra as diferentes configurações de processo a hidrólise e fermentação, propostas pela literatura.

Bon, Gírio e Pereira Jr. (2008) sugerem que muitos desenvolvimentos deverão ocorrer em um futuro próximo no sentido de viabilizar economicamente o uso de enzimas na produção de etanol, uma vez que a produção das mesmas na própria planta é uma necessidade, já que grandes quantidades destas serão requeridas para a eficiente hidrólise dos materiais lignocelulósicos, visando a produção de etanol. Ressaltam, ainda, que a integração da produção de enzimas com a produção de etanol na própria instalação industrial se insere no contexto de biorrefinaria.



**Figura 2.10** – Configurações de processos para a produção de etanol lignocelulósico. (Adaptado de GÍRIO *et al.*, 2010).

---

# *CAPÍTULO 3*

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

*Neste capítulo, encontram-se descritos o material e as metodologias utilizadas no estudo do pré-tratamento e caracterização físico-química de bagaço de cana-de-açúcar, o qual foi utilizado como substrato na etapa de hidrólise enzimática. Também é apresentada a metodologia para a produção de enzimas, que foram utilizadas em paralelo, com enzimas comerciais, na hidrólise enzimática do bagaço de cana para a obtenção de açúcares fermentáveis, e também a metodologia empregada na fermentação alcoólica.*

#### 3.1 BIOMASSA

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi cedido pela Usina Central Olho D'água (Camutanga/PE), recolhido imediatamente após o processo de moagem. Em seguida, foi transportado para o laboratório, seco (~ 11% de umidade) sob a luz solar, armazenado em sacos tipo nylon fechados e mantidos à temperatura ambiente.

#### 3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo do pré-tratamento teve como objetivo determinar as melhores condições de processo, que provocassem uma maior solubilização da hemicelulose do bagaço de cana e favorecesse uma maior conversão de celulose em glicose na etapa posterior de hidrólise enzimática. Para isto, utilizou-se a técnica do planejamento experimental linear  $2^3$ , com 3 (três) pontos centrais, totalizando 11 (onze) ensaios. Os fatores independentes foram: tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico. Os fatores dependentes, ou respostas, foram: concentrações de celulose ( $C\%$ ), hemicelulose ( $H\%$ ) e lignina ( $L\%$ ), nas frações sólidas, obtidas em cada condição de pré-tratamento, assim como a celulose solubilizada ( $C_S\%$ ), hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) e lignina solubilizada ( $L_S\%$ ), a partir da fração sólida de bagaço de cana. As Tabelas 3.1-3.2 correspondem à tabela de níveis e à planilha experimental, respectivamente.

**Tabela 3.1** – Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Variáveis Independentes	Símbolo	Limites		
		-1	0	+1
Tempo (min)	X <sub>1</sub>	8	16	24
Temperatura (°C)	X <sub>2</sub>	144	165	186
Concentração de ácido fosfórico (% m/v)	X <sub>3</sub>	0,05	0,13	0,20

**Tabela 3.2** - Matriz do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]*	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]*
01	-1	-1	-1	8	144	0,05
02	+1	-1	-1	24	144	0,05
03	-1	+1	-1	8	186	0,05
04	+1	+1	-1	24	186	0,05
05	-1	-1	+1	8	144	0,20
06	+1	-1	+1	24	144	0,20
07	-1	+1	+1	8	186	0,20
08	+1	+1	+1	24	186	0,20
09 (PC)	0	0	0	16	165	0,13
10 (PC)	0	0	0	16	165	0,13
11 (PC)	0	0	0	16	165	0,13

\* m/v; PC: ponto central

Nas análises dos resultados, foi utilizado um programa estatístico STATISTICA (Statsoft 7.0). As variáveis independentes e as respostas (em valores codificados) foram correlacionadas através de modelo linear, representado pela Equação 3.1, em que:  $y_i$

representa a variável de resposta;  $\beta_0$ ,  $\beta_j$ ,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes do modelo de regressão;  $X_i$  e  $X_j$  representam os níveis codificados das variáveis independentes.

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_j X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

A metodologia do planejamento fatorial e a análise de superfície de resposta são preferidas em relação à análise univariável ao permitirem considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e as interações entre eles, reduzindo o número de experimentos.

### 3.2.1 Pré-tratamento

Amostras de 500 g de bagaço, em base seca, foram introduzidas em um reator rotatório de 20 L de capacidade nominal (AU/E-20, Regmed Indústria Técnica Ltda) apresentado na Figura 3.1. As condições de pré-tratamento foram definidas de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3.2), mantendo-se a concentração final no reator em 5% (m/v). Em seguida, o reator foi fechado e iniciou-se o aumento da temperatura através de um sistema de aquecimento por resistência elétrica. As rampas características de aquecimento do reator, para cada uma das temperaturas empregadas no pré-tratamento, encontram-se no Apêndice A. A contagem do tempo foi inicializada quando o processo atingiu a temperatura desejada. Finalizada a reação, o reator foi despressurizado, através da abertura de uma válvula localizada na parte superior do reator, com o objetivo de acelerar o resfriamento do sistema reacional. A temperatura foi reduzida a 80 °C e, em seguida, o reator foi descarregado.

O bagaço de cana pré-tratado foi filtrado em tecido de algodão, e a polpa obtida (fração sólida) foi lavada 3 vezes (10 L por lavagem) com água aquecida a 70 °C para remoção fração líquida rica em açúcar (hidrolisado hemicelulósico) (ROCHA *et al.*, 2011). As frações sólidas obtidas foram separadas para caracterização físico-química e hidrólise enzimática. As frações líquidas foram submetidas à análise cromatográfica, com o objetivo de se determinar a presença de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação.



**Figura 3.1** - Reator de 20 L (Regmed, AU/E-20), utilizado nos experimentos de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar.

Os rendimentos das frações sólidas obtidas na etapa de pré-tratamento, determinadas por gravimetria, em relação ao peso seco do bagaço inicialmente submetido ao processo, foram calculados conforme a Equação 3.2.

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

onde:

$M_f$  = massa final de bagaço (base seca), após pré-tratamento (g);

$M_i$  = massa inicial de bagaço (base seca), antes do pré-tratamento (g).

Para o cálculo da solubilização dos componentes macromoleculares, celulose, hemicelulose e lignina, a partir da fração sólida de bagaço, foi utilizada a Equação 3.3.

$$S_{cm} = 100 - \left( \frac{X_f \cdot Y}{X_i} \right) \quad (3.3)$$

sendo:

$S_{cm}$  = solubilização do componente macromolecular (% , m/m);

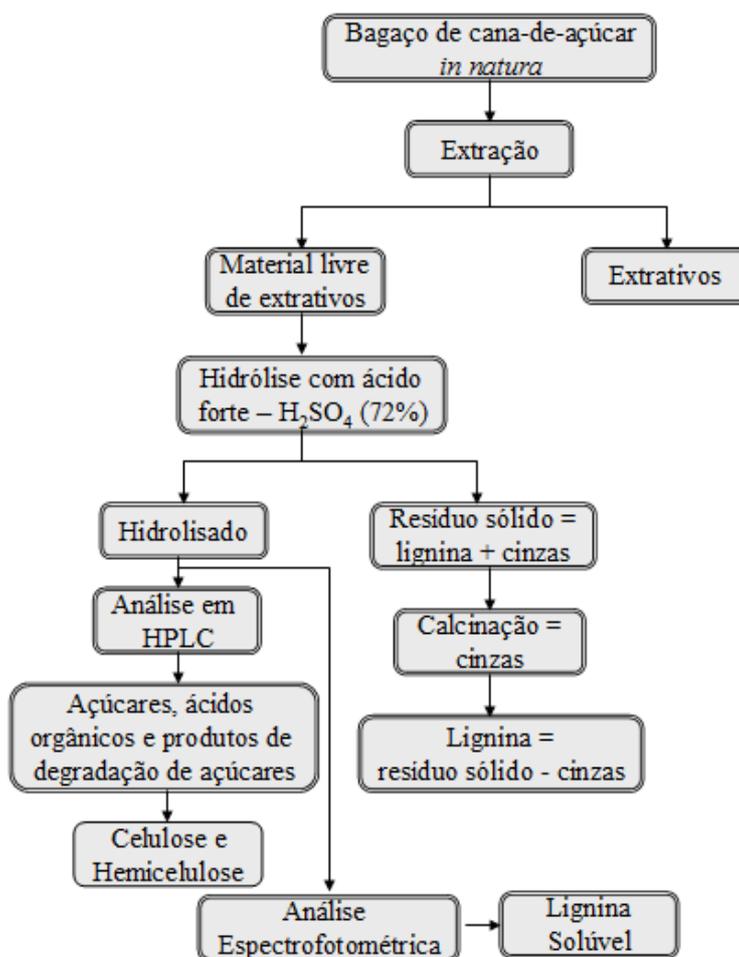
$X_i$  = componente macromolecular no bagaço de cana *in natura* (% , m/m);

$X_f$  = componente macromolecular no bagaço de cana após pré-tratamento (% , m/m);

$Y$  = rendimento da fração sólida de bagaço (% , m/m).

### 3.2.2 Caracterização de bagaço de cana-de-açúcar

As composições do bagaço *in natura* e pré-tratado foram determinadas de acordo com metodologia descrita por Gouveia *et al.* (2009) e Rocha *et al.* (2011). A Figura 3.2 ilustra as etapas do processo de caracterização química, as quais serão descritas com detalhes nos itens 3.2.2.1 a 3.2.2.8.



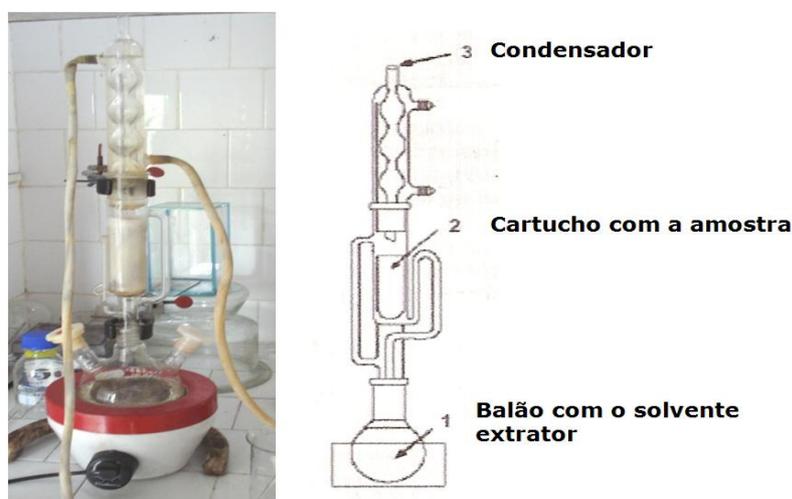
**Figura 3.2** - Procedimento de análise empregado para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.

### 3.2.2.1 Determinação do peso seco de bagaço de cana-de-açúcar

Para a determinação do peso seco, utilizou-se a metodologia do peso constante. Uma massa de 2 g de bagaço foi levada à estufa, à temperatura de 105 °C, e pesada em intervalos regulares de tempo, até peso constante. Antes de cada pesagem, o material foi resfriado em dessecador. O peso seco foi calculado em relação à massa inicial do material (SLUITER *et al.*, 2005).

### 3.2.2.2 Análise de extrativos

Após moagem e peneiramento em tela de 0,841 mm (20 mesh), a extração do bagaço de cana *in natura* foi realizada em um aparelho de Soxhlet (Figura 3.3), utilizando-se como solvente extrator etanol 95%, por um período de 8 horas. Ao final do processo, o material foi seco em estufa, a 105 °C, até peso constante. O percentual de extrativos foi calculado por diferença de massa (SLUITER *et al.*, 2005).



**Figura 3.3** - Esquema de extração com aparelho Soxhlet.

### 3.2.2.3 Hidrólise de bagaço com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%

Amostras de 2 g de bagaço (base seca), *in natura*, livre de extrativos e os obtidos através da etapa de pré-tratamento (Tabela 3.2) foram transferidas para um béquer de 100 mL e tratadas com 12 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (v/v), sob agitação durante 8 minutos, a uma temperatura de 45 °C em banho termostático. Após 8 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada. As amostras foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Como o objetivo de diluir o ácido, adicionou-se água destilada, até

um volume final de 275 mL. Os frascos de Erlenmeyer foram selados com papel alumínio e levados a autoclave durante 30 minutos a 121 °C (1,05 atm), para a completa hidrólise dos oligossacarídeos não hidrolisados. Após a despressurização da autoclave, os frascos contendo os hidrolisados foram retirados e resfriados até a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

O material hidrolisado retirado da autoclave foi filtrado utilizando-se papel de filtro quantitativo, previamente seco e pesado. O hidrolisado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e o sólido (lignina insolúvel mais cinzas da lignina), contido no papel de filtro, foi lavado com porções de 50 mL de água destilada até completar o volume do balão.

Após a separação do hidrolisado, o sólido retido no papel de filtro, foi lavado com 1500 mL de água destilada para a remoção de ânions sulfato o qual foi utilizado para a quantificação de lignina insolúvel e cinzas (GOUVEIA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

#### *3.2.2.4 Determinação do teor de lignina solúvel*

Para a determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido (Item 3.2.2.3) foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o pH da solução foi ajustado para 12,0, com uma solução de NaOH 6M, completando-se o volume com água destilada, correspondendo, assim, a uma diluição de 1:20. Realizou-se a leitura de absorvância do hidrolisado em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 280 nm (ROCHA *et al.*, 2011), empregando-se água como branco. A concentração da lignina foi determinada através de uma curva padrão obtida de lignina isolada a partir do bagaço de cana.

#### *3.2.2.5 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido*

O material insolúvel retido no papel de filtro, proveniente da etapa de hidrólise ácida (Item 3.2.2.3), após lavagem com 1500 mL de água destilada, foi seco em estufa à 105 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco, descontando-se a massa de cinzas presente na lignina (GOUVEIA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

### 3.2.2.6 Determinação do teor de cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram transferidos quantitativamente para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados. Posteriormente, as amostras foram calcinadas a 300 °C por aproximadamente 1 hora e, então, a 800 °C por 2 horas. Ao final do processo, os cadinhos, contendo as cinzas, foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas, presente na lignina insolúvel, foi quantificada em balança analítica (GOUVEIA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

A massa obtida foi utilizada para a subtração a partir do resíduo sólido total, obtido após a etapa de filtração (Item 3.2.2.3), obtendo-se assim, o teor de lignina insolúvel conforme descrito no item 3.2.2.5.

### 3.2.2.7 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais (em triplicata), foram pesados aproximadamente 2 g de bagaço (base seca) em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Estes materiais foram inicialmente calcinados a 300 °C por aproximadamente 1 hora e, então, a 800 °C por 2 horas. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas determinada em balança analítica (GOUVEIA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

### 3.2.2.8 Quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação

A identificação e quantificação dos compostos presentes no hidrolisado, obtido a partir da hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (Item 3.2.2.3), foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1100), coluna HPX87H (BIO-RAD), temperatura de 60 °C, fase móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM e fluxo de 0,6 mL/min (SLUITER *et al.*, 2006). A identificação e quantificação dos componentes (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural) foram realizadas tendo-se como base uma curva de padrão.

Para a determinação da quantidade final dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, realizou-se uma correção através dos fatores de conversão de cada um dos compostos identificados e quantificados (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3** - Fatores de conversão dos componentes precursores de celulose (C) e hemicelulose (H) (ROCHA, 2000; SLUITER *et al.*, 2008).

Componente	Fator de Conversão
Celobiose (C)	0,95
Glicose (C)	0,90
Manose (H)	0,90
Galactose (H)	0,90
Xilose (H)	0,88
Arabinose (H)	0,88
Ácido Acético (H)	0,72
Furfural* (H)	1,37
Hidroximetilfurfural** (C)	1,29
Ácido Fórmico***	3,09

\* produto de degradação de pentoses

\*\* produto da degradação de hexoses

\*\*\* degradação do hidroximetilfurfural

### 3.2.2.9 Análise química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado)

A identificação e quantificação dos compostos presentes nos hidrolisados ácidos hidrotérmicos foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1100), nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.8. Para a determinação da lignina solúvel foi empregado o método descrito no item 3.2.2.4.

Realizou-se também, uma etapa de pós-hidrólise, empregando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%, a 121 °C (1,05 atm), em autoclave, durante 1 hora, para a identificação de oligossacarídeos que não se apresentavam na forma livre (ÖHGREN *et al.*, 2007).

### 3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises morfológicas de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e pré-tratado nas condições definidas pelo planejamento experimental (Tabela 3.2), foram realizadas

empregando-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura. As micrografias foram obtidas em um equipamento JSM (modelo 5900 LV), com uma voltagem de 10 kV e em diferentes magnificações.

Para as análises as amostras foram fixadas com fita de carbono e submetidas à metalização, através da deposição de um filme de ouro com controle de espessura, em atmosfera de argônio, durante 60 segundos.

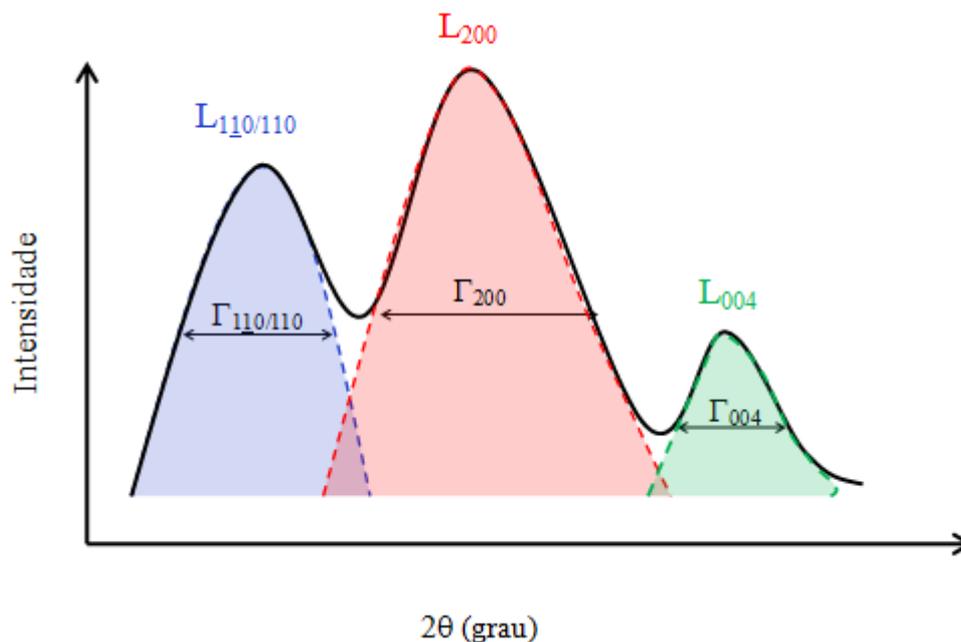
Todas essas análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM–Campinas/SP.

### 3.2.4 Difratometria de raios-X (DRX)

Com o objetivo de se avaliar as alterações nos cristais de celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar, amostras de bagaço *in natura* e pré-tratados foram preparadas para análise de difratometria de raios-X. Em tais análises, utilizou-se um difratômetro de raios-X da marca Shimadzu, modelo XRD-6000, com um tubo de cobre gerador de raios-X com filamento de tungstênio ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) e monocromador de grafite. As condições aplicadas foram: 40 kV, intervalo angular  $4^\circ$  a  $60^\circ$  (ângulo de Bragg- $2\theta$ ), variação angular  $0,05^\circ$  e tempo de contagem de 1s. As análises foram realizadas no Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP.

Os dados de cada uma das análises de DRX das diferentes amostras foram utilizados para a elaboração de gráficos de intensidade de sinal *versus*  $2\theta$  (graus), representados sob a forma apresentada na Figura 3.4.

Através do software OriginPro® 7.0, foram obtidas curvas gaussianas ajustadas aos valores experimentais, bem como a definição dos valores das constantes características (ângulo referente à intensidade máxima e largura do pico à meia altura, como parâmetros principais nesta análise) de cada um dos dois sinais ajustados (Apêndice B). O terceiro sinal foi desconsiderado no ajuste matemático por apresentar pouca intensidade e pouca resolução em relação aos demais. Os gráficos típicos de difração de raios-X em celulose possuem algumas características intrínsecas que fornecem algumas informações a respeito da cela unitária do cristal de celulose, bem como sinais referentes à difração dos raios incidentes em relação a determinados planos cristalográficos determinados pelos índices de Miller, como representado pela Figura 3.4.

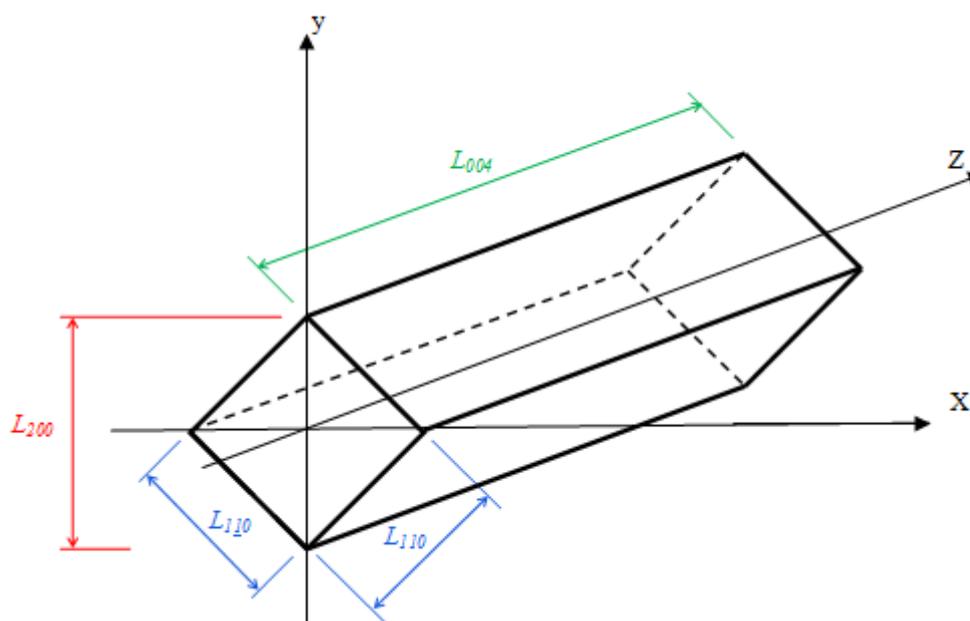


**Figura 3.4** - Representação de um difratograma de raios-X tipicamente obtido para amostras de celulose, bem como a identificação dos diferentes sinais de acordo com os índices de Miller. (Adaptado de DRIEMEIER; SANTOS; BUCKERIDGE, 2012).

De acordo com a Figura 3.4, cada sinal gerado na análise está relacionado a um parâmetro do cristalito, ou seja, a medida das distâncias dispostas de acordo com os planos cristalográficos que interagem com a radiação incidente, sendo cada conjunto de planos representado pelos índices  $hkl$  e identificados de acordo com a mesma figura. A Figura 3.5 ilustra os valores de  $L$  relacionados com os índices de Miller considerados.

Para o cálculo da largura dos parâmetros do cristalito ( $L_{hkl}$ ) (Figura 3.5), foi utilizada a Equação de Scherrer (Equação 3.4) (DRIEMEIER; SANTOS; BUCKERIDGE, 2012).

$$L_{hkl} = \frac{0,9 \cdot \lambda}{\left( \Gamma_{hkl}^2 - \Gamma_{inst}^2 \right)^{1/2} \cdot \cos(\theta)} \quad (3.4)$$



**Figura 3.5** - Parâmetros do cristalito que podem ser obtidos através dos dados obtidos para os difratogramas das amostras de celulose.

Na Equação 3.4,  $\Gamma_{\text{inst}}$  é um parâmetro empírico, referente a características de construção do equipamento de difratometria de raios-X utilizado, que é obtido através da análise de uma amostra cristalina padrão (geralmente alumina), utilizando-se o mesmo equipamento no qual serão analisadas as amostras de interesse. Porém, como a magnitude de  $\Gamma_{\text{inst}}$  é pouco significativa perto dos valores obtidos para  $\Gamma_{\text{hkl}}$ , o seu valor é tomado como nulo. O parâmetro  $\lambda$  é referente ao comprimento de onda utilizado pelo equipamento; o valor para análise das amostras foi de  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ . O valor de  $\theta$  utilizado foi obtido a partir dos valores de  $2\theta$  à máxima intensidade, dividindo-se os valores obtidos pelo ajuste por 2. E, finalmente, os valores de  $\Gamma_{\text{hkl}}$  foram obtidos através do ajuste das curvas de acordo com a distribuição gaussiana, que forneceram os valores ajustados de largura de pico à meia altura. Ao final, os valores de  $L_{\text{hkl}}$  obtidos são dados em angstrom ( $\text{\AA}$ ).

### 3.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas com o objetivo de se verificar variações na estrutura química (grupos funcionais) dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar após o processo de pré-tratamento. Tais análises foram realizadas em um espectrofotômetro Spectrum GX-FTIR System (Perkin Elmer), disponível no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). As

amostras de bagaço de cana foram submetidas a uma etapa de peneiramento (abertura da peneira: 0,42 mm) e secas em estufa a 60 °C por 2 horas, juntamente com o padrão, KBr.

Pastilhas de KBr foram preparadas, a partir de maceração de 200 mg de KBr e 2 mg de amostra, em um almofariz Gral de ágata,. Em seguida, a mistura foi colocada em um molde pastilhador de aço inoxidável, o qual foi submetido a vácuo durante 5 minutos e pressionado até 15 kgf.cm<sup>-2</sup>, para a formação da pastilha. O mesmo procedimento foi realizado apenas para o padrão (KBr). Em seguida, foram medidos os espectros na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO E COM ÁCIDO MAIS CONCENTRADO

A aplicação da técnica de planejamento experimental e análises de superfícies de resposta permitiram a determinação das condições de pré-tratamento em que se obteve a maior solubilização de hemicelulose, (*H<sub>5</sub>%*), e uma maior concentração de celulose (*C%*) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar, no intervalo estudado. Partindo dos resultados obtidos, novos pré-tratamentos foram realizados. Neste estudo, foram realizados pré-tratamentos hidrotérmicos e ácidos (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%, m/v), em duas temperaturas diferentes (186 e 195 °C). O bagaço utilizado nesses novos ensaios foi oriundo da safra 2010/2011. As condições aplicadas ao pré-tratamento encontram-se na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** – Condições experimentais aplicadas aos pré-tratamentos (hidrotérmico e ácido) de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]*
A	8	186	0,0
B	8	195	0,0
C	8	186	1,0
D	8	195	1,0

\* m/v

Os pré-tratamentos, realizados de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.4, foram conduzidos conforme a metodologia descrita no item 3.2.1.

A caracterização química do bagaço, *in natura* e pré-tratado, foi realizada de acordo com metodologia apresentada no item 3.2.2.

### 3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Para a produção das enzimas celulolíticas, realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPE, foi utilizado o micro-organismo *Trichoderma reesei* RUT C30, cedido pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

A propagação do micro-organismo e obtenção de esporos foi realizada por meio da suspensão de liofilizado em 1,0 mL de água destilada estéril e do cultivo em placas de Petri durante sete dias a 30 °C. Após o crescimento, as placas foram mantidas sob refrigeração a 5 °C. Para o cultivo, foi utilizado o meio BDA (batata dextrose agar), cuja composição está descrita na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5** - Composição do meio BDA.

Composição	Concentração (g/L)
Extrato de Batata	200
Glicose ou Dextrose	20
Ágar	15

Para a produção de enzimas, o meio de cultivo, descrito na Tabela 3.6, foi adaptado do descrito por Mandels e Weber (1969), utilizando-se lactose como fonte de carbono para indução da produção de celulases. Os componentes do meio de cultivo foram solubilizados, ao invés de em água, em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar, para induzir a produção de xilanases. A formulação foi baseada em trabalhos prévios realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos-UFPE (SILVA, 2010; SILVA; SANTOS; SOUTO-MAIOR, 2011).

O hidrolisado foi obtido por pré-tratamento da palha em reator rotatório de 20 L de capacidade nominal (AU/E-20, Regmed Indústria Técnica Ltda) (Figura 3.1). As condições de pré-tratamento foram as seguintes: concentração 5% (m/v), 165 °C, 16 minutos. A composição química do hidrolisado, determinada sob as condições descritas no item 3.2.2.9, encontra-se na Tabela 3.7.

**Tabela 3.6** - Composição do meio de produção de enzimas (MANDELS; WEBER, 1969).

Reagentes	Concentração (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00
CaCl <sub>2</sub>	0,30
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,30
Peptona	0,75
Extrato de levedura	0,25
Fonte de Carbono	10,00
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,005
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,020
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,0016
ZnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,0014

**Tabela 3.7** - Composição do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar.

Componente	Concentração (g/L)	
	Amostra original	Pós-hidrólise*
Glicose	N.D	0,56
Xilose	0,12	1,51
Arabinose	0,30	0,51
Ácido Fórmico	0,13	0,11
Ácido Acético	0,17	0,18
HMF	N.D	0,02
Furfural	0,001	0,05

N.D: não determinado; HMF: Hidroximetilfurfural.

\* Pós-hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4%.

É importante ressaltar que o hidrolisado foi utilizado na forma em que foi obtido no pré-tratamento, ou seja, sem uma pós-hidrólise. A pós-hidrólise foi realizada apenas para a identificação da presença de oligossacarídeos. O principal componente presente no hidrolisado eram xilo-oligossacarídeos.

O inóculo foi preparado com 10% do volume de meio, utilizando-se lactose como fonte de carbono numa concentração de 10 g/L, feito em duplicata com 200 mL de meio e 1 mL da suspensão de esporos do micro-organismo *Trichoderma reesei* RUT C30. Em seguida a mistura foi incubada a 30 °C, 250 rpm em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, modelo C25KC), por um período de 36 horas.

A produção foi conduzida em um biorreator de bancada com volume útil de 2L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific) (Figura 3.6), com 500 rpm, 2 vvm, 28 °C e pH 5,0. O controle do pH foi realizado através da adição automática de solução de ácido sulfúrico 3 M e hidróxido de sódio 3 M, e, para o controle da espuma, utilizou-se o antiespumante polipropilenoglicol P 2000 (Fluka Analytical).

O perfil do processo foi observado através das retiradas de amostras. As amostras foram filtradas para determinação da concentração de biomassa, análise cromatográfica e atividades enzimáticas.



**Figura 3.6** - Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado na produção de enzimas.

### 3.4.1. Determinação das atividades enzimáticas

A determinação das atividades enzimáticas, detalhada a seguir, foi realizada com base na metodologia de Ghose (1987).

#### 3.4.1.1 Atividade em papel de filtro

A atividade em papel de filtro foi realizada de duas formas. Durante a produção foi determinada a atividade FPase (atividade de celulase total sobre papel de filtro), devido ao fato de se ter baixas concentrações de glicose. Assim, durante o ensaio enzimático, não se conseguia liberar 2 mg de glicose, como recomendado na metodologia de Ghose (1987). Na amostra final foi realizada a determinação da atividade FPU (Unidade de Papel de Filtro). Esta atividade foi utilizada para calcular a carga de enzimas que deveria ser utilizada nos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. O procedimento aplicado para a determinação de ambas as atividades encontra-se detalhado a seguir.

#### Atividade FPase:

Para a determinação da atividade foram utilizados os seguintes reagentes: tiras de papel de filtro Whatman nº 1, medindo 1 cm x 6 cm (aproximadamente 50 mg), tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e reagente DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico).

Para a realização do ensaio enzimático, tiras do papel de filtro, enroladas em formas de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Os tubos foram colocados em banho termostático (TECNAL, TE-2005) a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a amostra (diluída, quando necessário), para que ocorresse o equilíbrio da temperatura. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL da amostra de enzima, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

Em paralelo, foi realizado o ensaio para controle da enzima o qual teve como objetivo a determinação da concentração inicial de açúcares redutores presentes na amostra de enzima. Neste caso, apenas 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL da amostra foram adicionados em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). Um branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

Todas as reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela retirada de 0,5 mL da mistura contida em cada um dos tubos, que foi colocada imediatamente em outros tubos contendo 0,5 mL de DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico). Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose previamente preparada.

#### Atividade FPU:

Para a determinação dessa atividade foram utilizados os mesmos reagentes empregados a determinação da atividade FPase.

Para o ensaio enzimático, tiras do papel de filtro, enroladas em formas de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Os tubos foram colocados em banho termostático (TECNAL, TE-2005) a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a enzima, para que ocorresse o equilíbrio da temperatura. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL de enzima, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

No ensaio para controle da enzima, foi adicionado 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL de enzima em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). O branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

As reações foram conduzidas a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Ao final deste tempo, as reações foram interrompidas pela adição de 3,0 mL de DNSA (ácido 3,5-dinitro salicílico). Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 20 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose previamente preparada

### 3.4.1.2 Atividade em carboximetilcelulose (CMCase)

A determinação da atividade CMCase é baseada na hidrólise de carboximetilcelulose (CMC)

Neste caso, o meio reacional foi composto por 0,25 mL de uma solução de CMC 4% (p/v) e 0,25 mL da amostra. Para o controle da enzima, aos tubos de ensaios foram adicionados apenas 0,25 mL da amostra e 0,25 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi preparado pela adição de 0,25 mL da solução de CMC 4% e 0,25 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

Todos os tubos, contendo o meio reacional, o controle da enzima e o branco, foram incubados a 50 °C, em banho termostático (TECNAL, TE-2005), durante 10 minutos. Ao final deste tempo, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNSA. Os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada e, em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, modelo 8453), a 540 nm, sendo a determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose.

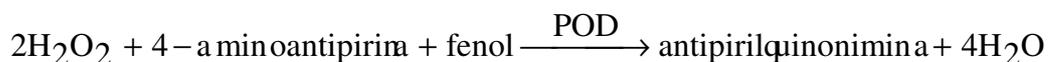
### 3.4.1.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase

O ensaio para a determinação da atividade  $\beta$ -glicosidase utiliza celobiose como substrato. A determinação da concentração de glicose liberada pela  $\beta$ -glicosidase foi realizada através da utilização de um kit de análise de glicose (Reagente GOD-POD, Biosystems), o qual se baseia na reação das enzimas glicose oxidase e peroxidase. A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



Por sua vez, o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação da enzima peroxidase. O produto final dessa reação é a antipirilquinonimina de

coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Tal reação está representada a seguir.



Os ensaios enzimáticos foram utilizados através da adição em tubos de ensaio de 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de uma solução de celobiose 15 mM.

Para o controle, foram adicionados aos tubos de ensaio 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 0,5 mL da amostra de enzima. O branco foi formado por 1,0 mL do reagente GOD-POD, o qual foi utilizado para zerar o espectrofotômetro.

Todos os tubos, contendo a amostra de enzima e substrato, o controle e o branco, foram incubados a 50 °C, durante 30 minutos. Após este tempo, os tubos foram submetidos a um banho a 100 °C por 5 minutos, para a finalização das reações. Em seguida, foram transferidos para um banho em água fria, até atingir a temperatura ambiente. Em uma segunda etapa, a glicose produzida foi determinada pela adição de 0,01 mL da mistura reacional em tubos contendo 1,0 mL do reagente GOD-POD. Os tubos foram incubados em banho termostático a 37 °C, durante 15 minutos. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 505 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada reação enzimática foi realizada através da utilização de uma curva padrão de glicose.

#### 3.4.1.4 Atividade xilanase

Esse método se baseia na determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da xilana.

Para a determinação da atividade enzimática da xilanase, utilizou-se 0,5 mL da amostra e 1,0 mL de solução 1% (p/v) de xilana. Os controles foram formados por 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 0,5 mL da solução de enzima. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi formado utilizando-se apenas 0,5 mL da solução de xilana.

Todos os tubos foram incubados a 50 °C, durante 5 minutos. Ao final deste tempo, 0,5 mL de cada uma das misturas foi colocado imediatamente em outros tubos de ensaio contendo 0,5 mL de reagente DNSA. Os tubos foram colocados em banho a 100 °C, por 5

minutos. Ao final deste tempo, os tubos foram resfriados em banho frio, até atingir a temperatura ambiente. Antes de realizar a leitura da absorbância a 540 nm, foram realizadas diluições das amostras com 6,5 mL de água destilada. A determinação da concentração de xilose liberada em cada reação enzimática foi realizada usando-se uma curva padrão de xilose, previamente preparada.

### 3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

As hidrólises enzimáticas das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados, conforme condições do planejamento experimental (Tabela 3.2) foram realizadas utilizando-se as enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188 ( $\beta$ -glicosidase), cedidas pela Novozymes Latin America Ltda., localizada em Araucária-PR e a enzima produzida no laboratório (Item 3.4). Em relação às amostras de bagaço obtidas por pré-tratamentos hidrotérmico e com ácido mais concentrado (Tabela 3.4), as hidrólises foram realizadas utilizando-se apenas as enzimas comerciais.

#### 3.5.1 Estudo da cinética enzimática

##### 3.5.1.1 Hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado sob condições do planejamento experimental

Foi realizado um estudo cinético utilizando bagaço de cana pré-tratado conforme planejamento experimental (Tabela 3.2), com o objetivo de se verificar o comportamento da hidrólise enzimática ao longo do tempo. Para tanto, foram utilizadas as enzimas comerciais.

Os ensaios de hidrólise foram realizados em um sistema de minirreatores encamisados (Figura 3.7), acoplado a um banho termostático (TECNAL, TE-2005). Foram utilizados 2 g de bagaço de cana (em base seca) em todas as reações, as quais foram realizadas sob as seguintes condições: pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), 50 °C, atividades enzimáticas de 19,27 FPU/g<sub>bagaço</sub>, e 4,07 UI/ g<sub>bagaço</sub> de  $\beta$ -glicosidase (2,93 UI/g<sub>bagaço</sub> da adição da enzima Novozym® 188 + 1,14 UI/ g<sub>bagaço</sub> contida na Celluclast®), mantendo-se uma relação final de 4,7:1 (FPU/ $\beta$ -glicosidase) e um volume reacional final de 80 mL. As atividades determinadas na enzima Celluclast® foram as seguintes: 59,68

FPU/mL, 130,85 UI/mL de xilanase, 2135,15 UI/mL de CMCCase e 3,54 UI/mL de  $\beta$ -glicosidase. A enzima Novozym® 188 apresentou uma atividade de 1484,23 UI/mL de  $\beta$ -glicosidase. Amostras foram retiradas nos tempos de hidrólise: 0,5, 4, 8, 24, 34, 48, 72 e 100 horas. As amostras retiradas foram submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo, para inativação das enzimas. Em seguida, foram centrifugadas e filtradas em membranas 0,22  $\mu$ m, para análise cromatográfica.



**Figura 3.7** – Hidrólise enzimática realizada em minirreatores encamisados.

A conversão enzimática da celulose ( $CC\%$ ), presente nas amostras de bagaço pré-tratado foi obtida através da Equação 3.5.

$$CC(\%) = \frac{\text{Glicose liberada}(g)}{1,111 \cdot \text{Celulose}(g)} \cdot 100 \quad (3.5)$$

onde:

1,111= Fator de conversão de celulose em glicose.

A massa de celulose foi determinada através da análise de composição química do bagaço pré-tratado e a de glicose através de cromatografia líquida de alta eficiência

(Agilent 1100), nas seguintes condições: coluna HPX 87H (BIO-RAD), temperatura de 60 °C, fase móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, e fluxo de 0,6 mL/min, detector índice de refração.

### *3.5.1.2 Hidrólise de bagaço pré-tratado sob condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado*

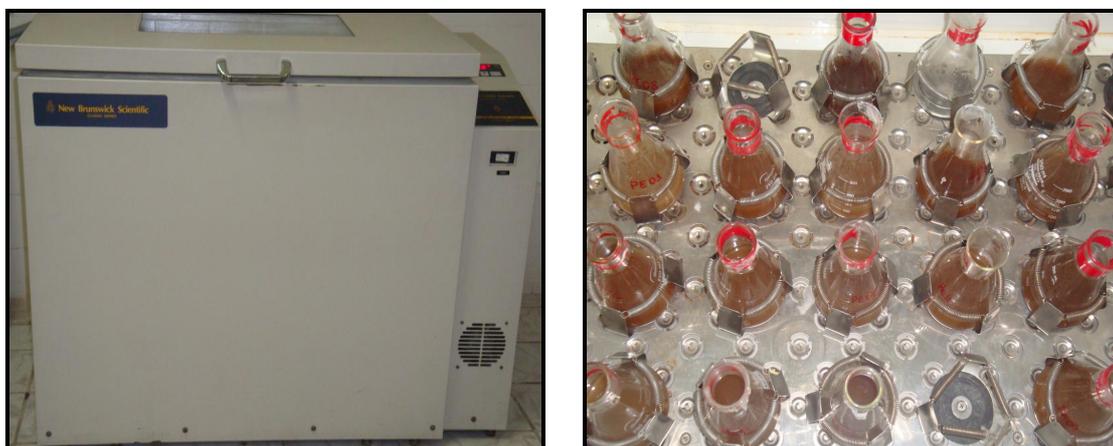
Por fim, realizaram-se também hidrólises enzimáticas com os bagaços pré-tratados conforme as condições apresentadas na Tabela 3.4. Nesse caso, empregou-se o mesmo sistema reacional e as mesmas condições de temperatura e pH descritos anteriormente. Enzimas comerciais foram utilizadas, mantendo-se uma relação final de 4:1 (FPU/ $\beta$ -glicosidase), com 20 FPU/g<sub>bagaco</sub>. O volume final foi de 100 mL e a concentração final de bagaço de 2,0% (m/v). Amostras foram retiradas nos tempo de 0, 24, 48 e 72 horas de hidrólise.

### **3.5.2 Comparação de hidrólise enzimática realizada com enzimas comerciais e com enzimas produzidas no laboratório**

A hidrólise de bagaços pré-tratados nas condições de planejamento experimental foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL com um volume reacional de 100 mL, durante 72 horas, sendo este tempo determinado após o estudo cinético, descrito no item 3.5.1.1

Os ensaios foram realizados utilizando-se tanto enzimas comerciais quanto as produzidas no Laboratório de Processos Biotecnológicos. Para as duas misturas de enzimas, as condições de hidrólise foram: concentração de bagaço de 2,0% (m/v), pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), 50 °C e agitação de 150 rpm, em mesa agitadora (New Brunswick Scientific, modelo C25KC) (Figura 3.8). No caso das enzimas comerciais, a carga enzimática foi de 20 FPU/g<sub>bagaco</sub> e 5 UI/g<sub>bagaco</sub> de  $\beta$ -glicosidase (4 UI/g<sub>bagaco</sub> da adição da enzima Novozym® 188 + 1 UI/ g<sub>bagaco</sub> contida na Celluclast®) mantendo dessa forma, uma relação final de atividade de 4:1 (FPU/ $\beta$ -glicosidase). Já no caso da enzima produzida no laboratório, manteve-se uma atividade de 20 FPU/g<sub>bagaco</sub>, e 6,4 UI/ g<sub>bagaco</sub> de  $\beta$ -glicosidase, sendo a relação FPU: $\beta$ -glicosidase neste caso de 3:1 As atividades enzimáticas determinadas na enzima produzida no laboratório foram as seguintes: 1,00 FPU/mL, 13,00 UI/mL de xilanase, 12,70 UI/mL de CMCase e 0,32 UI/mL de  $\beta$ -glicosidase

Amostras foram retiradas ao final de 72 horas de hidrólise, submetidas a um banho em ebulição durante 5 minutos, em seguida, a um banho de gelo e, finalmente, centrifugadas e filtradas em membranas 0,22  $\mu\text{m}$ . As amostras foram preparadas para identificação por HPLC, nas condições descritas no item 3.5.1.1.



**Figura 3.8** – Hidrólise enzimática realizada em frasco Erlenmeyer (250 mL) em mesa agitadora (New Brunswick Scientific, modelo C25KC).

Realizou-se, ainda, a hidrólise enzimática, em minirreatores (Figura 3.7), dos bagaços pré-tratados nas condições: 8 min, 186 °C,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05% (Ensaio 03) e 8 min, 186 °C,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,20% (Ensaio 07). Os bagaços obtidos nessas duas condições de pré-tratamento foram escolhidos devido ao fato de terem apresentado as melhores conversões de celulose em glicose, durante a hidrólise realizada em frascos agitados.

As hidrólises foram realizadas utilizando-se enzimas produzida no laboratório, nas seguintes condições: 20 FPU/ $\text{g}_{\text{bagaço}}$ , 50 °C, volume final de 100 mL, e concentração final de bagaço de 2,0% (m/v). Amostras foram retiradas nos tempo de 0, 24, 48 e 72 horas de hidrólise, submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo, para inativação das enzimas. As mesmas foram centrifugadas e filtradas em membranas 0,22  $\mu\text{m}$ , para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

### 3.5.3 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica em biorreator

#### 3.5.3.1 Hidrólise enzimática

Foi realizada a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, nas condições de 186 °C,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,20%, durante 8 minutos, que corresponde ao ensaio 07, descrito pelo planejamento experimental. O bagaço pré-tratado nestas condições foi

escolhido devido ao fato de que, de uma forma geral, apresentou os melhores resultados de conversão enzimática de celulose em glicose. Neste caso, a hidrólise foi realizada em biorreator de bancada instrumentado, com volume útil de 1 L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific), utilizando-se as enzimas produzidas no laboratório, conforme metodologia descrita no item 3.4. As condições empregadas foram as seguintes: 300 rpm, 50 °C, pH 4,8, cujo controle foi realizado através da adição automática de solução de ácido sulfúrico 3 M e hidróxido de sódio 3 M, atividade de 20 FPU/g<sub>bagaço</sub>. O volume reacional foi de 700 mL com concentração final de bagaço de 2,0% (m/v).

Inicialmente, foi adicionado apenas o tampão ao biorreator e após a temperatura atingir 50 °C foi adicionado o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, os quais ficaram sob agitação durante 30 minutos. O caldo enzimático, previamente aquecido a 50 °C em banho termostático (TECNAL, TE-2005), foi adicionado ao biorreator, dando-se início à hidrólise propriamente dita.

Amostras foram retiradas em diferentes tempos até um tempo total de 72 horas, submetidas a um banho em ebulição, durante 5 minutos, e posterior banho de gelo, para inativação das enzimas e, finalmente, centrifugadas e filtradas em membranas 0,22 µm. A análise para identificação dos componentes liberados durante a hidrólise foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência, conforme item 3.5.1.1.

### 3.5.3.2 Fermentação alcoólica

Ao final das 72 horas de hidrólise enzimática, descrita no item 3.5.3.1, foi realizada a fermentação do hidrolisado sem a separação das frações sólida (celulignina) e líquida (hidrolisado enzimático). Uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (UFPEDA 1238), cedida pela Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, foi utilizada para a produção de etanol.

Antes da inoculação da levedura, a temperatura do sistema reacional foi reduzida para 35 °C, mantendo-se a agitação de 300 rpm e pH 4,8. Alcançada a temperatura de 35 °C, foram adicionados 35 mL de meio de enriquecimento, composto por 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona.

O inóculo foi cultivado em mesa agitadora, a 35 °C, sob agitação de 250 rpm, durante 20 horas, em meio contendo: glicose (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e

peptona (20 g/L). Ao hidrolisado enzimático, já acrescido com o meio de enriquecimento, foi adicionado 5% (v/v) do inóculo.

A fermentabilidade do hidrolisado enzimático foi analisada por meio do rendimento em etanol oriundo de glicose,  $Y_{P/S}$ , e da produtividade de etanol,  $Q_P$ , calculados conforme as Equações 3.6 e 3.7.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3.6)$$

$$Q_P = \frac{P}{t} \quad (3.7)$$

onde:

$S$  = concentração de substrato (g/L)

$P$  = concentração de produto (g/ L)

$Y_{P/S}$  = rendimento de produto em substrato (g/g)

$Q_P$  = produtividade de etanol (g/L/h)

---

---

# *CAPÍTULO 4*

---

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Este capítulo apresenta os resultados obtidos em todos os experimentos realizados durante o desenvolvimento da Tese, assim como a discussão dos mesmos. Primeiro são apresentados os resultados referentes ao pré-tratamento e à caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar. Também serão apresentados os resultados relativos à produção de enzimas e, por fim, a susceptibilidade do bagaço, pré-tratado em diferentes condições, à hidrólise enzimática.*

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO DE ACORDO COM APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

#### 4.1.1 Caracterização química da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar

As caracterizações químicas do bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas nas amostras obtidas de acordo com as condições do planejamento experimental.

Os resultados de caracterização química das amostras sólidas de bagaço *in natura* e pré-tratados estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado no planejamento experimental, em termos dos principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina), aproxima-se da obtida por outros autores. Rocha *et al.* (2012) caracterizaram quimicamente diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar, considerando diferentes variedades e encontraram uma composição média de 43,1% para celulose, 25,2% para hemicelulose e 22,9% para lignina. Silva *et al.* (2010) encontraram 42,8% de celulose, 25,9% de hemicelulose e 22,1% de lignina.

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

Componentes	Composição (% m/m)
Celulose	40,10 ± 0,93
Hemicelulose	27,49 ± 0,67
Lignina total	18,52 ± 0,76
Cinzas	5,75 ± 0,14
Extrativos em etanol	5,44 ± 0,14
Total	97,30 ± 2,64

A partir dos dados de caracterização do bagaço pré-tratado (Tabela 4.2), é possível se observar que tanto as concentrações de celulose ( $C\%$ ) quanto as de lignina ( $L\%$ ) sofreram um aumento, quando comparada ao bagaço de cana *in natura* (Tabela 4.1). Tal fato está relacionado com a redução na quantidade de hemicelulose ( $H\%$ ), indiferente da condição aplicada no pré-tratamento, quando comparada ao bagaço de cana *in natura*, provocando assim, um aumento relativo no teor de tais componentes na fração sólida de bagaço pré-tratado.

**Tabela 4.2** - Composição química (m/m) da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada em diferentes condições.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	45,64 ± 1,23	20,01 ± 0,92	24,07 ± 0,60	4,72 ± 0,80
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	47,72 ± 2,28	19,93 ± 1,37	23,35 ± 0,17	4,22 ± 0,18
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	60,49 ± 0,87	3,35 ± 0,08	29,33 ± 0,63	7,31 ± 0,54
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	61,24 ± 0,41	2,58 ± 0,17	29,64 ± 0,57	5,26 ± 1,61
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	49,52 ± 0,60	15,32 ± 0,10	26,04 ± 0,13	6,19 ± 0,92
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	53,04 ± 0,48	14,93 ± 0,42	25,63 ± 0,41	4,98 ± 0,58
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	58,52 ± 0,20	1,79 ± 0,06	29,05 ± 0,65	8,05 ± 1,02
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	58,06 ± 1,78	1,24 ± 0,04	30,30 ± 0,45	3,55 ± 0,27
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	57,41 ± 0,04	7,74 ± 0,02	25,73 ± 0,50	4,08 ± 0,45
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	56,67 ± 0,23	7,38 ± 0,12	26,26 ± 0,29	3,27 ± 0,22
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	56,02 ± 0,02	7,68 ± 0,28	26,29 ± 0,69	3,75 ± 0,63

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico

#### **4.1.2 Solubilização dos componentes de bagaço de cana-de-açúcar determinada a partir da caracterização química da fração sólida**

A solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) é um dos parâmetros utilizados na determinação da eficiência do pré-tratamento aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar. No presente trabalho, foi verificado que, durante os ensaios de pré-tratamento, a fração sólida de bagaço inicialmente submetida ao processo sofreu uma solubilização, a qual variou em função das condições de pré-tratamento aplicadas.

Para a determinação da solubilização dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, foi utilizada a Equação 3.3 (Item 3.2.1). Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores de rendimento global das frações sólidas de bagaço obtido durante o pré-tratamento, determinados por análise gravimétrica (Equação 3.2), assim como os valores de solubilização dos componentes macromoleculares.

Em relação aos rendimentos das frações sólidas de bagaço obtidas após pré-tratamento, ocorreu uma variação de 50,74 a 78,94%, o que corresponde a uma redução de massa de bagaço da ordem de 49,26 a 21,06%. Percebe-se ainda que, de forma geral, tal redução foi maior quando se empregou a maior temperatura de pré-tratamento (186 °C). Geddes *et al.* (2010), ao tratarem bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor, associada à ácido fosfórico 1% (m/m), obtiveram perdas que variaram de 17 a 34%, sendo a perda máxima alcançada quando se empregou a temperatura de 180 °C. Silva *et al.* (2010) conseguiram solubilizar 44,5% de bagaço de cana-de-açúcar quando submetido à pré-tratamento hidrotérmico a 185 °C, durante 10 minutos.

**Tabela 4.3** – Rendimento da fração sólida e solubilização dos componentes macromoleculares de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y (%)	C <sub>S</sub> (%)	H <sub>S</sub> (%)	L <sub>S</sub> (%)
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	73,23 ± 1,80	16,65	46,70	4,82
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	78,94 ± 3,07	6,06	42,77	0,47
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	55,37 ± 1,64	16,48	93,25	12,31
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	53,76 ± 1,00	17,90	94,95	13,96
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	70,80 ± 1,97	12,57	60,54	0,45
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	65,33 ± 1,66	13,59	64,52	9,59
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	54,30 ± 0,34	20,76	96,46	14,83
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	52,52 ± 0,60	23,97	97,63	14,07
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	50,74 ± 0,94	27,36	85,71	29,51
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	54,33 ± 0,32	23,22	85,41	22,96
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	58,96 ± 0,16	17,63	83,53	16,30

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico; Y: rendimento da fração sólida de bagaço; C<sub>S</sub>: Celulose solubilizada; H<sub>S</sub>: Hemicelulose solubilizada; L<sub>S</sub>: Lignina solubilizada.

Em relação à solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina), apresentados na Tabela 4.3, a hemicelulose foi o componente que sofreu maior solubilização, a qual variou de 42,77 a 97,63%, sendo que os maiores valores alcançados correspondem aos ensaios 03, 04, 07 e 08, que tiveram os mais baixos valores de hemicelulose residual na fração sólida de bagaço pré-tratado (Tabela 4.2). Assim, a alta solubilização alcançada é um indicativo da eficiência do pré-tratamento aplicado, uma vez que o principal objetivo do pré-tratamento com ácido diluído é a solubilização da hemicelulose, visto que a mesma apresenta uma estrutura amorfa e ramificada, sendo mais facilmente hidrolisada por ácidos (ALVIRA *et al.*, 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A menor estabilidade da hemicelulose ocorre devido ao fato de suas cadeias laterais inibirem a formação de ligações de hidrogênio, o que a torna muito mais acessível ao ataque hidrolítico (BOBLETER, 1994).

Celulose e lignina, por outro lado, foram menos solubilizados, tornando-se assim os principais componentes do bagaço pré-tratado, como apresentado na Tabela 4.2. Em relação à celulose, esta é conhecida como sendo um componente mais recalcitrante à hidrólise com ácido diluído, o que justifica o fato de ter sido menos hidrolisada que a hemicelulose. Isto ocorre devido ao fato de que as ligações de hidrogênio intramoleculares fazem com que a molécula de celulose apresente uma estrutura mais rígida (BOBLETER, 1994; CANILHA *et al.*, 2011).

Em relação à lignina, o mecanismo que ocorre durante o pré-tratamento ácido da mesma ainda não é bem esclarecido pela literatura. Diferentes autores encontraram resultados diversos quanto à solubilização da mesma. Oliveira (2010), ao pré-tratar a palha de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído (1%, m/v) a 185 °C, durante 10 minutos, em reator rotatório, solubilizou 40,6% de lignina. Por outro lado, Rocha *et al.* (2011), trabalhando com uma mistura de ácido sulfúrico 1% (m/v) e ácido acético 1% (m/v) como agente catalítico no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, a 190 °C por 10 minutos, no mesmo tipo de reator, conseguiu uma solubilização de lignina de apenas 4,7%. Liu e Wyman (2003) ao hidrolisarem resíduos da colheita do milho com água quente comprimida observaram que uma pequena fração de lignina foi dissolvida (cerca de 10%) numa temperatura de 180 °C.

Uma possível explicação para a solubilização da lignina é que, uma vez que a hemicelulose e a lignina estão covalentemente ligadas nos materiais lignocelulósicos *in natura*, a solubilidade relativamente elevada de oligômeros de cadeia curta das hemiceluloses poderia promover a dissolução de fragmentos de lignina anexados, os quais apresentam solubilidade mais limitada, particularmente para fragmentos de lignina de alto peso molecular. Estas frações de lignina solubilizadas podem, entretanto, em altas temperaturas se condensarem e precipitarem sobre as fibras residuais (LIU; WYMAN, 2003).

Na Tabela 4.4 é feita uma comparação dos resultados obtidos neste trabalho para o bagaço pré-tratado com 0,20% de ácido fosfórico, a 186 °C, durante 8 minutos (Ensaio 07), com bagaço de cana pré-tratado sob condições diferentes, reportados na literatura. Os pré-tratamentos foram realizados no mesmo tipo de reator. A comparação foi realizada levando em consideração dois diferentes estudos: (i) um processo catalisado com uma mistura de ácido diluído–ácido sulfúrico 1% e ácido acético 1% (ROCHA *et al.*, 2011) e (ii) um pré-tratamento hidrotérmico (SILVA *et al.*, 2010).

Comparando-se o pré-tratamento com ácido fosfórico com o pré-tratamento hidrotérmico realizado por Silva *et al.* (2010), observa-se que o uso de baixa concentração de ácido fosfórico como catalisador para o pré-tratamento de bagaço de cana é muito mais eficiente na remoção de hemicelulose, ocorrendo menor remoção de celulose e lignina.

Com relação aos resultados obtidos com a mistura de ácido sulfúrico e ácido acético (ROCHA *et al.*, 2011), a utilização de ácido fosfórico com uma concentração muito menor mostra uma capacidade ligeiramente superior de solubilizar a hemicelulose, com a vantagem de ser uma fonte de fósforo para a subsequente fermentação do hidrolisado. Porém, ocorreu também uma maior solubilização de celulose.

**Tabela 4.4** - Composição química (m/m) e solubilização dos componentes macromoleculares (m/m) da fração sólida de bagaço após pré-tratamento com ácido diluído e hidrotérmico, em um reator batelada de 20 L.

Componente	Ensaio 07 <sup>a</sup>		Rocha <i>et al.</i> , 2011 <sup>b</sup>		Silva <i>et al.</i> , 2010 <sup>c</sup>	
	Composição (%)	*S <sub>cm</sub> (%)	Composição (%)	*S <sub>cm</sub> (%)	Composição (%)	*S <sub>cm</sub> (%)
Celulose	58,52	20,76	61,65	14,60	58,80	23,80
Hemicelulose	1,79	96,46	2,79	93,40	15,10	67,60
Lignina	29,05	14,83	32,96	4,70	24,80	37,70

<sup>a</sup> Condições de pré-tratamento: ácido fosfórico 0,20% m/v, 186 °C, 8 minutos. Composição do bagaço *in natura*: celulose, 40,1%; hemicelulose, 27,5%; lignina, 18,5%.

<sup>b</sup> Condições de pré-tratamento: ácido sulfúrico 1% m/v, e ácido acético 1% m/v, 190 °C, 10 minutos. Composição do bagaço *in natura*: celulose, 45,5%; hemicelulose, 27%; lignina, 21,1%.

<sup>c</sup> Condições de pré-tratamento: 185 °C, 10 minutos. Composição do bagaço *in natura*: celulose, 42,8%; hemicelulose, 25,9%; lignina, 22,1%.

\* S<sub>cm</sub>: solubilização do componente macromolecular.

### 4.1.3 Análise estatística do planejamento experimental

A aplicação da técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta permite investigar a influência das variáveis em um processo e a interação entre estas variáveis. No presente trabalho, essa técnica foi utilizada na determinação das melhores condições de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, tendo como variáveis independentes: tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico e como respostas: as concentrações de celulose (C%), hemicelulose (H%) e lignina (L%) na fração sólida de bagaço pré-tratado e os percentuais de solubilização de tais componentes a partir das

frações sólidas - celulose solubilizada ( $C_S\%$ ); hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) e lignina solubilizada ( $L_S\%$ ). Os resultados obtidos no planejamento experimental foram analisados em função dos efeitos significativos, coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA). As análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica (Statsoft 7.0) para verificar a significância das variáveis estudadas ao nível de significância de 0,05 ( $\alpha=5\%$ ). Para a validação dos modelos foi utilizada a ANOVA, através da verificação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e da comparação entre os valores de F calculado e tabelado.

#### 4.1.3.1 Concentração de celulose ( $C\%$ ) na fração sólida de bagaço

A análise da influência das variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico) sobre a concentração de celulose ( $C\%$ ) na fração sólida de bagaço mostrou que a temperatura foi estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança. A Tabela de efeitos (Tabela D.1) e de coeficientes de regressão (Tabela D.2) estão apresentadas no Apêndice D.

O modelo codificado que representa a concentração de celulose na fração sólida de bagaço ( $C\%$ ) (Equação 4.1) foi gerado a partir da tabela de coeficientes de regressão (Tabela D.2–Apêndice D), sendo os parâmetros estatisticamente não significativos eliminados do modelo.

$$C\% = 54,94 + 5,30 X_2 \quad (4.1)$$

A Tabela 4.5 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de celulose ( $C\%$ ). Como o coeficiente de correlação foi muito bom ( $R^2=94,68\%$ ) e o valor de F calculado para a regressão apresentou um valor superior ao tabelado ( $F_{0,05; 1; 9}=5,12$ ), é possível concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, ou seja, o modelo é estatisticamente preditivo e significativo, para a faixa estudada.

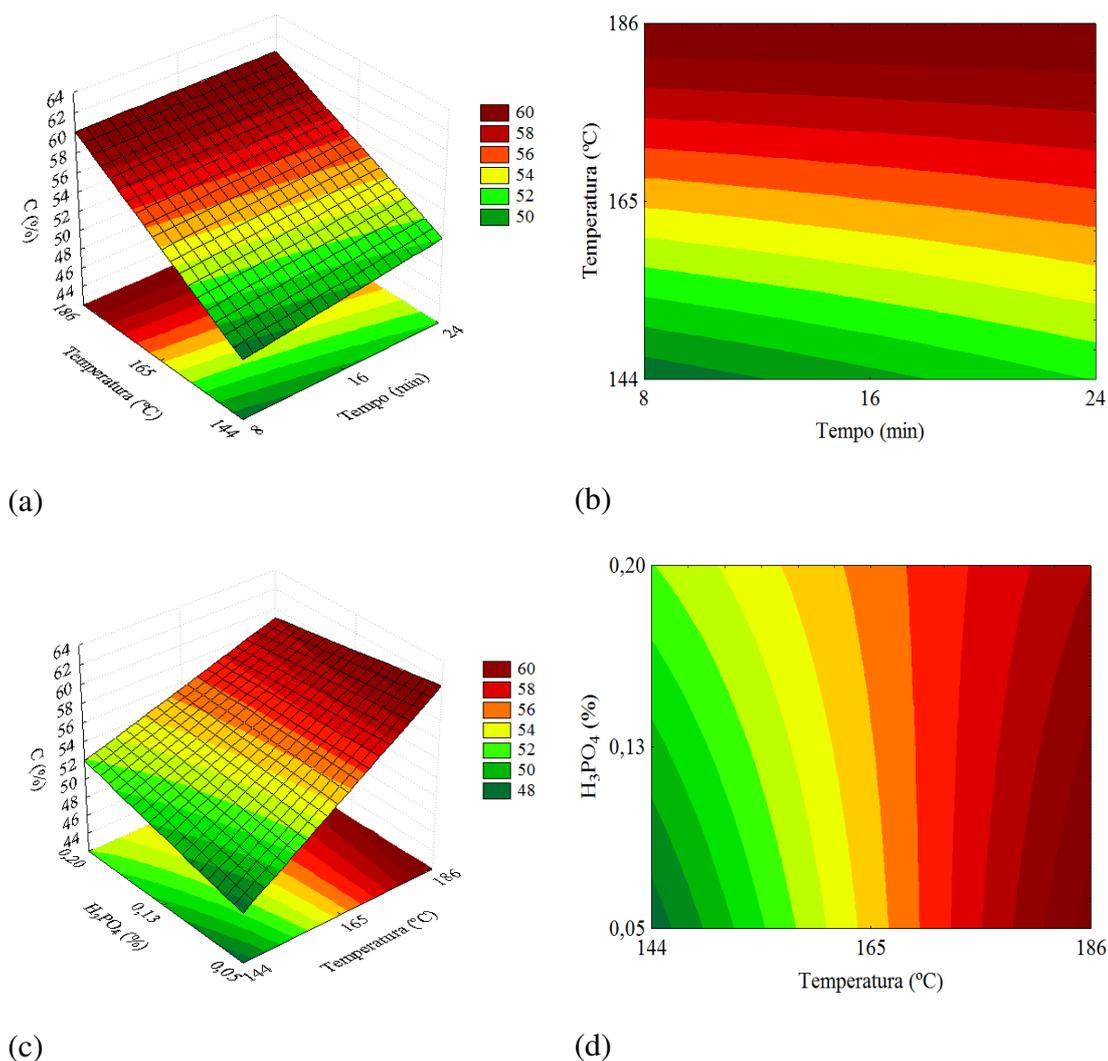
**Tabela 4.5** – ANOVA para a resposta concentração de celulose ( $C\%$ ) na fração sólida de bagaço.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	$R^2$ (%)	p
Regressão	224,61	1	224,61	40,18	94,68	0,000134
Residual	50,29	9	5,59			
Total	274,90	10				

$$F_{0,05; 1; 9} = 5,12$$

A Figura 4.1 mostra as superfícies de resposta e curvas de contorno referentes à concentração de celulose ( $C\%$ ), na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar, construídas com base no modelo representado pela Equação 4.1.

O aumento da concentração de celulose ( $C\%$ ) na fração sólida de bagaço é bastante sensível à variação de temperatura. A elevação da temperatura de 144 para 186 °C provocou um aumento significativo na concentração de tal componente (Figura 4.1). O tempo de pré-tratamento, no intervalo estudado, apresenta uma tendência de influenciar positivamente sobre o aumento da celulose na fração sólida (Figura 4.1a,b). Em relação ao ácido fosfórico (Figura 4.1c,d), o aumento de sua concentração tende a provocar uma elevação na concentração de celulose ( $C\%$ ).



**Figura 4.1** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de celulose ( $C\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).

#### 4.1.3.2 Concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço

Em relação à concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço, a análise estatística revelou que apenas a variável temperatura apresentou significância, ao nível de 95% de confiança (Tabela D.3–Apêndice D).

Através da análise da Tabela 4.6 para a resposta  $H\%$ , verifica-se que a regressão foi altamente significativa ( $p = 0,000002$ ), a percentagem de variação explicada apresentou um valor elevado ( $R^2 = 97,71\%$ ) e o valor de F calculado teve um valor muito superior ao tabelado ( $F_{0,05; 1; 9} = 5,12$ ), a 95%, o que assegura que o modelo codificado que representa a concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço (Equação 4.2), gerado a

partir da tabela de coeficientes de regressão (Tabela D.4 –Apêndice D), é preditivo e significativo.

$$H\% = 9,27 - 7,65 X_2 \quad (4.2)$$

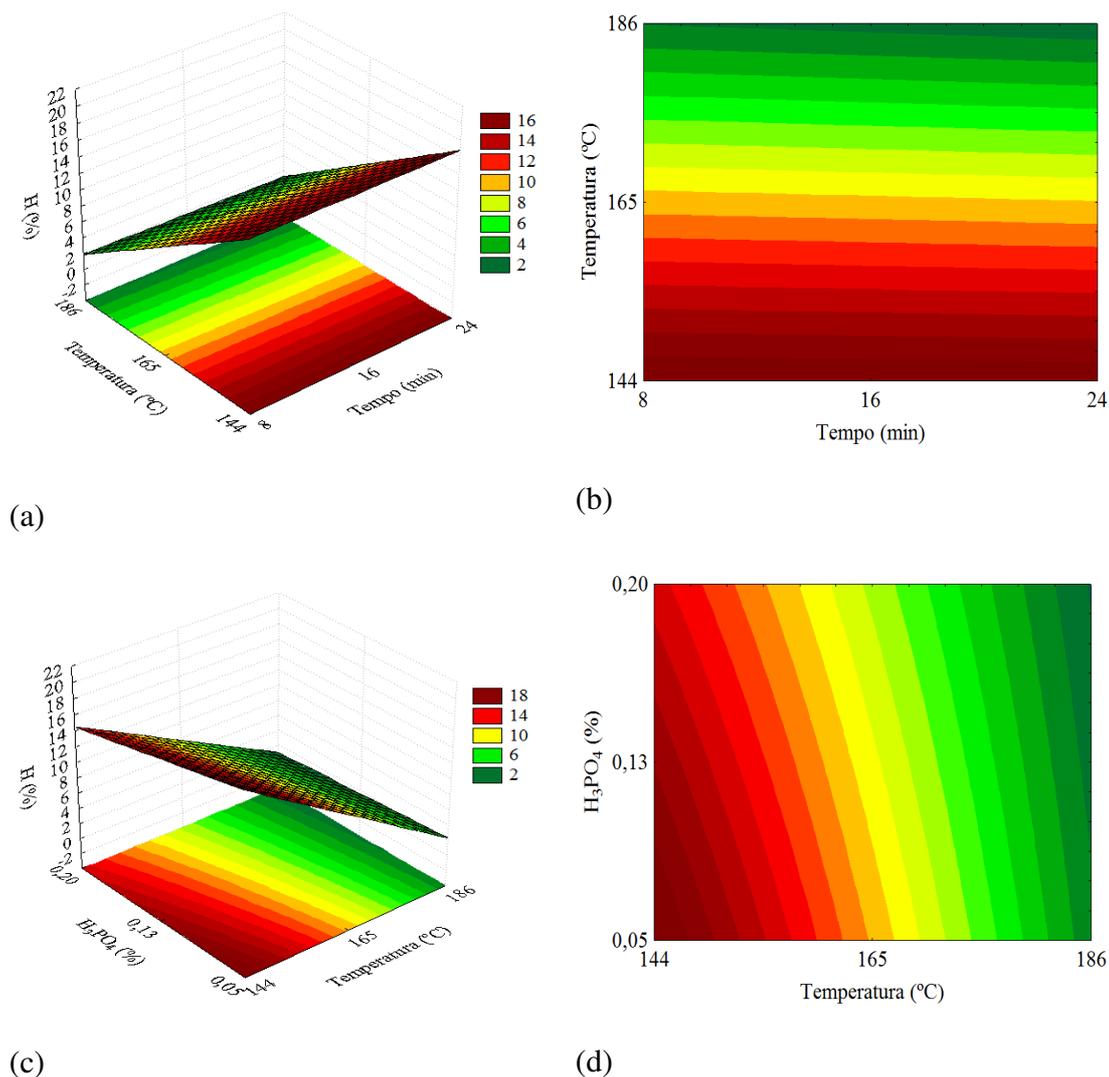
**Tabela 4.6** – ANOVA para a resposta concentração de hemicelulose (H%) na fração sólida de bagaço.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	R <sup>2</sup> (%)	p
Regressão	468,64	1	468,64	112,11	97,71	0,000002
Residual	37,66	9	4,18			
Total	506,30	10				

$$F_{0,05; 1; 9} = 5,12$$

As superfícies de resposta e suas correspondentes curvas de contorno, que representam a concentração de hemicelulose (H%) sobre a fração sólida de bagaço, estão apresentadas na Figura 4.2.

No intervalo estudado, a concentração de hemicelulose (H%), na fração sólida de bagaço pré-tratado é inversamente proporcional ao aumento de temperatura, pois observa-se, claramente, que, à medida que a temperatura foi elevada de 144 para 186 °C, a quantidade de hemicelulose (H%) foi reduzida (Figura 4.2 a, b). A influência do tempo no processo, nas condições estudadas, não foi significativa sobre a redução de hemicelulose (Figura 4.2 a, b). A Figura 4.2 (c e d) confirmou a perda de hemicelulose na fração sólida de bagaço de cana pré-tratado. Percebe-se ainda que, de forma pouco acentuada, o ácido fosfórico, no intervalo estudado, apresenta uma tendência de contribuir na redução de hemicelulose, sendo esta tendência, no entanto, muito pequena quando comparada à temperatura.



**Figura 4.2** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de hemicelulose ( $H\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).

#### 4.1.3.3 Concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço

A análise sobre a resposta concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço, assim como ocorreu para as concentrações de celulose ( $C\%$ ) e hemicelulose ( $H\%$ ), mostrou que a temperatura foi a variável estatisticamente significativa a 95% de confiança (Tabela D.5–Apêndice D).

A Equação 4.3 representa o modelo codificado para a concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço.

$$L\% = 26,88 + 2,40 X_2 \quad (4.3)$$

Os dados referentes à análise de variância para a concentração de lignina ( $L\%$ ) apresentaram um coeficiente de correlação superior a 90% ( $R^2 = 94,87\%$ ) (Tabela 4.7). O valor de F calculado (49,17) foi superior ao tabelado para um nível de confiança de 95% ( $F_{0,05; 1; 9} = 5,12$ ) e o valor de p, obtido a partir da regressão, foi inferior a 5%. Através de tal análise, pode-se concluir que o modelo que representa a concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço (Equação 4.3) é preditivo e significativo.

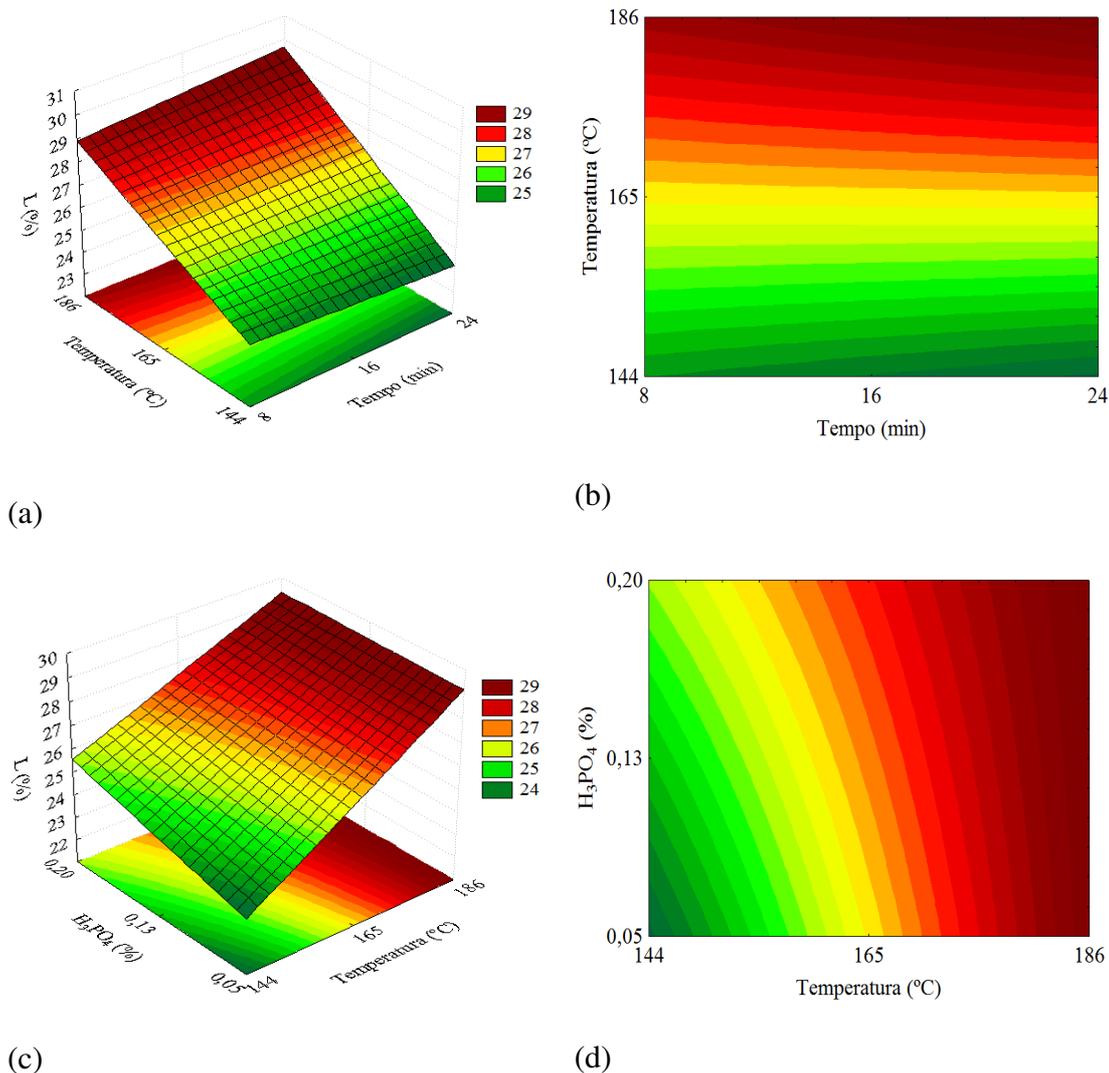
**Tabela 4.7** – ANOVA para a resposta concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	$R^2$ (%)	p
Regressão	46,22	1	46,22	49,17	94,87	0,000063
Residual	8,48	9	0,94			
Total	54,70	10				

$F_{0,05; 1; 9} = 5,12$

Através das superfícies de resposta e curvas de contorno geradas pelo modelo (Figura 4.3), verifica-se que a elevação da temperatura provocou um aumento no percentual de lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ( $L\%$ ). Tal aumento se explica devido à maior redução da hemicelulose ( $H\%$ ), provocada pelo aumento da temperatura, como já evidenciado no item 4.1.3.2.

Percebe-se que há uma tendência da influência da concentração de ácido fosfórico, no intervalo estudado, sobre o aumento da concentração de lignina, porém, muito pequena quando comparada à temperatura (Figura 4.3 c, d).



**Figura 4.3** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a concentração de lignina ( $L\%$ ), na fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).

#### 4.1.3.4 Teor de solubilização dos componentes macromoleculares

A análise sobre o teor de solubilização dos componentes macromoleculares, celulose- $C_S$  (%), hemicelulose- $H_S$  (%) e lignina- $L_S$  (%), mostrou que somente a temperatura foi estatisticamente significativa ao nível de 5% e apenas sobre a resposta teor de solubilização de hemicelulose- $H_S$  (%) (Tabelas D.7–D.9–Apêndice D). A Tabela que apresenta os coeficientes de regressão para a hemicelulose solubilizada encontra-se no apêndice D (Tabela D.10), através da qual foi possível obter o modelo codificado para a hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) (Equação 4.4).

$$H_S \% = 77,41 + 20,97 X_2 \quad (4.4)$$

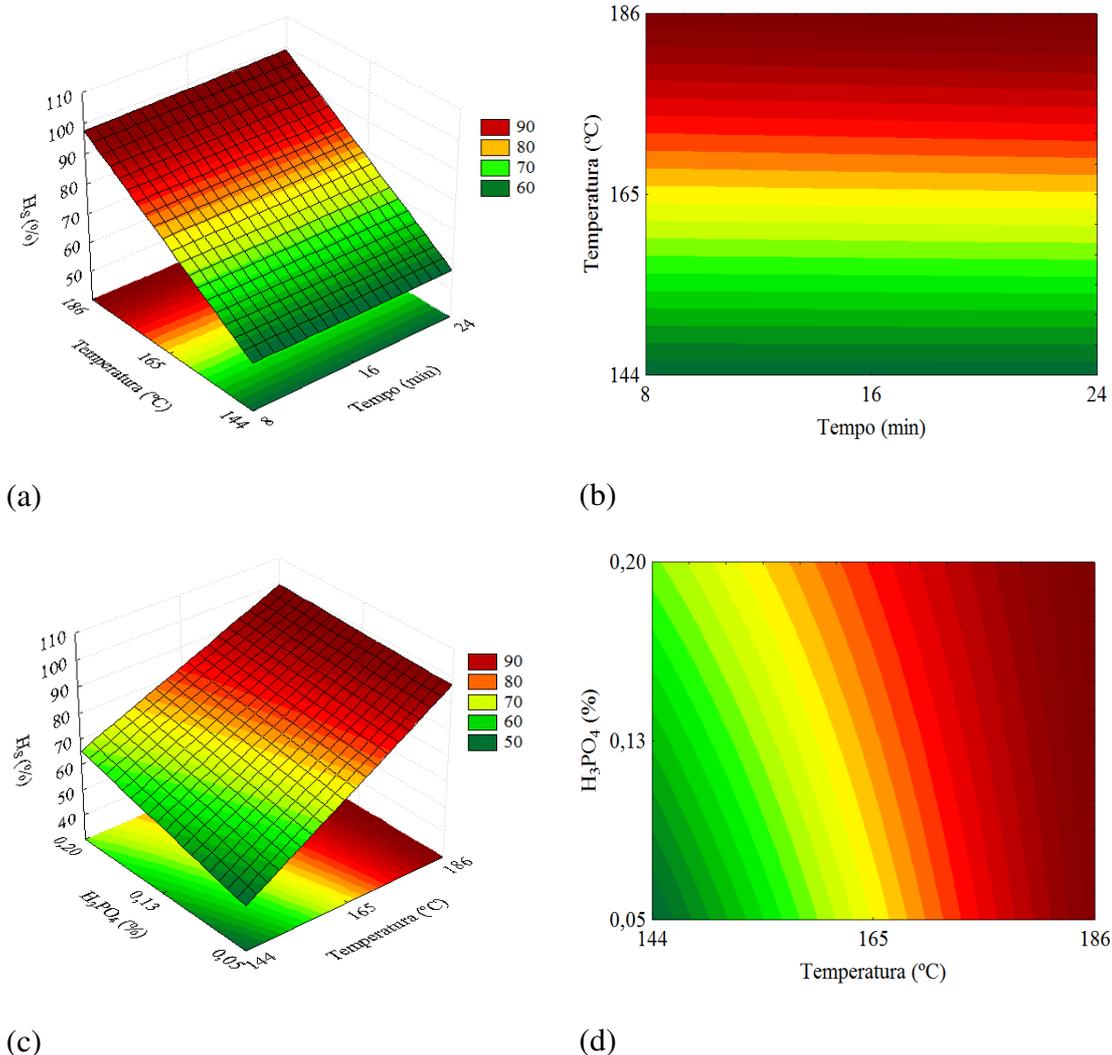
A análise de variância (Tabela 4.8), mostra que o valor de p ( $p = 0,000041$ ) foi muito inferior ao nível de significância de 5%, estabelecido *a priori*. Além disso, o coeficiente de correlação apresentou um valor superior a 90% e o valor de F calculado foi bem superior ao tabelado, da ordem de 10 vezes maior. Tais resultados asseguram que o modelo codificado, que representa a resposta teor de hemicelulose solubilizada (Equação 4.4), é preditivo e significativo.

**Tabela 4.8** – ANOVA para a resposta teor de hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) a partir da fração sólida de bagaço de cana pré-tratado.

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	R <sup>2</sup> (%)	p
Regressão	3517,93	1	3517,93	54,92	94,08	0,000041
Residual	576,51	9	64,06			
Total	4094,44	10				

$$F_{0,05; 1; 9} = 5,12$$

Uma vez que a regressão do modelo foi significativa e preditiva, foi possível gerar as superfícies de resposta e suas correspondentes curvas de contorno, que representam o teor de hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a hemicelulose solubilizada ( $H_5\%$ ) a partir da fração sólida de bagaço pré-tratado em função da temperatura e tempo de pré-tratamento (a) e (b) e da concentração de ácido fosfórico e temperatura (c) e (d).

Quando se compara a influência do tempo e temperatura sobre a solubilização da hemicelulose ( $H_5\%$ ) (Figura 4.4 a, b) verifica-se que, no intervalo estudado, a temperatura foi a variável que teve forte influência. A elevação da temperatura de 144 para 186 °C contribuiu para o aumento na solubilização de tal componente. Tal observação está de acordo com os dados obtidos durante a caracterização química das frações sólidas de bagaço pré-tratado (Tabela 4.2), em que o aumento de temperatura provocou uma redução no teor de hemicelulose ( $H\%$ ) nas frações sólidas, levando conseqüentemente, a uma maior solubilização.

Em relação à influência da concentração de ácido fosfórico, no intervalo estudado, há uma indicação de que o aumento da concentração de ácido pode vir a influenciar positivamente sobre a solubilização da hemicelulose- $H_S\%$  (Figura 4.4 c, d), isto é, o aumento da concentração de ácido pode levar a um aumento na solubilização da hemicelulose. Porém, quando se compara com a temperatura, esta apresenta um efeito positivo muito maior.

O aumento da concentração de ácido sulfúrico sobre o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, reportado na literatura, provocou uma redução no percentual de hemicelulose na fração sólida. Porém, tal redução foi menor quando a temperatura foi elevada de 120 para 150 °C (CANILHA *et al.*, 2011).

O estudo da influência das variáveis independentes (tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico), no intervalo aplicado no presente trabalho, demonstrou claramente que a temperatura foi a variável que apresentou significância estatística, ao nível de confiança de 95%, sobre as concentrações de celulose ( $C\%$ ), de hemicelulose ( $H\%$ ) e de lignina ( $L\%$ ), nas frações sólidas de bagaço e, percentual de hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ).

Em processos de pré-tratamentos hidrotérmicos aplicados a materiais lignocelulósicos, em temperaturas elevadas, o tempo de aquecimento do reator pode ser relativamente longo em comparação com o tempo de reação na temperatura desejada (SILVA *et al.*, 2010). Provavelmente, foi devido este fator que o tempo de reação de pré-tratamento, aplicado no presente estudo, não apresentou significância estatística, pois o reator leva um determinado tempo até atingir a temperatura de reação desejada e durante este tempo a reação de pré-tratamento já está ocorrendo. As rampas características de aquecimento do reator encontram-se apresentadas no Apêndice A.

Canilha *et al.* (2011) realizaram um estudo sobre o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, onde aplicaram um planejamento experimental, tendo como variáveis independentes: temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico. No intervalo estudado, verificaram que as três variáveis influenciaram nas respostas percentual de celulose, hemicelulose e lignina presentes na fração sólida após pré-tratamento. Porém, a temperatura foi a variável que apresentou maior influência, seguida pela concentração de ácido e tempo de residência. Vale salientar que o intervalo de temperatura estudado (112,5–157,5 °C) foi inferior ao aplicado no presente trabalho, enquanto a concentração de ácido sulfúrico alcançou níveis superiores (de até 3,0 %, m/v) aos empregados aqui. Esses

pesquisadores encontraram que a máxima solubilização de bagaço (41,7%) foi obtida na condição de 150 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5%, durante 30 min. Também, foi nesta condição onde ocorreu a maior solubilização de hemicelulose, alcançando um percentual na fração sólida de apenas 3,7%.

No presente trabalho, os percentuais de hemicelulose na fração sólida, após pré-tratamento, alcançaram valores da ordem de 3,35, 2,58, 1,79 e 1,24%, nos ensaios 03, 04, 07 e 08, respectivamente, que correspondem à maior temperatura empregada (186 °C) no planejamento experimental.

Carvalho *et al.* (2004) submeteram bagaço de cana-de-açúcar à hidrólise ácida, com o objetivo de hidrolisar hemicelulose a xilose. Em tal estudo, a temperatura máxima empregada foi de 160 °C, a concentração máxima de ácido fosfórico de 130 mg por grama de bagaço e o tempo máximo de 60 minutos. Nas condições empregadas, verificaram que a quantidade de catalisador ácido utilizado nos ensaios de hidrólise não apresentou influência significativa sobre a liberação de xilose. Fontana *et al.* (1984) apud Carvalho *et al.* (2004) relataram que a influência da concentração de ácido e tempo de residência necessários para a despolimerização completa da xilana diminui consideravelmente quando a temperatura é elevada a 200 °C.

Neste trabalho (Tabela 4.3), fazendo uma análise dos valores de hemicelulose solubilizada,  $H_S\%$ , verifica-se que a elevação da concentração de ácido do nível -1 (0,05%) para o nível +1 (0,20%) levou a um maior incremento na solubilização de hemicelulose quando se empregou a menor temperatura (144 °C), chegando a um aumento de 51% (entre os Ensaios 02 e 06). Porém, este incremento foi menor na temperatura de 186 °C, chegando a apenas 3% (entre os Ensaios 04 e 08).

#### **4.1.4 Caracterização química da fração solúvel obtida no pré-tratamento (hidrolisado)**

Os resultados das análises das frações solúveis, ou hidrolisados ácidos, obtidas em cada condição de ensaio de pré-tratamento segundo o planejamento experimental, encontram-se na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9** – Composição química dos hidrolisados ácidos obtidos após cada ensaio de pré-tratamento.

Ensaio	Variáveis			Concentração (g/L)								
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Cb	Gli	Xl	Ara	AcF	AcA	HMF	Fur	Lig
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	N.D	0,24	0,78	0,58	0,00	0,16	0,01	0,01	1,68
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	N.D	0,26	0,87	0,59	0,00	0,14	0,01	0,01	1,64
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,25	1,40	6,71	0,39	0,05	1,66	0,32	1,06	5,12
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,08	1,20	3,71	0,21	0,04	0,99	0,37	1,08	6,89
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	N.D	0,67	2,37	0,75	0,01	0,80	0,00	0,04	1,94
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	N.D	0,68	2,97	0,67	0,00	0,70	0,00	0,03	2,22
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,07	2,97	10,59	0,67	0,03	1,96	0,40	0,79	5,94
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,05	2,42	6,52	0,44	0,08	1,56	0,39	0,72	5,86
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	N.D	0,77	6,25	0,58	0,00	0,86	0,04	0,06	2,59
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	N.D	0,88	8,65	0,70	0,00	0,96	0,04	0,06	2,63
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	N.D	0,93	7,35	0,74	0,00	0,95	0,07	0,10	2,53

Cb: Celobiose; Gli: Glicose; Xl: Xilose; Ara: Arabinose; AcF: Ácido Fórmico; AcA: Ácido Acético; HMF: Hidroximetilfurfural; Fur: Furfural; Lig: Lignina.

O principal componente presente no hidrolisado ácido a partir da massa inicial de bagaço de cana-de-açúcar é a xilose, apresentando uma concentração bastante variável chegando a alcançar 10,59 g/L. A predominância da xilose já era esperada, uma vez que a mesma, dentre os componentes da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, apresenta-se em maior proporção (GIRIO *et al.*, 2010).

A caracterização química das frações sólidas de bagaço pré-tratadas realizada no presente trabalho demonstrou que grande parte da hemicelulose foi solubilizada, variando de 42,77 a 97,63% (Tabela 4.3), justificando dessa forma, as maiores concentrações de xilose nos hidrolisados quando comparado aos outros componentes.

Vasconcelos *et al.* (2011), ao analisarem hidrolisados obtidos de pré-tratamentos hidrotérmicos de bagaço de cana-de-açúcar, realizados no mesmo tipo de reator (reator rotatório, tipo autoclave eletrônica de 20 L), a 195 °C, 10 minutos realizados em dias diferentes, obtiveram uma concentração de xilose que variou de 7,91 a 12,17 g/L, levando a uma média de  $9,64 \pm 1,87$  g/L.

Em relação aos produtos de degradação (HMF e furfural), assim como o ácido acético liberado e o ácido fórmico oriundo da desidratação do HMF, pode-se observar que, no geral, ocorreu um aumento em suas concentrações com a elevação da temperatura.

Furfural e HMF são derivados da desidratação das pentoses e hexoses, ácido fórmico, a partir da decomposição do HMF e, o ácido acético é proveniente da desacetilação da hemicelulose, favorecidas em temperaturas elevadas (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2000; MITTAL *et al.*, 2009; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

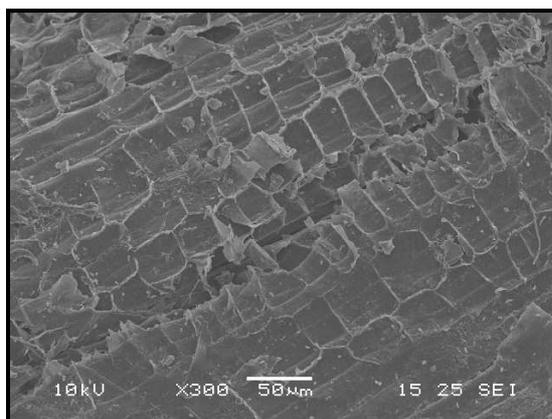
No Apêndice C (Tabela C.7) estão apresentados os componentes presentes nos hidrolisados ácidos, após serem submetidos a uma etapa de pós-hidrólise.

#### **4.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

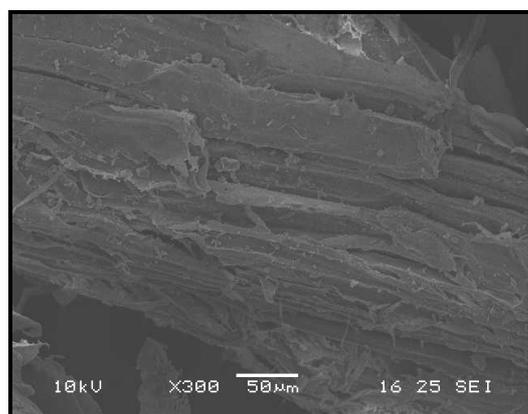
O bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, assim como os pré-tratados nas condições definidas pelo planejamento experimental (condições apresentadas na Tabela 3.2), foram submetidos à técnica de microscopia eletrônica de varredura, com o objetivo de se verificar as mudanças provocadas na morfologia do bagaço.

As micrografias do bagaço *in natura* e pré-tratados (Ensaio 03, 04, 07 e 08) encontram-se nas Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente. Quando as micrografias dos bagaços pré-tratados

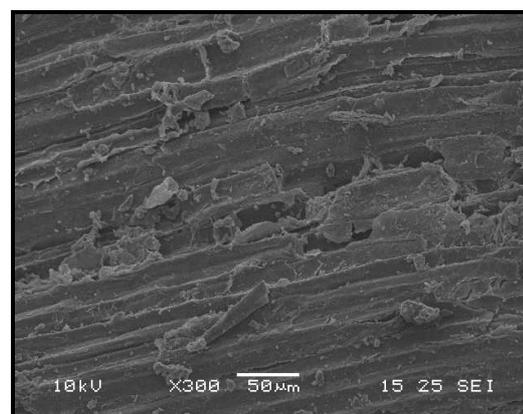
(Figura 4.6) são comparadas ao bagaço *in natura* (Figura 4.5), mudanças significativas na morfologia das fibras de bagaço podem ser observadas. As células de parênquima (células de formato achatado, formando uma camada sobre as fibras de celulose—Figura 4.5) foram removidas quando o bagaço passou pelo processo de pré-tratamento. Ocorre ainda a exposição das fibras, apresentando um conjunto de feixes, de forma linear e, também, ocorre uma maior abertura das fibras.



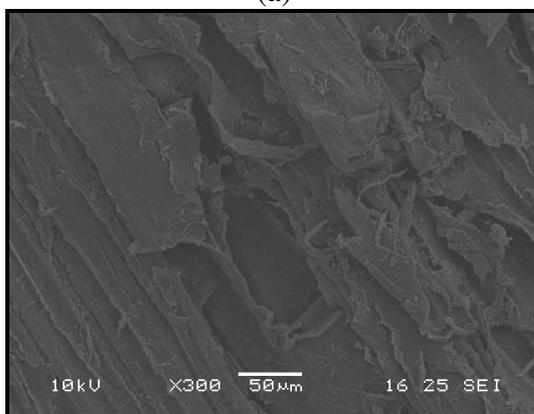
**Figura 4.5** – Micrografia da fibra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.



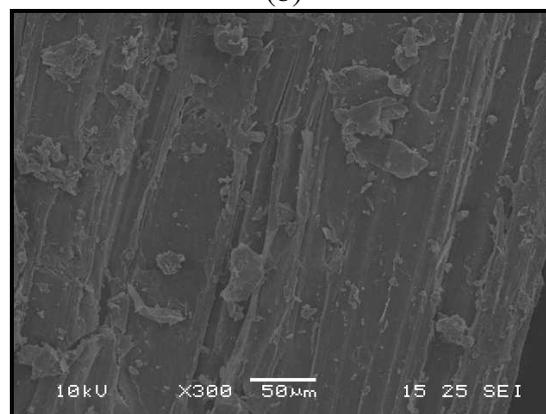
(a)



(b)



(c)



(d)

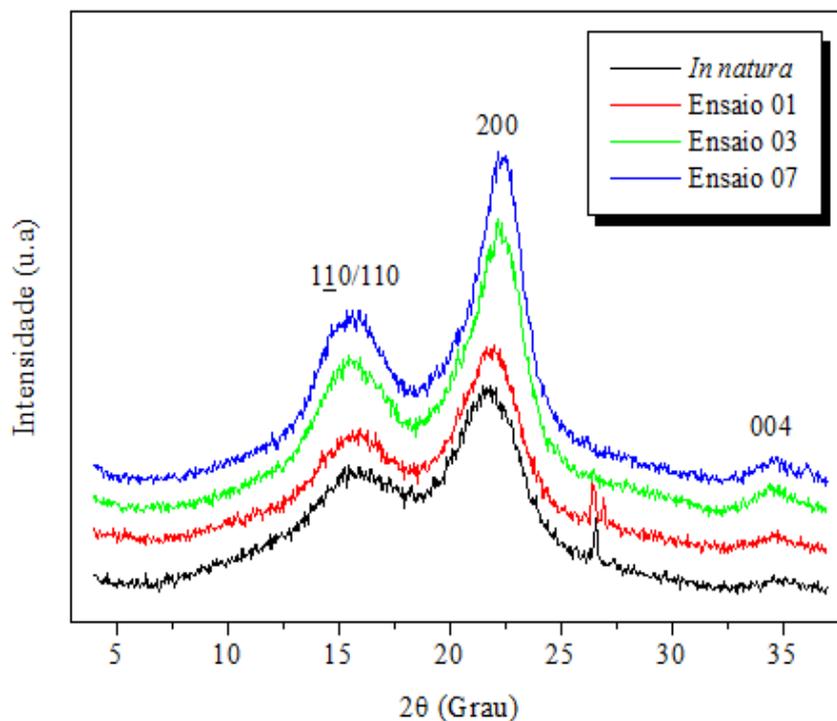
**Figura 4.6** – Micrografia do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado: (a) Ensaio 03 (8 min.; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); (b) Ensaio 04 (24 min.; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); (c) Ensaio 07 (8 min.; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%); e (d) Ensaio 08 (24 min.; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

#### 4.1.6 Difractometria de raios-X (DRX)

As análises por difração de raios-X das amostras permitiram avaliar as mudanças dos cristalitos de celulose. Os perfis de DRX estão apresentados na Figura 4.7.

Os dados de difração de raios-X do bagaço *in natura* e pré-tratado nas condições de ensaios 01, 03 e 07 do planejamento experimental foram utilizados no software OriginPro®, e as curvas gaussianas foram obtidas e ajustadas a tais dados experimentais. Os gráficos ajustados, bem como os valores de  $2\theta$  na intensidade máxima e da meia largura, foram obtidos para cada pico ajustado, para os dados das quatro amostras em questão (os gráficos e as tabelas dos dados obtidos no ajuste, encontram-se no Apêndice B).

Os valores de  $2\theta$  à máxima intensidade de  $\Gamma_{hkl}$ , obtidos a partir do ajuste da curva gaussiana, e os valores das larguras (L) calculados para os picos  $hkl = 110/110$  e 200, através da Equação 3.4, encontram-se nas tabelas 4.10 e 4.11, respectivamente.



**Figura 4.7** – Difratogramas de raios-X para os bagaços de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados. Condições de pré-tratamento: Ensaio 01 (8 min; 144 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); Ensaio 03 (8 min; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); Ensaio 07 (8 min; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

Através da análise da Figura 4.7, observa-se que os tratamentos podem levar a deslocamentos, o que pode ser comprovado, também, pelos valores de  $x_1$  e  $x_2$ , apresentados nas Tabelas 4.10 e 4.11, e aumento da intensidade dos picos de difração de 200,  $1\bar{1}0$  e 110, estes últimos se sobrepondo.

As larguras dos cristalitos  $L_{200}$  (Tabela 4.11) sofreram um aumento à medida que os pré-tratamentos foram realizados em condições mais severas. O bagaço pré-tratado nas condições de ensaio 01 (8 min, 144 °C e  $H_3PO_4$  0,05%, m/v) apresentou um aumento na largura do cristalito da ordem de 8,33% em relação à largura do cristalito de bagaço *in natura*, porém, quando se compara a largura do cristalito de bagaço pré-tratado na condição 07 (8 min, 186 °C e  $H_3PO_4$  0,20%, m/v), este aumento foi de 16,94% em relação à largura do cristalito de bagaço *in natura*. Provavelmente, a remoção de componentes não celulósicos (hemicelulose e lignina) influencia no alargamento dos cristalitos, pois ao se analisar os dados de solubilização de componentes macromoleculares (Tabela 4.3), percebe-se que as solubilizações de hemicelulose ( $H_S\%$ ) foram de 46,70, 93,25 e 96,46% e as de lignina ( $L_S\%$ ) foram de 4,82, 12,31 e 14,83%, para os bagaços pré-tratados nas condições 01, 03 e 07, respectivamente.

Driemeier *et al.* (2011) reportaram o aumento da largura do cristalito devido aos pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos. No entanto, o fenômeno por trás do alargamento do cristalito ainda é incerto. Porém, chamaram a atenção para o fato de que a largura de cristalito médio pode resultar do crescimento de cristalito ou agregação de cristalitos. Isto pode estar de acordo com a hipótese de que a remoção de componentes não celulósicos pode levar a este aumento, uma vez que ocorre um aumento no teor de celulose ( $C\%$ ), como foi comprovado por meio de caracterização química (Item 4.1.1), o que pode fazer com que os cristais originais de celulose se fundam, aumentando dessa forma os seus tamanhos.

**Tabela 4.10** - Valores de largura a meia altura ( $w_1$ ) e de  $2\theta$  na intensidade máxima ( $x_1$ ) obtidos pelo ajuste de acordo com a distribuição gaussiana para o primeiro pico ( $hkl = 110/110$ ), bem como o valor de  $L_{110/110}$  calculado.

Amostra	110/110 (hkl)				$L_{1(110/110)}$ (hkl) (Å)
	$w_1$ (graus)	$x_1$ (2 $\theta$ ) (graus)	$(x_1)/2$ ( $\theta$ ) (graus)	$\cos(\theta)$	
<i>In natura</i>	5,13	16,00	8,00	0,99	15,63
Ensaio 01	4,49	15,93	7,97	0,99	17,86
Ensaio 03	4,28	15,90	7,95	0,99	18,73
Ensaio 07	4,27	15,94	7,97	0,99	18,78

**Tabela 4.11** - Valores de largura a meia altura ( $w_2$ ) e de  $2\theta$  na intensidade máxima ( $x_2$ ) obtidos pelo ajuste de acordo com a distribuição gaussiana para o segundo pico ( $hkl = 200$ ), bem como o valor de  $L_{200}$  calculado.

Amostra	200 (hkl)				$L_{2(200)}$ (hkl) (Å)
	$w_2$ (graus)	$x_2$ (2 $\theta$ ) (graus)	$(x_2)/2$ ( $\theta$ ) (graus)	$\cos(\theta)$	
<i>In natura</i>	3,12	21,85	10,93	0,98	25,92
Ensaio 01	2,88	21,85	10,93	0,98	28,08
Ensaio 03	2,85	22,12	11,06	0,98	28,39
Ensaio 07	2,67	22,23	11,12	0,98	30,31

#### 4.1.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

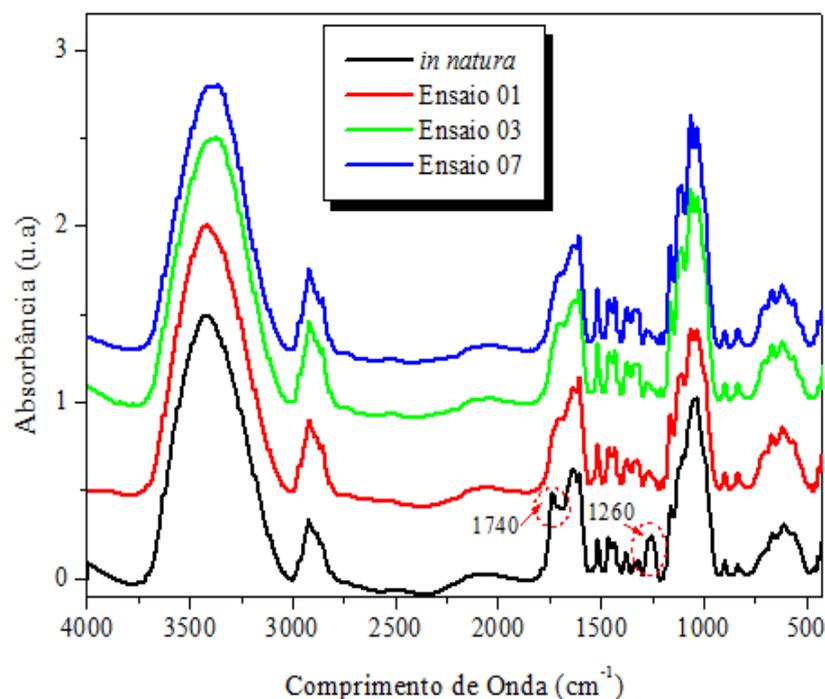
Análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas com o objetivo de se avaliar a estrutura química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados. A estrutura química é analisada em função dos grupos funcionais presentes nos componentes do bagaço de cana. As análises foram realizadas na região entre  $4000 - 425 \text{ cm}^{-1}$ . A Figura 4.8 apresenta uma combinação dos espectros de bagaço de cana *in natura* e pré-tratados com ácido fosfórico diluído em três diferentes condições.

Através da análise da Figura 4.8 observa-se a presença de uma intensa banda com frequência de absorção em 3420 e 3390  $\text{cm}^{-1}$ , a qual está relacionada às ligações do tipo O-H (BINOD *et al.*, 2012). Outra banda, com frequência de absorção em 2920  $\text{cm}^{-1}$ , aparece em todos os tipos de bagaços analisados, o que evidencia a presença de estruturas químicas que apresentam ligações com estiramento C-H (BINOD *et al.*, 2012; YOON *et al.*, 2012).

As principais mudanças entre os espectros do bagaço *in natura* e pré-tratados ocorreram na região de absorção entre 1740 e 1260  $\text{cm}^{-1}$ . No comprimento de onda de 1740  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se uma banda de absorção com uma frequência acentuada no bagaço de cana *in natura*, porém, à medida que o bagaço foi submetido a etapa de pré-tratamento, tal frequência de absorção foi visivelmente reduzida. Esse fato deve estar associado à redução de hemicelulose no bagaço pré-tratado, como identificado durante a caracterização química do bagaço de cana (Tabelas 4.2 e 4.3), pois a literatura sugere que a faixa de absorção identificada descreve o comportamento de alongamento de grupos carbonila (C=O), que fazem parte dos grupos carboxílicos associados à estrutura ramificada da hemicelulose (KRISTENSEN *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2010; SIM *et al.*, 2012; YOON *et al.*, 2012).

Em 1260  $\text{cm}^{-1}$ , identifica-se uma banda de absorção acentuada no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, sendo esta reduzida de forma significativa quando o bagaço foi submetido ao pré-tratamento ácido em diferentes condições (8 min; 144 °C;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05%; 8 min; 186 °C;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05%; e 8 min; 186 °C;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,20%). A banda de absorção nessa faixa é atribuída aos anéis de siringila e estiramento C-O em lignina e xilana (SIM *et al.*, 2012). Assim, a redução da frequência de tal banda de absorção deve estar relacionada com a redução da concentração de hemicelulose, quando o bagaço *in natura* foi submetido ao pré-tratamento, como ficou comprovada a partir da análise de caracterização química (Tabelas 4.1 e 4.2).

A Tabela 4.12 mostra outros picos identificados e as suas atribuições, de acordo com o trabalho de Sim *et al.* (2012).



**Figura 4.8** – Espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier do bagaço cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado. Condições de pré-tratamento: Ensaio 01 (8 min; 144 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); Ensaio 03 (8 min; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); Ensaio 07 (8 min; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

**Tabela 4.12** – Picos de absorção detectados e seus correspondentes grupos funcionais (SIM *et al.*, 2012).

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais
1157	Alongamento vibracional do anel C–O–C do acoplamento β(1,4) - glicosídico de celulose.
1319	C–H no plano de flexão de celulose.
1370	Alongamento C–H alifático.
1427	Esqueleto aromático combinado com C–H no plano de deformação e alongamento.
1457	Parte alifática de lignina.
1511	Vibrações de alongamento C=C dos anéis aromáticos de lignina.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO HIDROTÉRMICAMENTE COM ÁCIDO MAIS CONCENTRADO

### 4.2.1 Caracterização química da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar

A composição química de bagaço de cana *in natura* utilizado nos ensaios de pré-tratamentos hidrotérmico e com ácido mais concentrado, conforme condições apresentadas na Tabela 3.4 (Item 3.3), assim como a composição do bagaço pré-tratado, estão apresentadas na Tabelas 4.13 e 4.14, respectivamente.

A composição do bagaço *in natura* (safra 2010/2011) utilizado nesses novos ensaios de pré-tratamento se aproxima da composição do bagaço utilizado no desenvolvimento do planejamento experimental (Tabela 4.1), estando de acordo com a literatura, pois Rocha *et al.* (2012) verificaram que a composição química de bagaço de cana-de-açúcar não varia significativamente em diferentes climas, solos e de uma safra para outra.

**Tabela 4.13** – Composição química de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado nos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico e com ácido mais concentrado.

Componentes	Composição (% m/m)
Celulose	41,07 ± 0,01
Hemicelulose	28,72 ± 0,04
Lignina total	19,71 ± 1,49
Cinzas	5,03 ± 0,20
Extrativos em etanol	6,45 ± 0,28
Total	100,98 ± 2,02

Como nos pré-tratamentos realizados nas condições de planejamento experimental, a análise da composição química do bagaço pré-tratado (Tabela 4.14) mostrou uma redução na concentração de hemicelulose (*H%*) e o consequente aumento nas concentrações de celulose (*C%*) e lignina (*L%*), quando comparado ao *in natura*.

**Tabela 4.14** – Composição química (m/m) de bagaço pré-tratado em condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
	Tempo (min)	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%) <sup>*</sup>				
A	8	186	0,0	57,48 ± 1,97	6,86 ± 0,26	27,34 ± 0,94	7,47 ± 0,28
B	8	195	0,0	61,44 ± 1,04	3,98 ± 0,06	31,06 ± 0,27	3,35 ± 0,63
C	8	186	1,0	58,83 ± 0,65	1,63 ± 0,10	34,30 ± 0,31	4,48 ± 0,27
D	8	195	1,0	54,98 ± 0,38	1,27 ± 0,06	38,21 ± 0,50	4,72 ± 0,51

\* m/v

Primeiro foi verificada a influência da elevação de temperatura, sobre as concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, em duas situações de pré-tratamento: (i) pré-tratamento hidrotérmico; e (ii) pré-tratamento ácido. Em relação ao pré-tratamento hidrotérmico (Ensaio A e B), o aumento da temperatura de 186 para 195 °C provocou uma redução na concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) da ordem aproximada de 42%. O aumento das concentrações de celulose e lignina foi da ordem de 7 e 14%, respectivamente.

O aumento da temperatura de 186 para 195 °C (Ensaio C e D), mantendo-se a concentração de ácido fosfórico em 1% (m/v), levou a uma redução na concentração de hemicelulose na fração sólida da ordem de 22%, menor que a observada no pré-tratamento hidrotérmico, e, ainda, a concentração de celulose foi reduzida em torno de 6,5%.

Dessa forma, verificou-se que o aumento da temperatura de pré-tratamento, na presença de ácido mais concentrado não necessariamente irá melhorar a eficiência do pré-tratamento. Isso depende do objetivo específico do pré-tratamento.

A verificação da influência da aplicação de ácido fosfórico ao pré-tratamento de bagaço foi realizada em duas temperaturas diferentes. Na temperatura de 186 °C a aplicação de  $H_3PO_4$  1% (m/v) (Ensaio C) quando comparado ao pré-tratamento hidrotérmico (Ensaio A) provocou uma redução na concentração de hemicelulose, na fração sólida, da ordem de 76%, sendo a celulose e a lignina redistribuídas, de forma que as suas concentrações aumentaram (2,3 e 25%, respectivamente).

Já na temperatura de 195 °C a aplicação de  $H_3PO_4$  1% (m/v) (Ensaio D) levou a uma redução na concentração de hemicelulose da ordem de 68% em relação ao pré-tratamento hidrotérmico (Ensaio B), menor que aquela observada na temperatura de 186 °C e, ainda, ocorreu uma redução na concentração de celulose em torno de 10,5%.

A análise dos resultados em função do efeito do ácido aplicado ao pré-tratamento sugere, então, que para a produção de uma fração sólida rica em celulose, para a utilização em processo de hidrólise enzimática, o pré-tratamento realizado em altas temperaturas pode dispensar a utilização de ácido em concentrações mais elevadas. Estes resultados estão de acordo com dados reportados na literatura. Carvalho *et al.* (2004) afirmaram que a influência da concentração de ácido para a despolimerização de xilana é reduzida quando a temperatura aumenta.

Durante a análise do planejamento experimental, foi observado que, para o intervalo estudado, a temperatura foi a variável estatisticamente significativa.

Fazendo-se um comparativo desses resultados com os resultados obtidos no planejamento experimental, verifica-se que o aumento da concentração de ácido fosfórico acima da concentração máxima utilizada no planejamento experimental que foi de 0,20%, na temperatura de 186 °C, durante 8 minutos, provocou pouca alteração na concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço (redução da ordem de apenas 9%). Indicando, assim que nas condições do planejamento experimental, o aumento da concentração de ácido pode ser dispensado.

#### 4.2.2 Solubilização dos componentes macromoleculares de bagaço de cana-de-açúcar

Após a etapa de pré-tratamento de bagaço de cana, a solubilização dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina) foi calculada utilizando-se a Equação 3.3 (Item 3.2.1). Os resultados referentes ao rendimento global das frações sólidas de bagaço (Equação 3.2), bem como os valores de solubilizações, encontram-se na Tabela 4.15.

Os rendimentos das frações sólidas de bagaço pré-tratado foram reduzidos à medida que a drasticidade foi aumentada, o que confirma os dados de rendimento obtidos durante o desenvolvimento do planejamento experimental (Item 4.1.1). Ao comparar o pré-tratamento menos drástico (Ensaio A) com o mais drástico (Ensaio D), percebe-se que a perda de massa aumentou de 36,05 para 54,23%.

**Tabela 4.15** - Rendimento da fração insolúvel e solubilização de celulose, hemicelulose e lignina de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamentos hidrotérmico e ácido.

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Y (%)	C <sub>S</sub> (%)	H <sub>S</sub> (%)	L <sub>S</sub> (%)
	Tempo (min)	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)*				
A	8	186	0,0	63,95 ± 2,54	10,50	84,73	11,00
B	8	195	0,0	57,19 ± 1,58	14,44	92,07	9,88
C	8	186	1,0	51,25 ± 0,28	26,59	97,09	10,81
D	8	195	1,0	45,77 ± 1,38	38,73	97,98	11,27

Y: rendimento da fração sólida de bagaço; C<sub>S</sub>: Celulose solubilizada; H<sub>S</sub>: Hemicelulose solubilizada; L<sub>S</sub>: Lignina solubilizada

Através da análise de solubilização dos componentes macromoleculares, determinados a partir da fração sólida de bagaço, assim como ocorreu nos ensaios do planejamento experimental, a hemicelulose foi o componente que apresentou maior solubilização, o que confirma a eficiência dos pré-tratamentos, que tem como objetivo principal a máxima remoção possível de tal componente. Verifica-se, ainda, que a perda de celulose, componente de interesse no presente trabalho, foi crescente com a drasticidade de pré-tratamento, chegando a uma perda máxima de 38,73% nas condições do ensaio D (8 min.; 195 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%), o que sugere a não necessidade de se aumentar a temperatura de pré-tratamento, na presença de ácido, pois o que se busca aqui é a remoção de hemicelulose a partir da fração, porém, com a preservação da celulose, ou, pelo menos, que se tenha uma perda mínima.

Com relação à temperatura de pré-tratamento de 186 °C, a utilização de ácido fosfórico aumentou a solubilização da hemicelulose, em torno de 14,6% quando comparado ao hidrotérmico (Ensaio A e C). Quanto à solubilização de celulose esta aumentou em mais de 100%.

Quando se compara o ensaio C (Tabela 4.15) com o ensaio 07 do planejamento experimental (8 min; 186 °C; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%) (Tabela 4.3), percebe-se que o aumento da concentração de ácido fosfórico, de 0,20 para 1%, resultou em um aumento na solubilização de hemicelulose de apenas 0,65%.

No caso da celulose, este aumento foi de 28,08%, o que não justifica neste caso o aumento da concentração de ácido, ou seja, tal aumento se torna prescindível, dentro da proposta deste trabalho. Além disso, do ponto de vista industrial, o não aumento da concentração de ácido irá tornar o processo mais econômico, além de minimizar os problemas de impacto ambiental.

#### **4.2.3 Caracterização química dos hidrolisados obtidos no pré-tratamento**

Os açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação presentes nos hidrolisados, resultantes da etapa de pré-tratamento, foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando-se as condições apresentadas no item 3.2.2.8. As concentrações de tais componentes encontram-se na Tabela 4.16.

**Tabela 4.16** - Composição química dos hidrolisados obtidos nos pré-tratamentos hidrotérmico e ácido de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Concentração (g/L)						
	Tempo (min)	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Gli	Xl	Ara	AcF	AcA	HMF	Fur
A	8	186	0,0	0,27	3,68	0,63	0,26	0,99	0,10	0,19
B	8	195	0,0	0,49	6,06	0,23	0,20	1,64	0,23	0,48
C	8	186	1,0	4,37	9,10	0,72	0,16	2,24	0,40	0,81
D	8	195	1,0	6,86	4,56	0,44	0,27	2,35	0,79	1,23

Gli: Glicose; Xl: Xilose; Ara: Arabinose; AcF: Ácido Fórmico; AcA: Ácido Acético; HM: Hidroximetilfurfural; Fur: Furfural.

Da mesma forma que o observado na Tabela 4.9, referente à composição química dos hidrolisados obtidos nos pré-tratamentos do planejamento experimental, o principal componente liberado foi a xilose, chegando a uma concentração máxima de 9,10 g/L no ensaio C (Tabela 4.16). Era esperado que a máxima concentração de tal componente ocorresse no ensaio D, uma vez que a composição química das frações sólidas mostrou que, nas condições de tal ensaio, uma menor concentração de hemicelulose residual (1,27%) foi encontrada na fração sólida (Tabela 4.14). A menor concentração de xilose obtida no ensaio D, quando comparada às concentrações do mesmo componente nos ensaios B e C, pode estar associada ao fato de ter havido a degradação de tal açúcar, pois neste caso a concentração de furfural, produto de degradação da xilose (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), foi de 1,23 g/L, maior que nos outros casos. Porém, essa informação não pode ser confirmada, uma vez que não foi possível a realização de balanço de massa, devido a abertura da válvula do reator para o resfriamento do sistema.

Pré-tratamentos ácidos (Ensaio C e D), em altas temperaturas, provocaram uma maior liberação de glicose, componente constituinte da celulose, assim como maior formação de HMF e furfural. A liberação de glicose não é interessante para o processo, pois o que se procura é preservar a celulose para a etapa posterior de hidrólise enzimática. Em relação ao HMF e furfural, estes atuam como inibidores no processo de fermentação do hidrolisado, no caso de utilização deste para outros fins, dentro do conceito de biorrefinaria. Tais resultados indicam que é possível excluir a presença de ácido no pré-

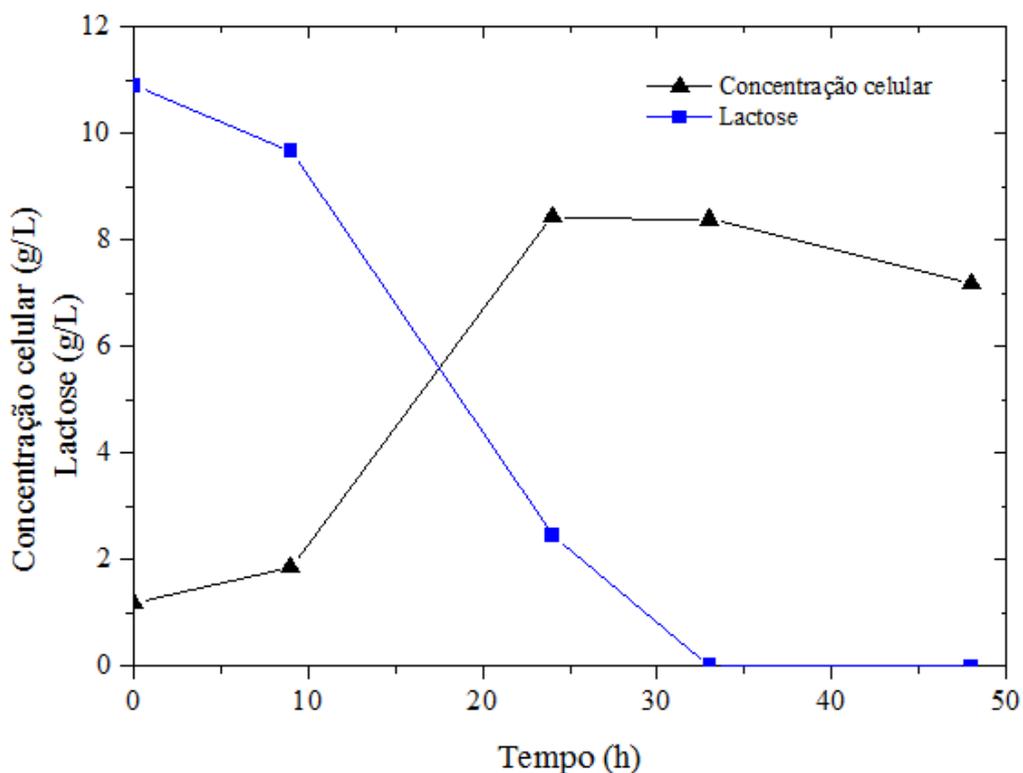
tratamento quando conduzido em altas temperaturas ou utilizá-lo em baixas concentrações, que é uma grande vantagem tanto do ponto de vista industrial, quanto do ambiental.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A produção de enzimas celulolíticas, utilizadas em alguns dos ensaios de hidrólise enzimática, foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos (Departamento de Antibióticos–UFPE), sendo conduzida de acordo com a metodologia descrita no item 3.4. Em tal processo, utilizou-se hidrolisado de palha de cana-de-açúcar para solubilizar o meio de fermentação a base de lactose, pois resultados obtidos no laboratório mostraram que a utilização de meios preparados com hidrolisados hemicelulósicos contendo teores elevados de oligossacarídeos pode proporcionar uma indução de xilanase, além das celulases induzidas pela lactose (SILVA, 2010; SILVA; SANTOS; SOUTO-MAIOR, 2011).

O tempo total de fermentação foi de 48 horas, o qual foi determinado de acordo com trabalho prévio, realizado no laboratório (SILVA; SANTOS; SOUTO-MAIOR, 2011). A Figura 4.9 ilustra os perfis de concentrações da fonte de carbono (lactose) e de concentração celular, durante todo o processo de produção. Os valores de concentrações de tais componentes encontram-se na Tabela E.1 (Apêndice E).

No tempo de aproximadamente 33 horas, toda a lactose já havia sido consumida, chegando a ser nula quando o processo atingiu 48 horas. Em relação à concentração celular 8,43 g/L foi alcançada em 24 horas, quando 77,5% do substrato havia sido consumido.

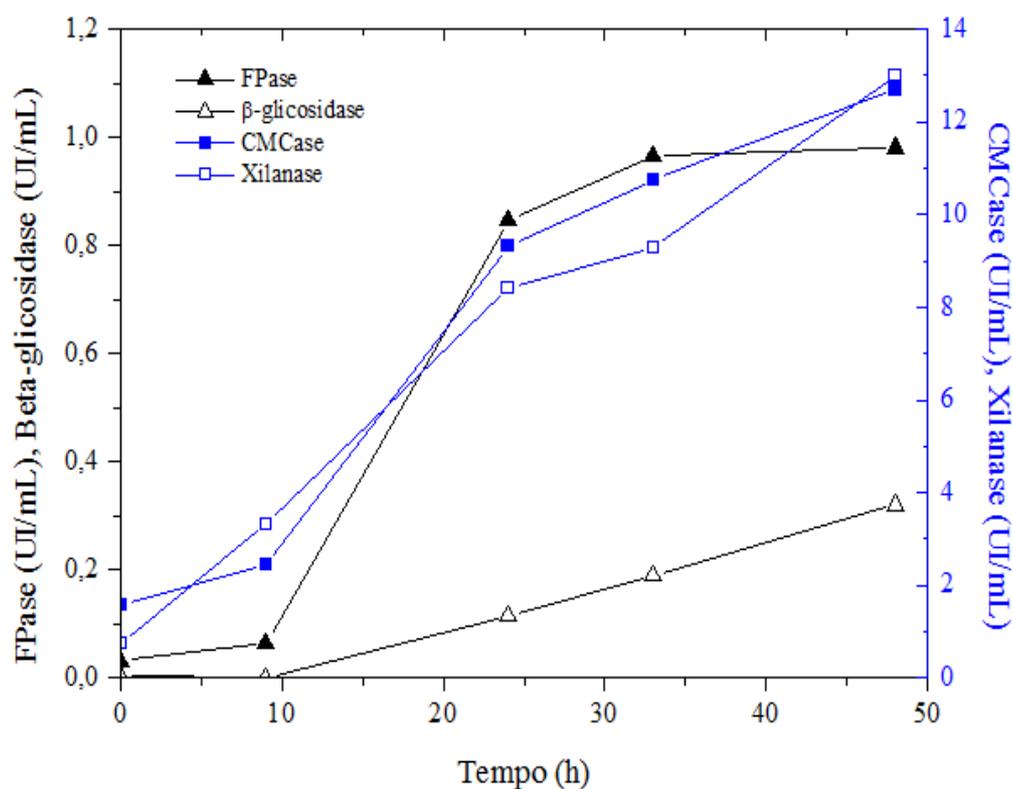


**Figura 4.9** – Perfis de lactose e concentração celular durante o processo de produção de enzimas por *T. reesei* RUT C30.

Os perfis de atividades FPase,  $\beta$ -glicosidase, CMCase e xilanase estão apresentados na Figura 4.10. Os valores numéricos médios de atividades e seus respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela E.2 (Apêndice E).

Atividades de FPase de 0,98 UI/mL,  $\beta$ -glicosidase de 0,32 UI/mL, CMCase de 12,70 UI/mL e xilanase de 13,00 UI/mL foram atingidas em 48 horas de fermentação.

Ao final do processo, o caldo enzimático foi filtrado e armazenado em geladeira, até a utilização no processo de hidrólise enzimática. Para a utilização no processo de hidrólise, determinou-se a atividade em unidade de papel de filtro (FPU).



**Figura 4.10** – Perfis de atividade de FPase,  $\beta$ -glicosidase, CMCase e xilanase produzidas por *T. reesei* RUT C30 em meio de lactose e hidrolisado hemicelulósico.

#### 4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

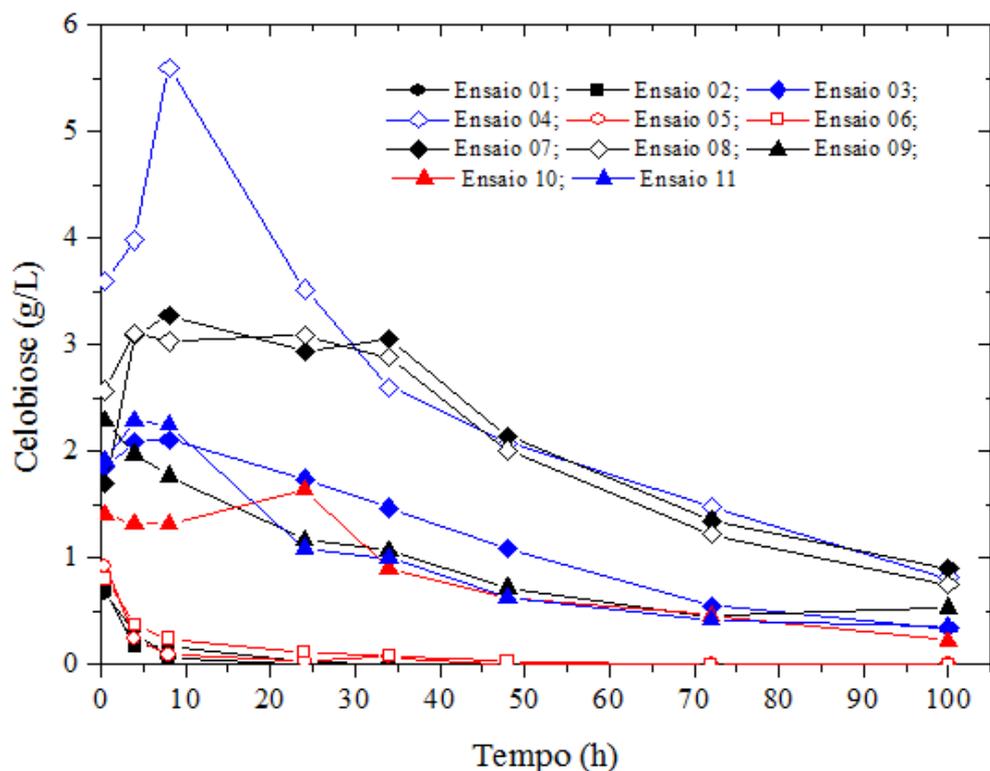
Nos itens a seguir, serão apresentados os resultados referentes às hidrólises enzimáticas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em diferentes condições, conforme planejamento experimental (Tabela 3.2). As hidrólises foram realizadas em diferentes etapas. Também serão apresentados os resultados referentes à fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático obtido durante o processo de hidrólise, realizada em biorreator de bancada.

##### 4.4.1 Estudo da cinética enzimática

###### 4.4.1.1 Hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado sob condições do planejamento experimental

Os perfis de concentrações de celobiose, glicose e xilose, obtidas durante o processo de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado nas condições do planejamento

experimental estão apresentados nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13, respectivamente. Tais resultados foram obtidos durante o processo de hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas comerciais. Nas Tabelas F.1–F.3 (Apêndice F) estão apresentados os valores das concentrações de tais componentes.



**Figura 4.11** - Perfis de concentrações de celobiose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188. Ensaios 01, 02, 05, 06 (144 °C); Ensaios 03, 04, 07, 08 (186 °C); Ensaios 09, 10, 11 (165 °C).

Baixas concentrações de celobiose foram obtidas durante o processo de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em diferentes condições de tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico. Um fato importante notado foi que para os bagaços pré-tratados nas condições de mais baixa temperatura (Ensaios: 01–8 min, 144 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%; 02–24 min, 144 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%; 05–8 min, 144 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20% e 06–24 min, 144 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%) a celobiose, à medida que era liberada, foi sendo consumida, ou seja, não houve acúmulo no meio reacional, sendo a mesma completamente consumida ao final de 100 horas de hidrólise.

Por outro lado, para os bagaços pré-tratados nas condições em que se empregou a máxima temperatura (186 °C) (Ensaios 03, 04, 07 e 08), de forma geral, ocorreu um

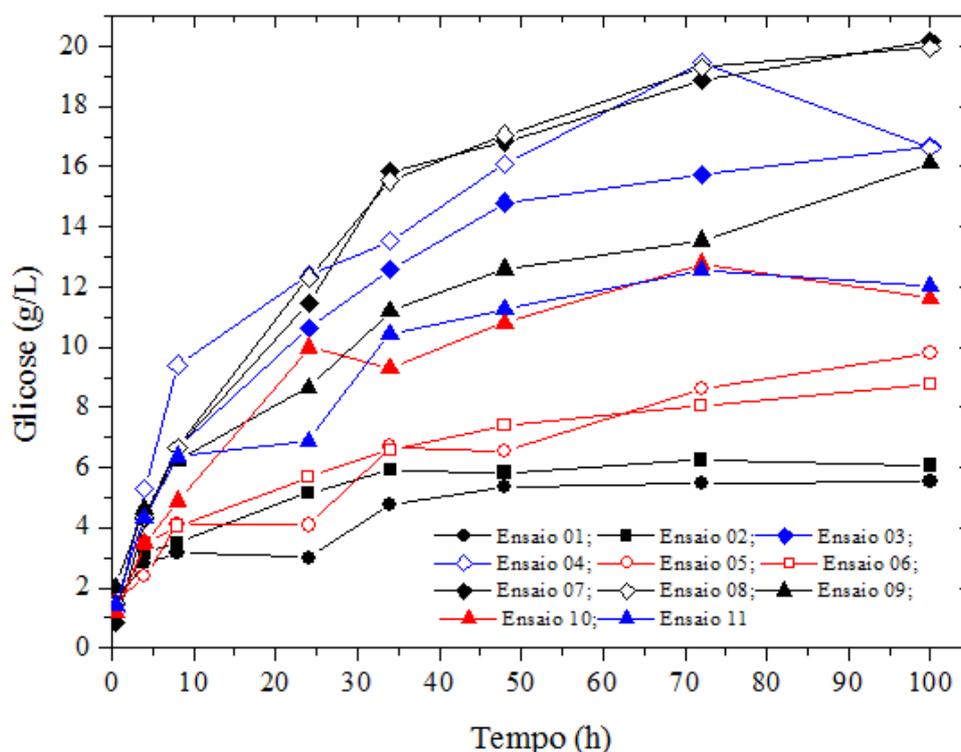
acúmulo de celobiose durante todo o processo, com um máximo entre 4 e 8 horas de hidrólise. Porém, ao final de 100 horas de hidrólise, ainda havia celobiose remanescente. Neste sentido, Guo *et al.* (2009) também observaram que durante a hidrólise enzimática de diferentes materiais lignocelulósicos pré-tratados, incluindo bagaço de cana-de-açúcar, a concentração de celobiose alcançou um valor máximo em cerca de 4-8 horas, sendo que a mesma foi reduzida à medida em que o tempo hidrolítico aumentou.

O fato de ter havido uma concentração relativamente maior de celobiose para os bagaços pré-tratados a 186 °C, em relação àqueles pré-tratados a 144 °C deve-se provavelmente, ao fato de ter ocorrido uma maior solubilização de hemicelulose, quando pré-tratados a 186 °C, o que foi evidenciado através da caracterização química (Tabela 4.3). Assim, a celulose presente se tornou mais acessível às enzimas, liberando maiores quantidades de celobiose, uma vez que deve ter ocorrido um aumento no tamanho dos poros do substrato, sendo este um dos efeitos causados aos materiais lignocelulósicos quando submetidos à pré-tratamentos ácidos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Através das micrografias (Figura 4.6), percebeu-se uma abertura das fibras de bagaço pré-tratados quando comparados ao bagaço de cana *in natura* (Figura 4.5).

Em relação aos perfis de concentrações de glicose (Figura 4.12), ocorreu o aumento de concentração ao longo do tempo de hidrólise, atingindo maiores concentrações entre 72 e 100 horas de hidrólise. Verificou-se, ainda, que as concentrações de glicose liberadas a partir da celulose contida no bagaço de cana foram aumentando à medida que o bagaço foi pré-tratado nas maiores temperaturas, sendo as maiores concentrações de 16,66 g/L, 19,48 g/L, 20,19 g/L e 19,95 g/L, para os bagaços pré-tratados a 186 °C, que corresponde aos ensaios de pré-tratamento 03, 04, 07 e 08, respectivamente. Isto demonstra a premissa de que a solubilização da fração hemicelulósica torna a celulose mais acessível às celulases. Pois, como visto através da caracterização química do bagaço, a solubilização da hemicelulose foi maior quando se elevou a temperatura de pré-tratamento.

A liberação de glicose ocorreu com uma maior intensidade, de um modo geral, até 24 horas de hidrólise, chegando a alcançar concentrações, no geral, maiores que 50% das atingidas ao final do processo hidrolítico (100 horas). Cara *et al.* (2007), ao submeterem resíduo lignocelulósico da poda de oliveira, pré-tratado hidrotermicamente, à hidrólise enzimática com concentração de 2% (m/v), verificaram que 67% da glicose total liberada no tempo de 72 horas de hidrólise foi liberada dentro das primeiras 24 horas. Geddes *et al.* (2010) também citaram que mais da metade da hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-

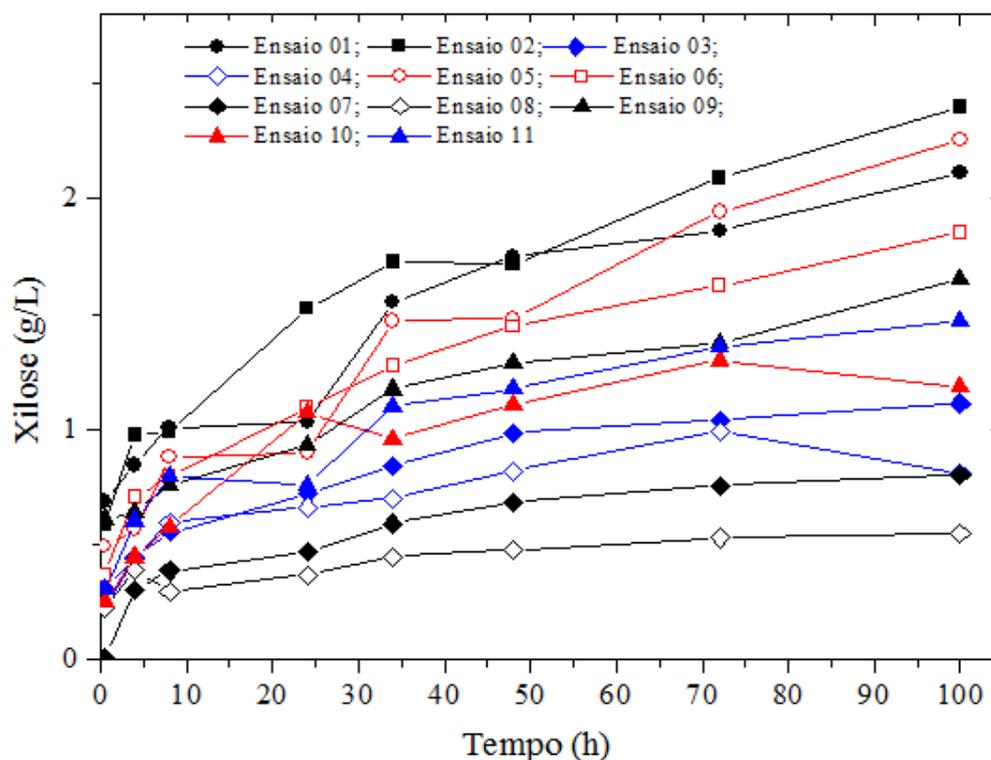
tratado a vapor com impregnação de ácido fosfórico, ocorreu durante o período inicial de 24 horas. Este fato pode estar associado à adsorção irreversível de parte das enzimas sobre a lignina, como sugeriram Sun e Cheng (2002), dificultando o acesso das enzimas livres às camadas mais internas do substrato. Ou seja, após 24 horas de hidrólise ocorre um aumento da resistência de contato das enzimas sobre o substrato. Associado a isto, o aumento da concentração de produto final (glicose) no meio reacional pode ter provocado a inibição das enzimas livres, reduzindo dessa forma a taxa de hidrólise, após 24 horas.



**Figura 4.12-** Perfis de concentrações de glicose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado em diferentes condições, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188. Ensaios 01, 02, 05, 06 (144 °C); Ensaios 03, 04, 07, 08 (186 °C); Ensaios 09, 10, 11 (165 °C).

A Figura 4.13 mostra os perfis de concentrações de xilose. As quantidades de xilose são bem menores que as concentrações liberadas de glicose (Figura 4.12). Ao contrário do que ocorreu com as concentrações de glicose, a liberação de xilose foi maior quando se empregou baixas temperaturas de pré-tratamento, sendo reduzida quando se aumentou a temperatura de pré-tratamento. Geddes *et al.* (2010) também observaram fenômeno semelhante quando hidrolisaram bagaço de cana-de-açúcar, sendo os açúcares componentes da hemicelulose reduzidos quando se aumentou a temperatura de pré-

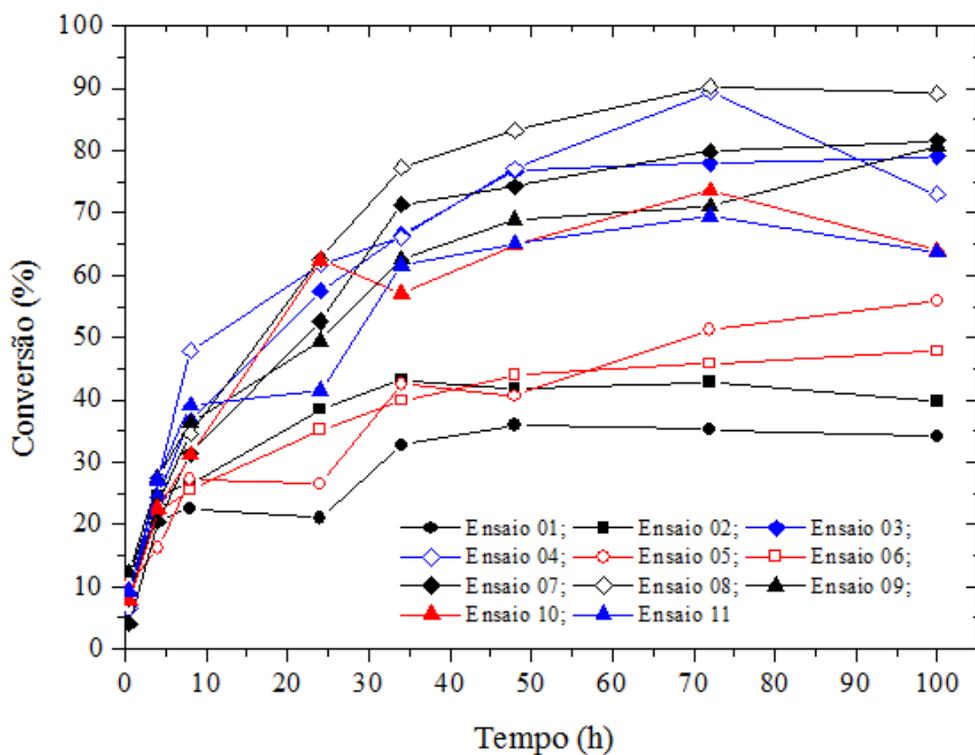
tratamento. Isso pode ser explicado devido ao fato de que, quando se empregou a maior temperatura de pré-tratamento, a maior parte da hemicelulose, a qual é composta principalmente por xilose no caso de bagaço de cana-de-açúcar, foi solubilizada, restando um pequeno percentual de hemicelulose na fração sólida (Tabela 4.2).



**Figura 4.13-** Perfis de concentrações de xilose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188. Ensaios 01, 02, 05, 06 (144 °C); Ensaios 03, 04, 07, 08 (186 °C); Ensaios 09, 10, 11 (165 °C).

Na Figura 4.14 encontram-se os perfis de conversão enzimática de celulose em glicose. Para o cálculo de conversão utilizou-se a Equação 3.5.

De forma geral, as maiores conversões foram obtidas em 72 horas de hidrólise. Altas conversões foram obtidas para os bagaços pré-tratados a 186 °C, sendo que as maiores conversões variaram de 78 a 90%. Rocha *et al.* (2011) encontraram uma conversão superior a 76%, após 72 horas de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com uma mistura de ácido sulfúrico (1% m/v) e ácido acético (1% m/v) e Cara *et al.* (2007) obtiveram um rendimento de hidrólise, a partir de resíduo lignocelulósico pré-tratado hidrotérmicamente, de 76,2% após 72 horas.

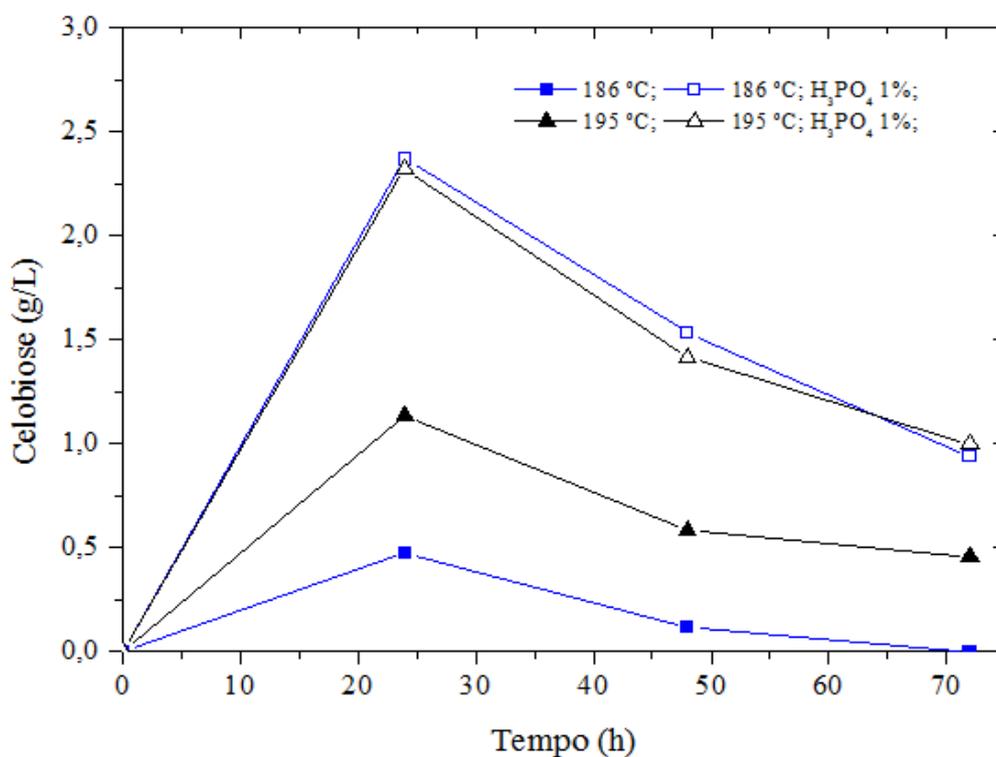


**Figura 4.14-** Conversões de celulose em glicose obtidas por hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188. Ensaios 01, 02, 05, 06 (144 °C); Ensaios 03, 04, 07, 08 (186 °C); Ensaios 09, 10, 11 (165 °C).

#### 4.4.1.2 Hidrólise de bagaço pré-tratado sob condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado

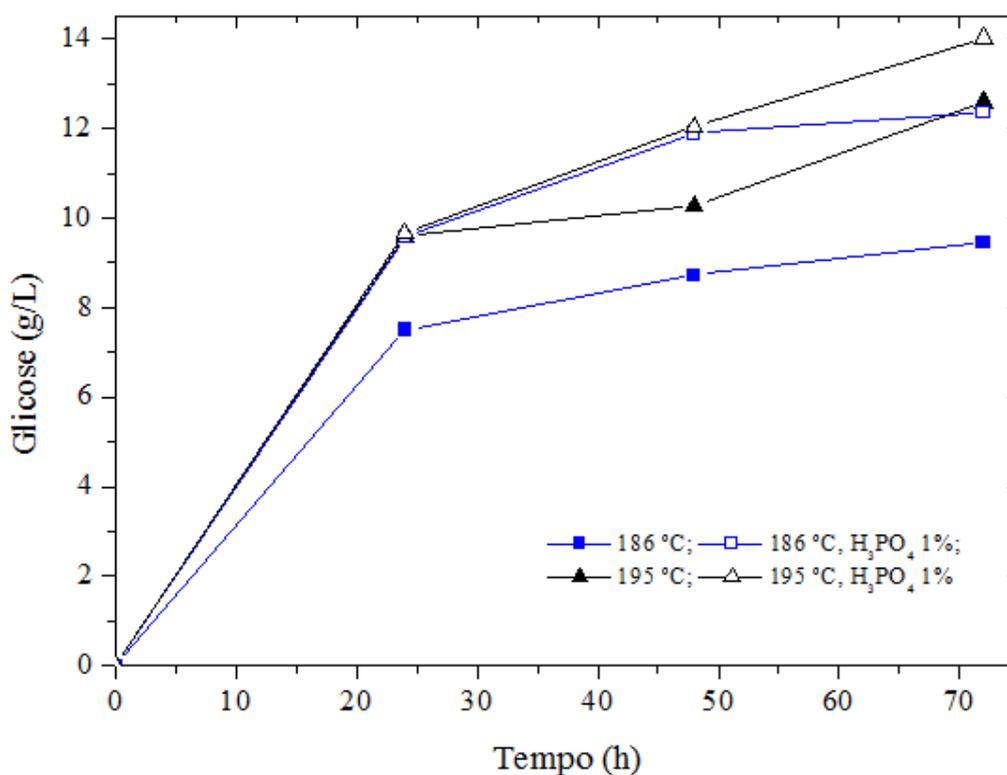
Da mesma forma que o observado para o perfil cinético das hidrólises enzimáticas de bagaços pré-tratados conforme condições de planejamento experimental (Figura 4.11; Item 4.4.1.1), as concentrações de celobiose acumuladas durante a hidrólise enzimática de bagaços pré-tratados nas condições hidrotérmica e com ácido fosfórico mais concentrado (Tabela 3.4) também apresentaram baixos valores (Figura 4.15).

As concentrações de celobiose acumuladas durante a hidrólise do bagaço pré-tratado nas condições mais drásticas (186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% e 195 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%) apresentaram-se superiores às concentrações da hidrólise do bagaço pré-tratado na ausência de ácido, isto é, pré-tratado hidrotérmicamente. Percebe-se, ainda, que a utilização de ácido fosfórico durante o pré-tratamento dos bagaços, utilizados neste caso em particular, praticamente não apresentou diferença alguma sobre o perfil de concentração de celobiose.



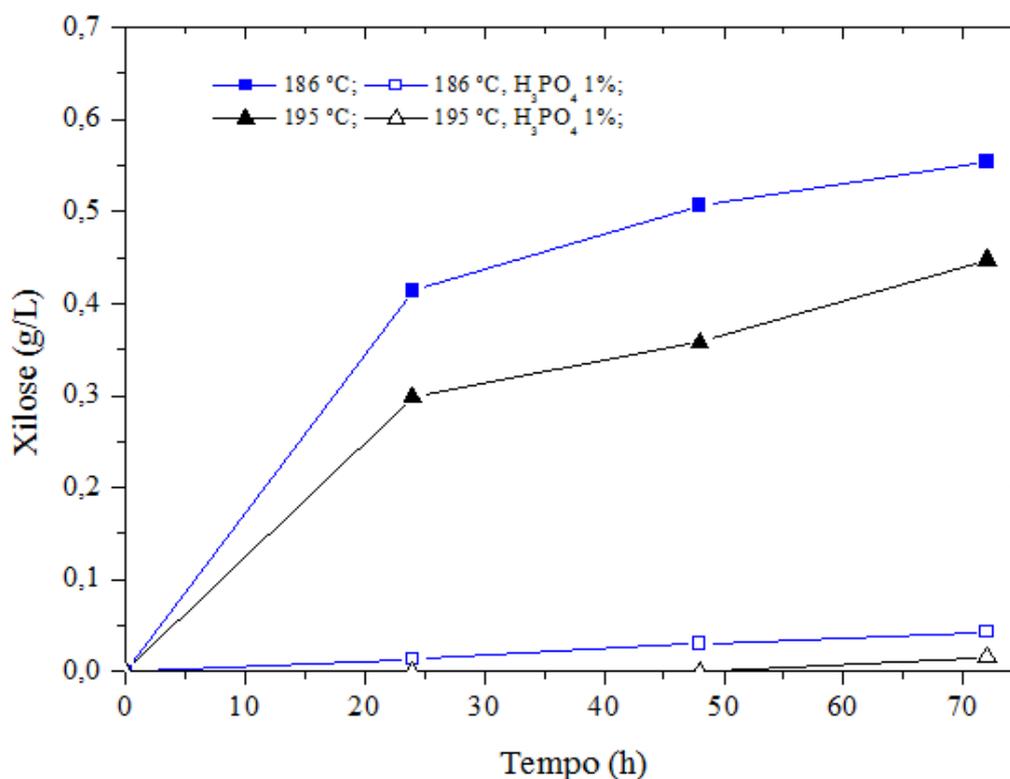
**Figura 4.15** - Perfis de concentrações de celobiose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaços de cana pré-tratados de acordo com condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.

A concentração de glicose liberada (Figura 4.16) apresentou um perfil crescente com o tempo de hidrólise, atingindo os maiores valores em 72 horas, sendo a maior concentração alcançada (14 g/L) para o bagaço pré-tratado a 195 °C e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%. A diferença de concentração liberada é muito mais elevada quando se aumenta a temperatura de pré-tratamento no caso hidrotérmico que no caso ácido. Ao se analisar de forma minuciosa a Figura 4.16, verifica-se que, em 72 horas de hidrólise, o aumento da temperatura de pré-tratamento de 186 para 195 °C, no caso hidrotérmico, leva a um aumento na concentração de glicose, liberada na hidrólise enzimática, da ordem de 33%. No caso do pré-tratamento ácido, o mesmo aumento de temperatura provoca uma elevação na concentração de glicose liberada de apenas 13%.



**Figura 4.16** – Concentrações de glicose liberadas na hidrólise enzimática de bagaços de cana pré-tratados de acordo com as condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.

A xilose apresentou baixas concentrações (Figura 4.17), porém, um comportamento de maior liberação foi observado quando foram utilizados os bagaços pré-tratados em condições menos drásticas, confirmando desta forma os resultados encontrados na hidrólise enzimática de bagaços pré-tratados de acordo com o planejamento experimental (Figura 4.13; Item 4.4.1.1). Ou seja, aqui os bagaços pré-tratados hidrotérmicamente, quando submetidos à hidrólise enzimática, conseguiram liberar mais xilose que os pré-tratados com ácido. Na verdade, para os bagaços pré-tratados com ácido a liberação foi nula (195 °C) ou muito próxima a zero (186 °C). Estes resultados estão de acordo com os dados de composição química dos bagaços pré-tratados (Tabela 4.14), visto que a concentração remanescente de hemicelulose (*H%*) nas frações sólidas de bagaço pré-tratado com ácido foi muito pequena.



**Figura 4.17** - Perfis de concentrações de xilose liberadas na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado de acordo com as condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, utilizando-se enzimas comerciais Celluclast® 1,5L e Novozym® 188.

As conversões de celulose em glicose, obtidas por hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado nas condições hidrotérmica e com ácido fosfórico 1% (Tabela 3.4), encontram-se na Tabela 4.17. De forma geral, a conversão aumentou com o aumento da drasticidade de pré-tratamento, o que já era esperado, uma vez que tal aumento provocou uma maior remoção de hemicelulose (Tabela 4.15), deixando desta forma a celulose de forma mais livre ao acesso das enzimas. Porém, se considerarmos a liberação de glicose, em termos de rendimento (Tabela F.11; Apêndice F), o bagaço pré-tratado hidrotérmicamente a 186 °C levou a um rendimento de 147,69 g de glicose/0,5 kg de bagaço *in natura*, enquanto que este mesmo bagaço pré-tratado com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1% a 195 °C rendeu 120,16 g<sub>glicose</sub>/0,5 kg<sub>bagaço in natura</sub>, o que corresponde a uma perda da ordem de 19%.

**Tabela 4.17** - Conversão enzimática de celulose em glicose obtida por hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Conversão (%)			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	61,36	70,67	75,68
B	8	195	0,0	0,00	57,67	61,06	74,07
C	8	186	1,0	0,00	67,61	83,08	85,49
D	8	195	1,0	0,00	61,60	75,36	86,84

#### 4.4.2 Comparação de hidrólise enzimática realizada com enzimas comerciais e com enzimas produzidas no laboratório

Os bagaços, pré-tratados sob as condições apresentadas na Tabela 3.2, foram submetidos à hidrólise enzimática utilizando-se enzimas comerciais e enzimas produzidas no laboratório. As hidrólises foram realizadas em mesa agitadora, durante o tempo de 72 horas, conforme as condições apresentadas no item 3.5.2. Nas Tabelas 4.18 e 4.19, estão apresentadas as concentrações obtidas nas hidrólises com enzimas comerciais e produzidas no laboratório, respectivamente.

Ao final de 72 horas de hidrólise, realizada com enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188), não foi identificada a presença de celobiose, sendo esta completamente consumida ao final deste período (Tabela 4.18). Por outro lado, assim como observado na hidrólise realizada nos minirreatores, as maiores concentrações de glicose liberadas foram aquelas correspondentes aos bagaços pré-tratados nas condições 03, 04, 07 e 08, que correspondem à maior temperatura de pré-tratamento (186 °C). Porém, as concentrações de tal componente apresentaram valores inferiores àqueles obtidos na hidrólise realizada em minirreatores, sendo de 2,2 a 4,5 vezes menores.

Em relação à xilose, a concentração da mesma apresentou o mesmo comportamento apresentado em 72 horas de hidrólise, quando a hidrólise foi realizada em minirreatores, sendo as maiores concentrações de xilose liberadas para os bagaços pré-tratados nas

condições 01, 02, 05 e 06, cuja caracterização química mostrou que menores quantidades de hemicelulose foram solubilizadas (Tabela 4.3).

**Tabela 4.18** - Concentrações de glicose e xilose durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em frascos agitados, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Concentração (g/L)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Glicose	Xilose
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	1,21	0,48
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	1,54	0,49
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	6,62	0,38
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	7,36	0,33
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	2,82	0,53
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	3,13	0,50
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	8,66	0,30
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	7,88	0,21
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	4,66	0,43
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	4,38	0,32
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	4,87	0,44

As concentrações de celobiose, glicose e xilose acumuladas durante o processo de hidrólise realizada com as enzimas produzidas no laboratório estão apresentadas na Tabela 4.19, onde é possível se verificar, ao contrário da hidrólise realizada com enzimas comerciais, a presença de celobiose residual, ao final de 72 horas de hidrólise.

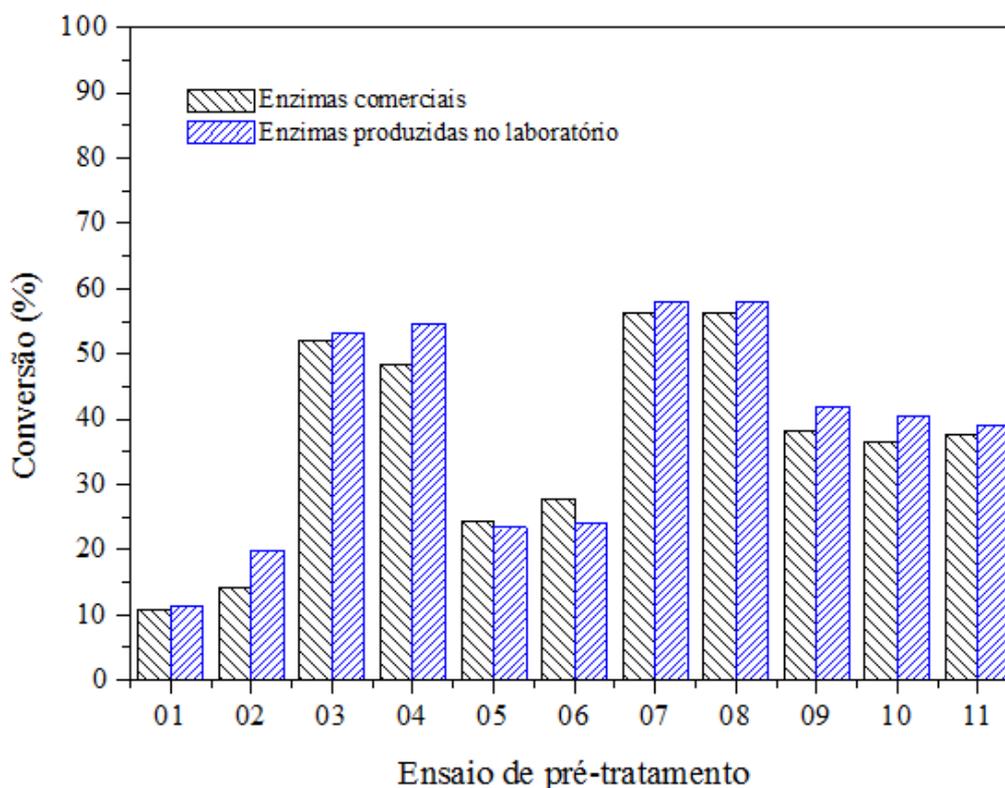
Em relação à concentração de glicose, foi observado o mesmo comportamento que aquele verificado no processo de hidrólise com enzimas comerciais, sendo as maiores concentrações obtidas a partir da hidrólise dos bagaços pré-tratados nos ensaios 03, 04, 07 e 08. Já para a concentração de xilose, esta foi liberada em maior quantidade, a partir das hidrólises dos bagaços pré-tratados nas condições 01, 02, 05 e 06, mantendo o mesmo

comportamento da hidrólise realizada com enzimas comerciais, tanto em mesa agitadora quanto nos minirreatores.

**Tabela 4.19** - Concentrações de celobiose, glicose e xilose durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, em frascos agitados, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.

Ensaio	Variáveis			Concentração (g/L)		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Celobiose	Glicose	Xilose
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,01	1,08	0,61
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,01	1,87	0,73
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,09	7,17	0,49
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,14	8,33	0,46
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,01	2,59	0,65
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,02	2,67	0,61
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,13	8,49	0,38
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,16	8,22	0,30
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,04	5,55	0,63
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,04	5,11	0,24
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,04	4,66	0,46

Para uma melhor visualização do comportamento das hidrólises realizadas com enzimas comerciais, assim como com as produzidas no laboratório, foi calculada a conversão de celulose em glicose, através da Equação 3.5. As conversões para ambos os processos de hidrólise estão apresentadas na Figura 4.18.

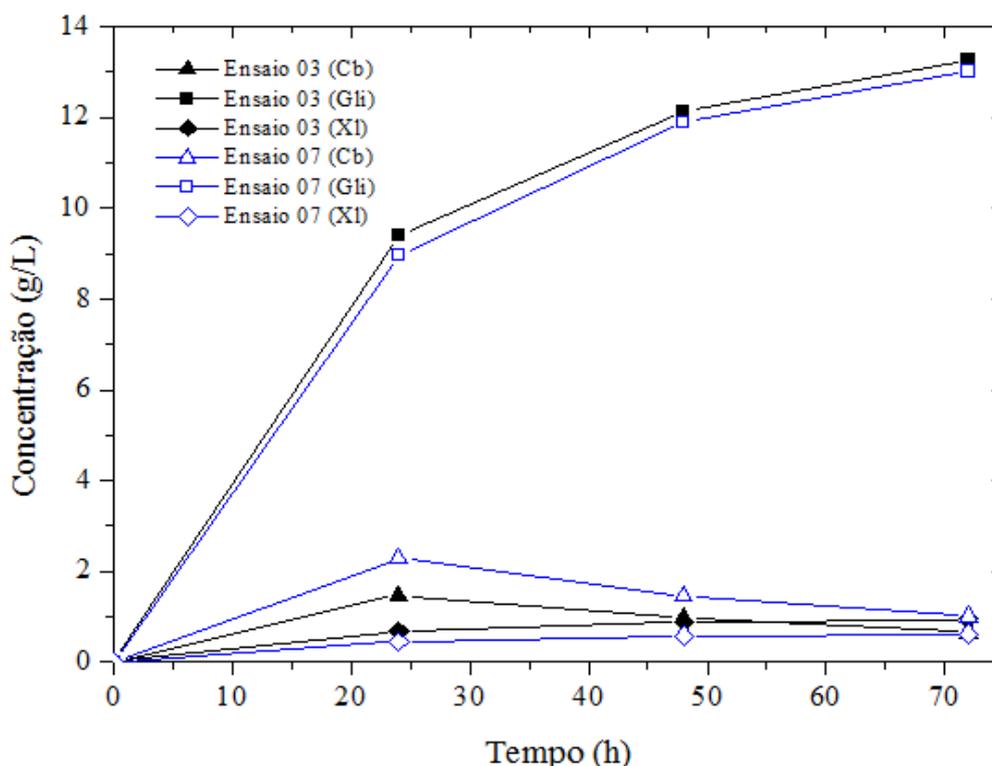


**Figura 4.18-** Conversão de celulose em glicose, obtida na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188) e enzimas produzidas no laboratório. Hidrólise realizada em frascos agitados durante 72 horas.

Através da Figura 4.18, que mostra a conversão de celulose em glicose obtida por hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado de acordo com as condições do planejamento experimental (Tabela 3.2), percebe-se que as enzimas produzidas no laboratório apresentaram-se eficientes em hidrolisar os bagaços, quando comparada às enzimas comerciais. Em ambos os casos, a máxima conversão de celulose em glicose (56,38% e 57,97%) foi alcançada na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado durante 8 minutos a 186 °C, na presença de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20% (ensaio 07 do planejamento experimental). Em trabalho realizado por Santos e Gouveia (2009), ao submeterem bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor à hidrólise enzimática, utilizando enzima comercial Celluclast® com uma concentração de 17,2 FPU/g de bagaço, nas mesmas condições de temperatura e agitação (50 °C e 150 rpm), porém com uma concentração de sólidos de 18,6%, foi alcançada uma conversão máxima de celulose em glicose da ordem de 44%, em 67 horas.

Os bagaços obtidos por pré-tratamento nas condições: 8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05% (ensaio 03) e 8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20% (ensaio 07), foram submetidos à hidrólise enzimática, utilizando-se as enzimas produzidas no laboratório. As condições aplicadas ao processo de hidrólise foram descritas no item 3.5.2, sendo conduzidas em minirreatores.

Os perfis de concentrações de celobiose, glicose e xilose, encontram-se na Figura 4.19.

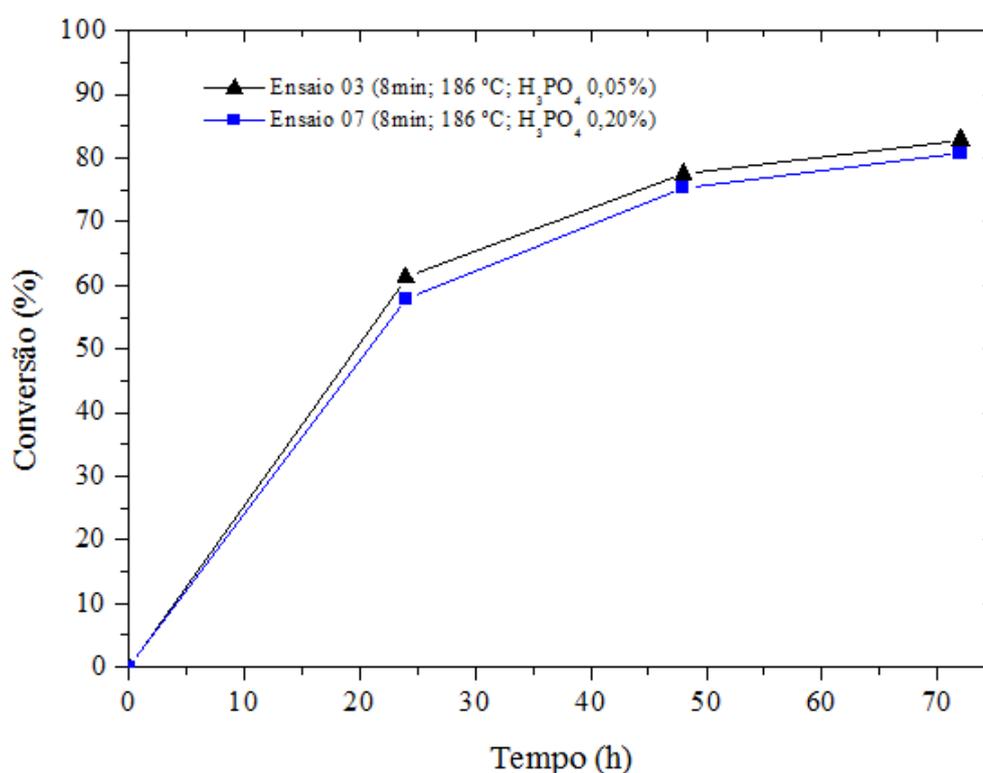


**Figura 4.19-** Perfis de concentrações de celobiose, glicose e xilose, obtidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório. Cb: Celobiose; Gli: Glicose; XI: Xilose. Ensaio 03 (8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%); Ensaio 07 (8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

Os bagaços, pré-tratados no Ensaio 03 (8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%) e no Ensaio 07 (8 min, 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%), apresentaram o mesmo comportamento em termos de liberação de celobiose, glicose e xilose. Da mesma forma como ocorreu no processo realizado com a utilização de enzima comercial (Item 4.4.1.1), a celobiose liberada foi sendo consumida, chegando ao final de 72 horas, com uma concentração remanescente de 0,65 g/L e 1,00 g/L, para os bagaços pré-tratados nas condições 03 e 07, respectivamente.

Para a glicose, houve um aumento contínuo na sua concentração, sendo o maior valor alcançado em 72 horas de hidrólise (13,25 g/L e 13,02 g/L, para os bagaços pré-tratados nas condições 03 e 07, respectivamente). Já para a xilose liberada, mesmo em baixas concentrações, ocorreu um aumento gradativo com a evolução do tempo hidrolítico. Nos processos de hidrólise aqui discutidos, embora se tenha utilizado bagaços pré-tratados sob a mesma temperatura (186 °C), a liberação de xilose foi um pouco maior quando se empregou a menor concentração (0,05%) de ácido fosfórico (Ensaio 03) quando comparado ao ensaio 07, no qual se utilizou 0,20% de ácido fosfórico. Isso ocorreu devido ao fato de a concentração de hemicelulose remanescente, na fração sólida de bagaço, após pré-tratamento com  $H_3PO_4$  0,05% ter sido maior que no bagaço pré-tratado com  $H_3PO_4$  0,20%.

As conversões enzimáticas de celulose em glicose, calculadas conforme a Equação 3.5 estão apresentadas na Figura 4.20.



**Figura 4.20** Conversão de celulose em glicose, obtida na hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.

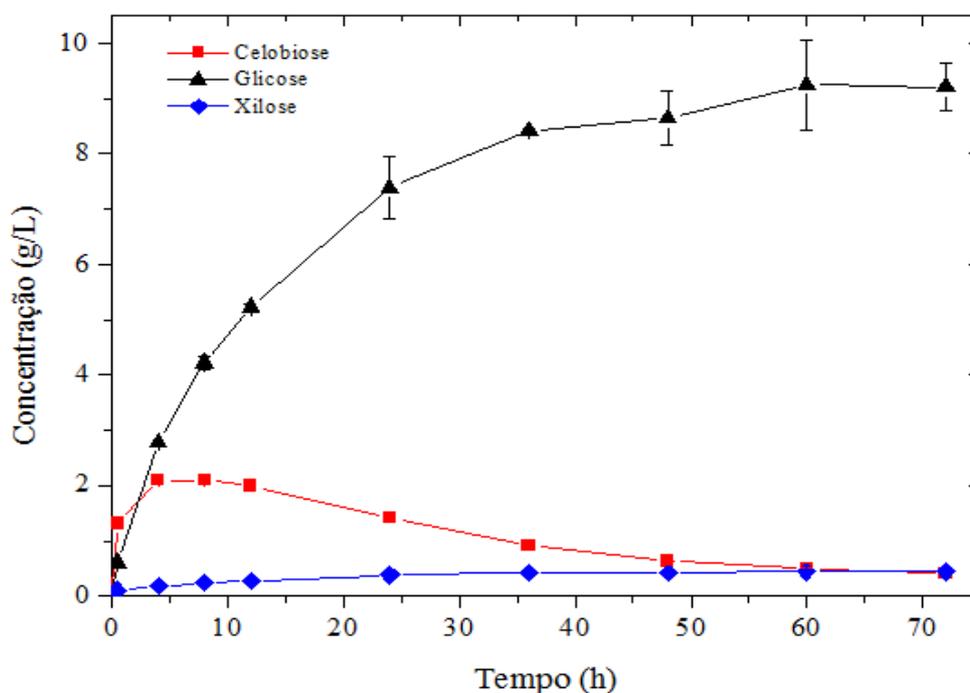
Praticamente, não houve diferença nas conversões obtidas a partir da hidrólise de ambos os bagaços pré-tratados (Figura 4.20). Ao final de 72 horas, foram obtidas conversões de 82,84% e 80,71% para os bagaços pré-tratados nas condições 03 e 07, respectivamente, o que corresponde a uma diferença da ordem de apenas 2,6%.

Maiores conversões de celulose em glicose foram obtidas quando as hidrólises foram realizadas em minirreatores, quando comparadas aos frascos agitados. Isto pode ser explicado pelo fato de nos minirreatores, ter-se uma melhor homogeneização do material

#### 4.4.3 Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica em biorreator

##### 4.4.3.1 Hidrólise enzimática

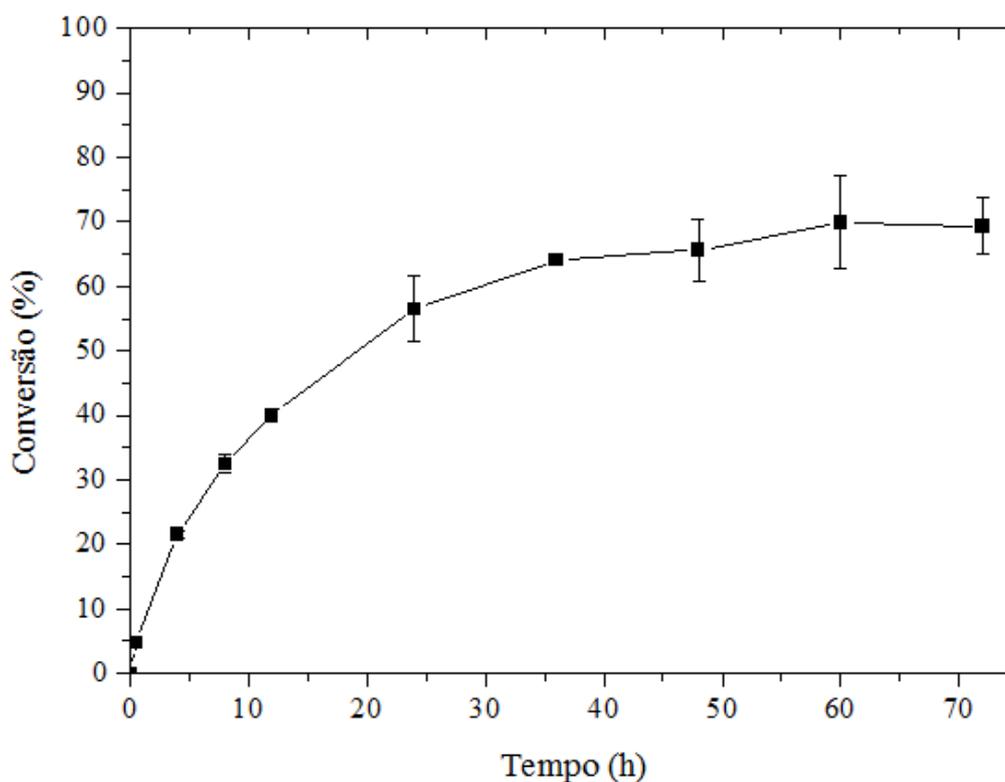
A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, nas condições de 186 °C, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%, durante 8 minutos, que corresponde ao ensaio 07, descrito pelo planejamento experimental, foi conduzida sob as condições apresentadas no item 3.5.3.1. A Figura 4.21 apresenta os perfis de concentrações dos componentes celobiose, glicose e xilose, obtidas durante o processo de hidrólise.



**Figura 4.21** – Perfis de concentrações dos componentes celobiose, glicose e xilose, obtidas durante o processo de hidrólise enzimática realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific). Condições operacionais: 50 °C, pH 4,8 e agitação de 300 rpm.

Durante o processo de hidrólise realizada em biorreator, utilizando-se as enzimas produzidas no laboratório, a celobiose atingiu a maior concentração (2,09 g/L) no tempo de 4 e 8 horas. A partir de 12 horas, a concentração de celobiose foi sendo reduzida, chegando a 0,41 g/L no tempo final de hidrólise, em 72 horas. A concentração de glicose liberada aumentou com o tempo de hidrólise, alcançando 9,21 g/L em 72 horas. Quanto à xilose, houve uma lenta liberação durante o processo, alcançando 0,44 g/L entre 60 e 72 horas.

O perfil de conversão de celulose em glicose encontra-se apresentando na Figura 4.22, onde ocorreu um aumento contínuo da conversão de celulose em glicose, chegando a 69,31% no tempo de 72 horas de hidrólise.

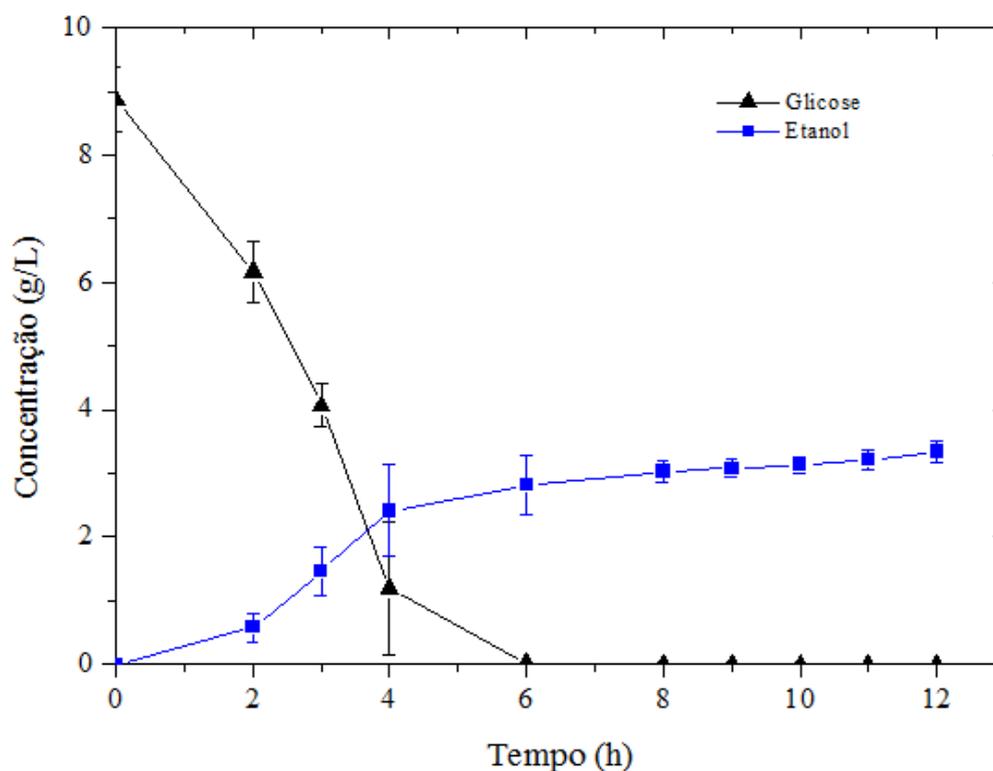


**Figura 4.22** – Perfil de conversão enzimática de celulose em glicose durante o processo hidrólise realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific).

Em relação ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, o rendimento de glicose em 72 horas de hidrólise, após o bagaço ter sido submetido à pré-tratamento, nas condições do ensaio 07, foi de 122,35 g<sub>glicose</sub>/0,5 kg<sub>bagaço in natura</sub> (Tabela F.21–Apêndice F).

#### 4.4.3.2 Fermentação alcoólica

Ao final de 72 horas de hidrólise realizada no biorreator, utilizando as enzimas produzidas no laboratório, todo o material contido no biorreator (hidrolisado enzimático mais o sólido remanescente) foi submetido ao processo de fermentação alcoólica, utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. A fermentação foi conduzida sob as condições descritas no item 3.5.3.2. Os perfis de concentrações de glicose e etanol estão apresentados na Figura 4.23.



**Figura 4.23**– Perfis de concentrações de glicose e etanol obtidos durante o processo de fermentação alcoólica de hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado. Fermentação realizada em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific).

Após 6 horas de fermentação toda a glicose foi consumida, sendo a concentração de etanol, obtida neste tempo, de 2,82 g/L.

O fator de conversão de glicose em etanol alcançou, em 4 horas de fermentação, um valor de  $0,30 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ , que corresponde a apenas 58,7% do valor teórico apresentado por *Saccharomyces cerevisiae*, que é de  $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ . Tomando por base o bagaço de

cana-de-açúcar *in natura*, submetido inicialmente ao pré-tratamento, o rendimento em etanol foi de  $36,71 \text{ g}_{\text{etanol}}/0,5 \text{ kg}_{\text{bagaço in natura}}$ . Em relação à produtividade, esta alcançou um valor de  $0,60 \text{ g/L.h}$ , em 4 horas de fermentação.

O fator de conversão de glicose em etanol ficou próximo ao encontrado no trabalho realizado por Santos e Gouveia (2009), quando submeteram o hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado a vapor à fermentação alcoólica, que foi de  $0,29 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ .

---

***RESUMO DOS  
RESULTADOS***

---

## 5. RESUMO DOS RESULTADOS

### Pré-tratamento – Planejamento experimental

- Os modelos codificados, representativos das concentrações de celulose ( $C\%$ ), hemicelulose ( $H\%$ ), lignina ( $L\%$ ), na fração sólida de bagaço, assim como para a hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ), foram significativos e preditivos.
- Altas solubilizações de hemicelulose foram alcançadas na temperatura de 186 °C, sendo a temperatura a única variável estatisticamente significativa no intervalo estudado.
- O pré-tratamento com ácido fosfórico 0,20% a 186 °C, durante 8 minutos, apresentou-se eficiente em solubilizar a hemicelulose, alcançando uma solubilização de 96%.
- O ácido fosfórico a 0,20% encontra-se em um nível adequado para suprir as necessidades de fósforo em um processo de fermentação, utilizando-se o hidrolisado hemicelulósico.

### Pré-tratamentos – Hidrotérmicos e com ácido mais concentrado

- Os pré-tratamentos hidrotérmicos a 186 e 195 °C, quando comparados ao pré-tratamento ácido, apresentaram-se menos eficientes em solubilizar a hemicelulose.
- As solubilizações de hemicelulose foram de 97 e 98%, quando o bagaço foi pré-tratado com  $H_3PO_4$  1% (m/v), durante 8 minutos, a 186 e 195 °C, respectivamente.
- Na condição de pré-tratamento com  $H_3PO_4$  1% (m/v), durante 8 minutos a 195 °C, em que se obteve a maior solubilização de hemicelulose, que foi de 98%, também ocorreu a maior solubilização de celulose (da ordem de 39%).

### Hidrólise enzimática

- As maiores conversões de celulose em glicose, por hidrólise enzimática, foram obtidas a partir de bagaços pré-tratados sob condições mais drásticas. Ou seja, dentro das condições do planejamento experimental, as maiores conversões foram

alcançadas para os bagaços pré-tratados nas condições 03, 04, 07 e 08, que corresponderam à temperatura de 186 °C (maior temperatura empregada no planejamento). Em relação aos bagaços pré-tratados em condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado, a maior conversão foi obtida na hidrólise do bagaço pré-tratado a 195 °C e 1% (m/v) de ácido fosfórico.

- Conversões da ordem de 80 e 86% foram alcançadas na hidrólise de bagaços pré-tratados a 186 °C, durante 8 minutos, com concentrações de ácido fosfórico de 0,20 e 1%, respectivamente. Nas mesmas condições de tempo e temperatura, uma conversão de 76% foi obtida quando o bagaço foi pré-tratado hidrotermicamente.
- Para o bagaço pré-tratado a 195 °C com ácido fosfórico 1%, a conversão de celulose em glicose foi da ordem de 87%, ficando muito próxima a alcançada na temperatura de 186 °C, nas mesmas condições de concentração de ácido e tempo.
- As enzimas produzidas no laboratório apresentaram-se eficientes em hidrolisar os bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados. Praticamente não houve diferença entre as conversões enzimáticas de celulose em glicose, quando se utilizou enzimas comerciais ou enzimas produzidas no laboratório.

### Fermentação Alcoólica

- A fermentação alcoólica do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado nas condições de 186 °C, com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,20% (m/v), durante 8 minutos, em biorreator de bancada, levou a um fator de conversão de glicose em etanol de 0,30  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ , sendo o rendimento de etanol em relação ao bagaço *in natura* de 73,42  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{kg}_{\text{bagaço in natura}}$ .
- Na fermentação do hidrolisado enzimático, juntamente com fração sólida remanescente da hidrólise enzimática não foi observada a inibição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

---

# *CONCLUSÃO*

---

## 6. CONCLUSÃO

O pré-tratamento com ácido fosfórico diluído (0,20%) é muito eficaz na solubilização de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, chegando a 98% de solubilização a 186 °C. Nesta condição, o ácido fosfórico remanescente no hidrolisado hemicelulósico encontra-se em um nível adequado para suprir as necessidades de fósforo em processos de fermentação deste hidrolisado para a produção de combustível, produtos químicos ou enzimas, em biorrefinarias.

Em altas temperaturas, a influência da concentração de ácido fosfórico na eficiência do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar é reduzida. O pré-tratamento a 195 °C, sem adição de ácido fosfórico (pré-tratamento hidrotérmico), embora apresente uma capacidade levemente inferior de solubilizar a hemicelulose, quando comparado a pré-tratamentos ácidos realizados a 186 e 195 °C, é capaz de solubilizar mais de 90% deste componente, e a perda de celulose é menor. Por outro lado, a digestibilidade da celulose é inferior, mas a conversão poderá ser eficiente com a utilização de processo adequado de hidrólise enzimática e de coquetel enzimático mais eficaz. Dentro do conceito de biorrefinaria, o pré-tratamento hidrotérmico apresenta-se como uma alternativa tecnicamente viável.

## SUGESTÕES

Para trabalhos futuros sugerem-se:

- Estudo cinético detalhado da hidrólise enzimática da fração de celulignina;
- Estudo da viabilidade da produção de enzimas utilizando-se a fração hemicelulósica como substrato.

---

# *REFERÊNCIAS*

---

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

AHMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

ALVARADO-MORALES, M.; TERRA, J.; GERNAEY, K. V.; WOODLEY, J. M. Biorefining: Computer aided tools for sustainable design and analysis of bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1171-1183, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

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

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, p. 109-116, 2012.

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/organização. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

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

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA Jr., N. **Enzimas na produção de etanol**. In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado (E. P. S. Bon, M. A. Ferrara, M. L. Corvo, Eds), p. 241-271. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. . **J Ind Microbiol Biotechnol**, DOI 10.1007/s10295-010-0931-2.

CARA, C., MOYA, M., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., GONZÁLEZ, A., RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1003-1009, 2007.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 64-73, 2010.

CARVALHO, W.; BATISTA, M. A.; CANILHA, L.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1308-1312, 2004.

CGEE. Química verde no Brasil: 2010-2030 – Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

CGEE. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil – Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2009.

CONAB–Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 27.07.2012

D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEL, I.; STEWART G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2, p. 365-372, 1988.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206 – 1216, 2009.

DIAS, M. O. S., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROCHA, G. J. M., PRADELLA, J. G. C., ROSSEL, C. E. V., MACIEL FILHO, R., BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8964-8971, 2011.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152-161, 2012.

DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut- C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 394-401, 2000.

DRIEMEIER, C.; PIMENTA, M. T. B.; ROCHA, G. J. M.; OLIVEIRA, M. M.; MELLO, D. B.; MAZIERO, P.; GONÇALVES, A. R. Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**. DOI 10.1007/s10570-011-9592-1, 2011.

DRIEMEIER, C.; SANTOS, W. D.; BUCKERIDGE, M. S. Cellulose crystals in fibrovascular bundles of sugarcane culms: orientation, size, distortion, and variability. **Cellulose**. DOI 10.1007/s10570-012-9743-z, v. 19, p. 1507-1515, 2012.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A.; HAYN, M. Production of *Trichoderma* Cellulase in Laboratory and Pilot Scale. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 51-65, 1991.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org>. Acesso em 28.03.2012.

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

GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52(13), p. 4172-4177, 2004.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

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

GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1851-1857, 2010.

GEDDES, C. C.; NIEVES, I. U.; INGRAM, L. O. Advances in ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 312-319, 2011.

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

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidases and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32 (Nº 6), p. 1500-1503, 2009.

GRAY, K. A., ZHAO, L., EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 141-146, 2006.

GUO, G.; HSU, D.; CHEN, W.; CHEN, W.; HWANG, W. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 80 – 87, 2009.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29 (9), p. 419-425, 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24 (12), p. 549-556, 2006.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1287-1294, 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M., ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Biouresouce Technology**, v. 100, p.10-18, 2009.

HIMMEL, M.E.. **Biomass Recalcitrance. Deconstructing the plant cell wall for bioenergy**. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2008.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, p.119-134, 2007.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KRISTENSEN, J. B.; THYGESEN, L. G.; FELBY, C.; JORGENSEN, H.; ELDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuel**, v. 1:5, p. 1-9, 2008.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL Jr., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Biouresouce Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. **Catalysis Today**, v. 63, p. 257-265, 2000.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The Effect of Flow Rate of Compressed Hot Water on Xylan, Lignin, and Total Mass Removal from Corn Stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 5409-5416, 2003.

LO, C.; ZHANG, Q.; NICHOLAS, V. C.; JU, L. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysates prepared to retain more oligosaccharides for induction. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 717-723, 2010.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 66 (Nº 3), p. 506-577, 2002.

MANDELS, M., WEBER, J. The Production of Cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>

MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N-O; JÖNSSON, L. J. Comparison of the Fermentability of Enzymatic Hydrolyzates of Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion Using Different Impregnating Agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 699-716, 2002.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemical & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MITTAL, A.; CHATTERJEE, S. G.; SCOTT, G. M.; AMIDON, T. E. Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple and aspen wood chips: reaction kinetics and mass transfer. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 3031-3041, 2009.

MONIRUZZAMAN, M. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. **Biouresource Techonology**, v. 55, p. 111-117, 1996.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biouresource Techonology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

ÖHGREN, K., BURAS, R., SADDLER, J., ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503-2510, 2007.

OJEDA, K.; ÁVILA, O.; SUÁREZ, J.; KAFAROV, V. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 270 – 279, 2011.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. Dissertação de Mestrado, Lorena, SP: Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1:7, p. 1-14, 2008.

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

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R-C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 879-903, 2012.

PERI, S.; KARRA, S.; LEE, Y. Y.; KARIM, M. N. Modeling Intrinsic Kinetics of Enzymatic Cellulose Hydrolysis. **Biotechnol. Prog.**, v. 23, p. 626-637, 2007.

PITARELO, A. P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Cana de Cana-de-açúcar à Bioconversão via Pré-tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática**, Dissertação de Mestrado. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2007.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK Jr, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, p. 484-489, 2006.

RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; SILVA, T. A. Efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. In: Congresso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel, 5, 2008, Guadalajara, Jalisco, México. **Anais do V Congresso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel**, Guadalajara, 2008, v. 1, p. 1-10. Impreso.

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar Assistida por Oxigênio**, Tese de Doutorado. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos, 2000.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSEL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274-279, 2012.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antonio Francisco. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SÁ, C. B. C. **CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Zymomonas mobilis* PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**, Dissertação de Mestrado. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks (Review). **Biouresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANDERS, J. P. M.; CLARCK, J. H.; HARMSSEN, G. J.; HEERES, H. J.; HEIJNEN, J. J.; KERSTEN, S. R. A.; VAN SWAAIJ, W. P. M.; MOULIJN, J. A. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing**, v. 51, p. 117-136, 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 11, n.1, p. 27-33, 2009.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SEIBOTH, B.; PAKDAMAN, B.S.; HARTL, L.; KUBICEK, C. P. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 42-48, 2007.

SILVA, M. J. **PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASE POR *Trichoderma reesei* RUT C30 PARA HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE ETANOL**. Monografia. Recife, PE: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

SILVA, M. J.; SANTOS, S. F. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Produção de Celulase e Xilanase em Meios a Base de Pré-hidrolisado de Palha de Cana-de-Açúcar e Lactose. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 18, 2011, Caxias do Sul, RS. **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul: ABEQ, 2011, v.1, p. 1-6. Pen Drive.

SILVA, V. F. N.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **J Ind Microbiol Biotechnol**, DOI 10.1007/s10295-010-0815-5.

SIM, S. F.; MOHAMED, M.; LU, N. A. L. M. I.; SARMAN, N. S. P.; SAMSUDIN, S. N. S. Computer-assisted analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra for characterization of various treated and untreated agriculture biomass. **BioResources**, v. 7 (4), p. 5367-5380, 2012.

SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 7/17/2005. Technical Report NREL/TP – 510-42619.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 12/08/2006. Technical Report NREL/TP – 510-42623.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Issue Date: 4/25/2008. Technical Report NREL/TP – 510-42618.

SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., MEDEIROS, A. B. P., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., PITARELO, A. P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., BON, E. P. S., MORAES, L. M. P., ARAÚJO, J. A., TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, p. 472-499, 2007.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

UDOP – União dos Produtores de Bioenergia. Disponível em: <http://www.udop.com.br>. Acesso em 25.11.2012.

UM, B.H.; KARIM, M.; HENK, L. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 115-125, 2003.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1458-1480, 2012.

VASCONCELOS, S. M.; LIMA, J. S.; FERREIRA, M. A. B.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Reprodutibilidade dos Hidrolisados obtidos em Pré-tratamento Hidrotérmico de Bagaço de Cana-de-açúcar. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 18, 2011, Caxias do Sul, RS. **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul: ABEQ, 2011, v.1, p. 1-6. Pen Drive.

VÁZQUEZ, M.; OLIVA, M.; TÉLLEZ-LUIS, S.J.; RAMÍREZ, J.A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3053-3060, 2007.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 160-169, 2012.

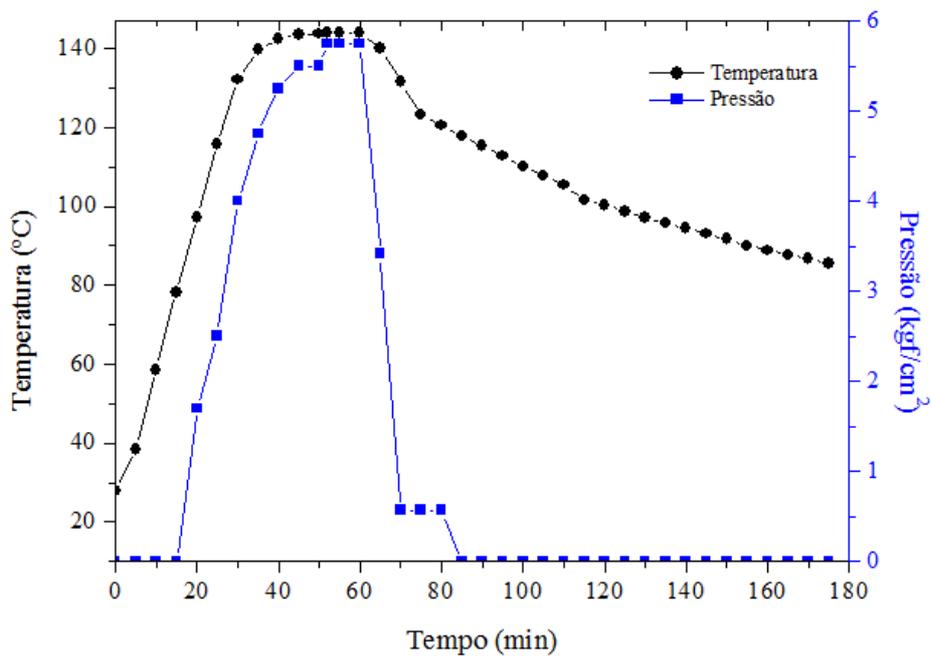
ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y.; LIAO, W. Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 16-24, 2012.

---

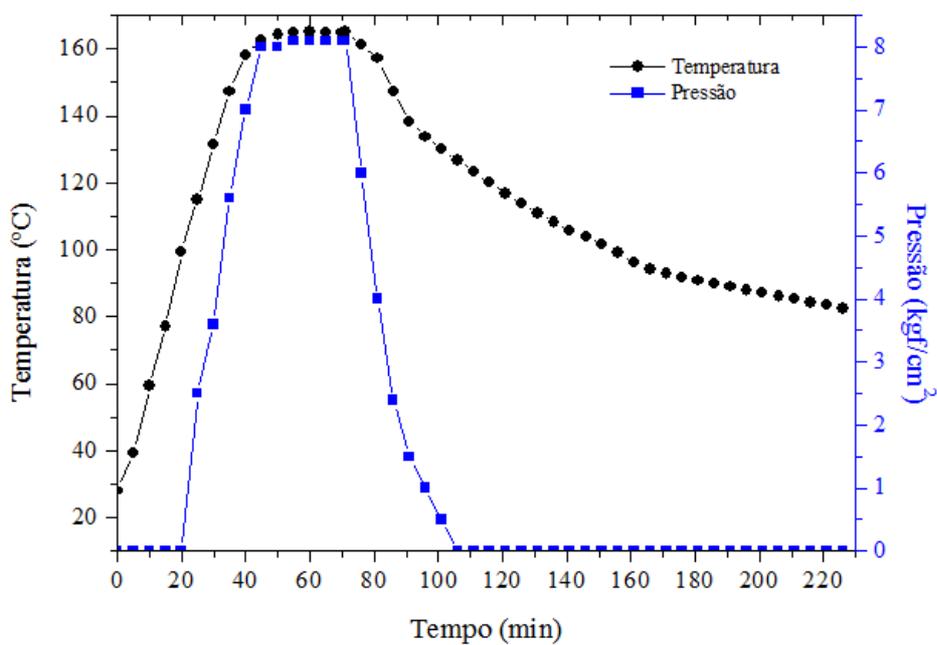
# ***APÊNDICE A***

***Rampas características de  
aquecimento do reator de 20 L  
(Regmed, AU/E-20)***

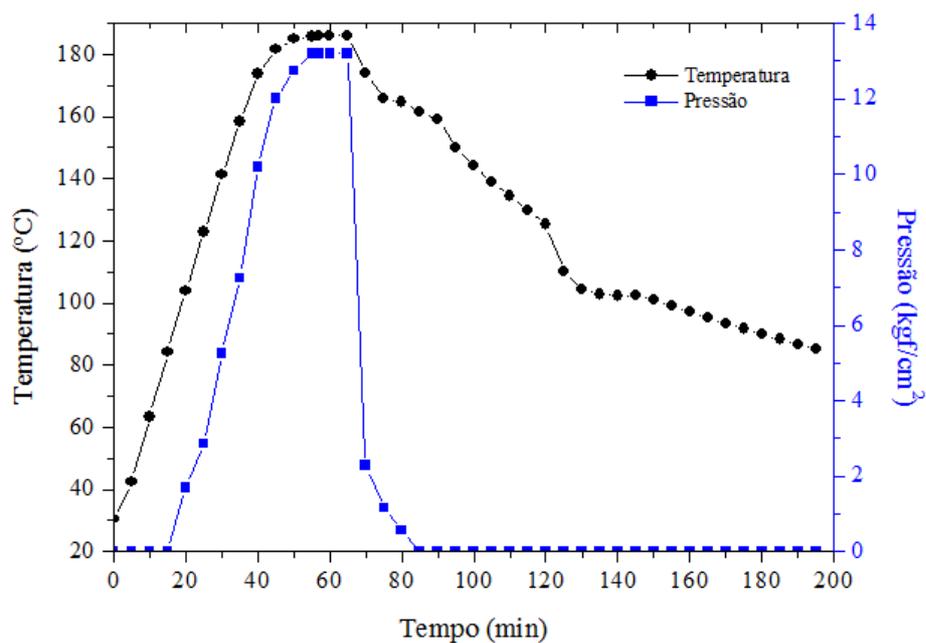
---



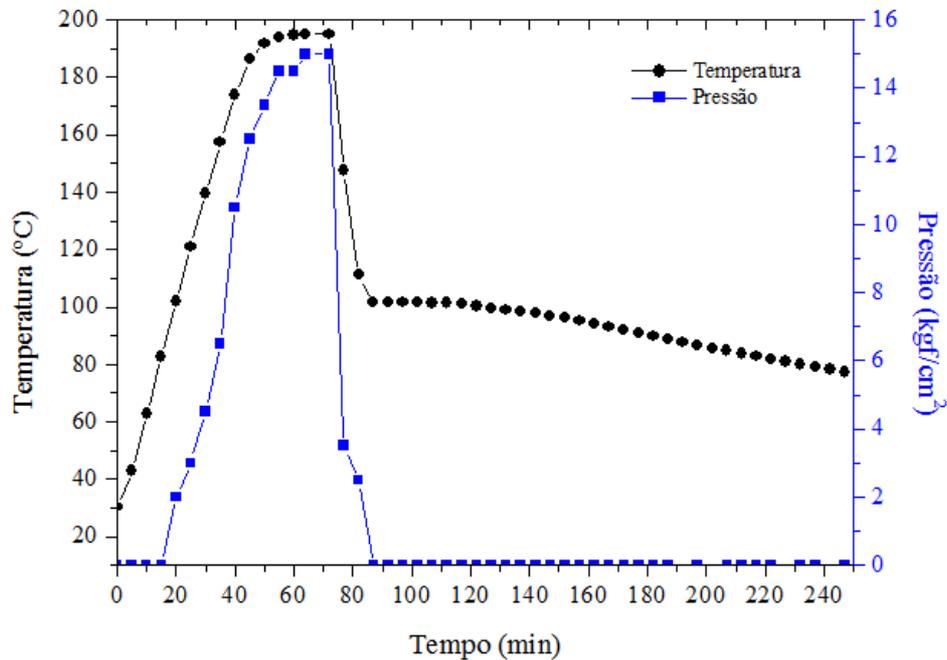
**Figura A.1** - Rampa de variação de temperatura e pressão em função do tempo. Temperatura de trabalho – 144 °C.



**Figura A.2** - Rampa de variação de temperatura e pressão em função do tempo. Temperatura de trabalho – 165 °C.



**Figura A.3** - Rampa de variação de temperatura e pressão em função do tempo. Temperatura de trabalho – 186 °C.



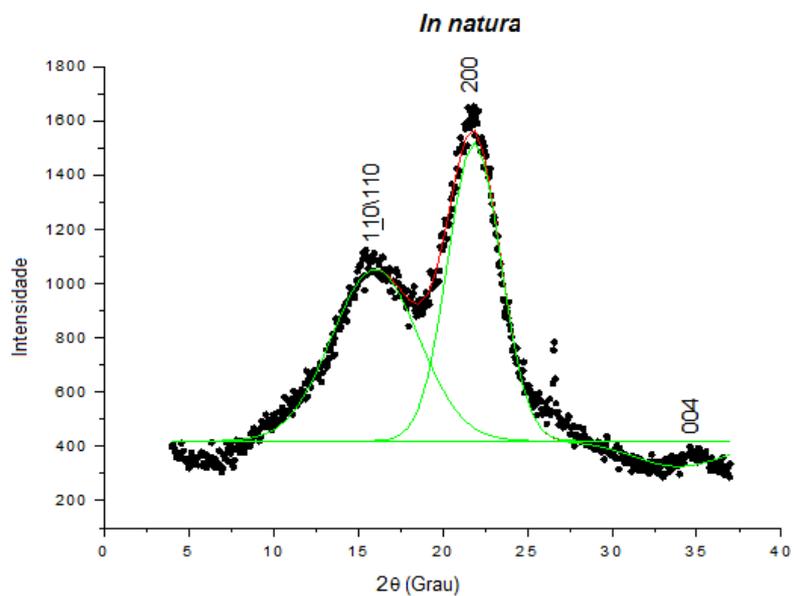
**Figura A.4** - Rampa de variação de temperatura e pressão em função do tempo. Temperatura de trabalho – 195 °C.

---

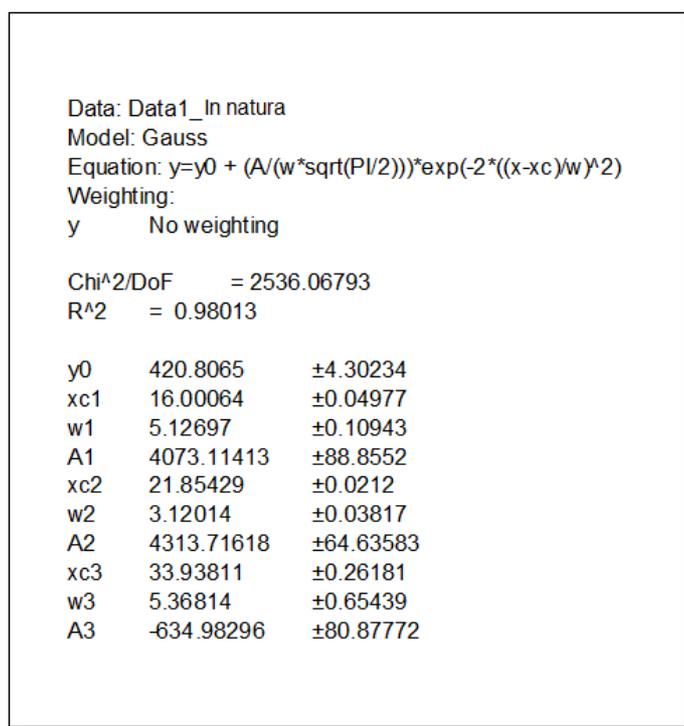
# ***APÊNDICE B***

***Difratometria de raios-X***

---

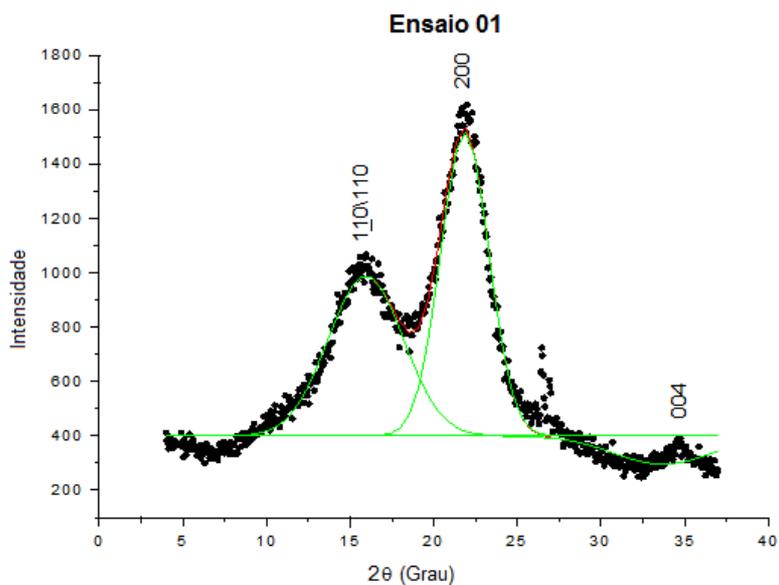


(a)



(b)

**Figura B.1** - Ajuste da curva gaussiana aos dados experimentais de DRX de bagaço de cana *in natura* (a); dados de ajuste (b).

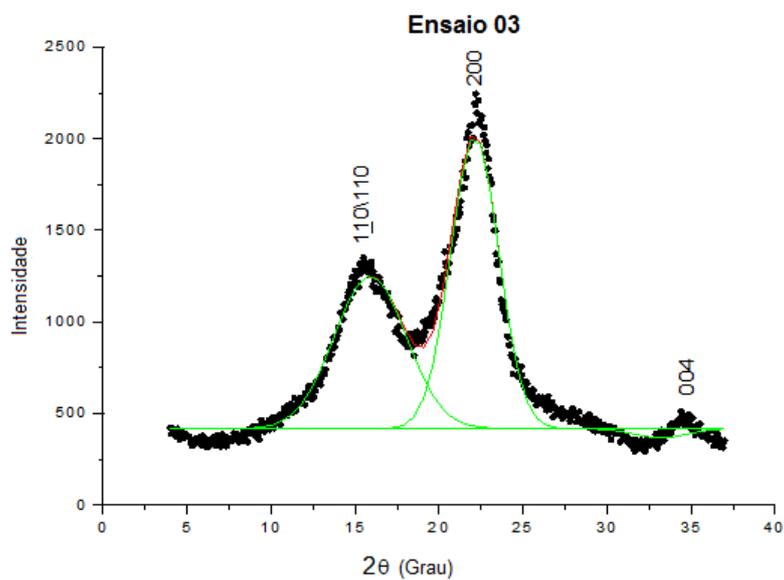


(a)

Data: DRXsugarcaneb_ Ensaio 01		
Model: Gauss		
Equation: $y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2})) * \exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Weighting:		
y	No weighting	
Chi <sup>2</sup> /DoF = 2376.07764		
R <sup>2</sup> = 0.97911		
y0	399.95245	±4.0486
xc1	15.93248	±0.03778
w1	4.49505	±0.08879
A1	3324.04517	±66.14705
xc2	21.85129	±0.01629
w2	2.88177	±0.03191
A2	4043.57981	±46.82196
xc3	33.6909	±0.24251
w3	5.86039	±0.60397
A3	-763.05615	±82.36484

(b)

**Figura B.2** – Ajuste da curva gaussiana aos dados experimentais de DRX bagaço de cana pré-tratado (Ensaio 01) (a); dados de ajuste (b).

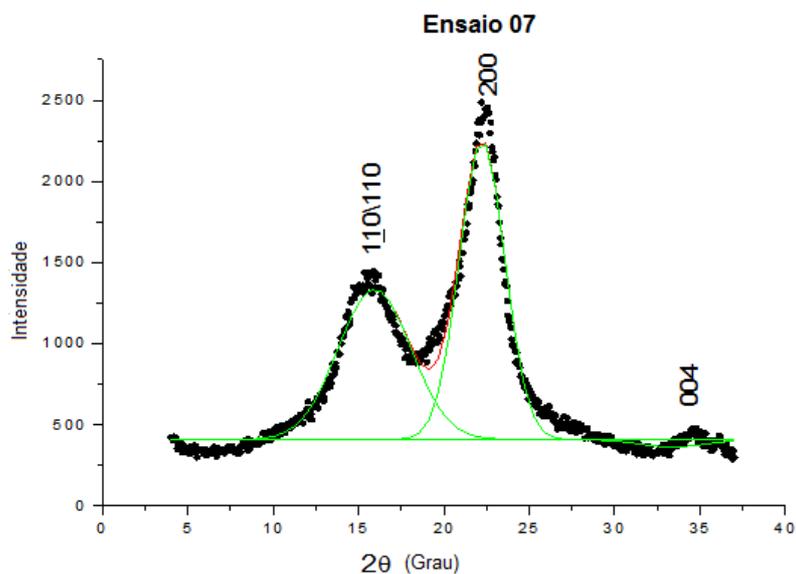


(a)

Data: DRXsugarcaneb_ Ensaio 03		
Model: Gauss		
Equation: $y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2})) * \exp(-2*((x-xc)/w)^2)$		
Weighting:		
y	No weighting	
Chi <sup>2</sup> /DoF = 4653.89294		
R <sup>2</sup> = 0.9773		
y0	417.43523	±4.8053
xc1	15.90035	±0.03261
w1	4.27866	±0.0757
A1	4468.41814	±77.32552
xc2	22.12299	±0.01427
w2	2.85615	±0.02938
A2	5726.91069	±57.95354
xc3	33.18627	±0.40265
w3	3.10578	±0.89993
A3	-195.56341	±58.50338

(b)

**Figura B.3** – Ajuste da curva gaussiana aos dados experimentais de DRX de bagaço de cana pré-tratado (Ensaio 03) (a); dados de ajuste (b).



(a)

Data:	DRXsugarcaneb_ Ensaio 07	
Model:	Gauss	
Equation:	$y=y_0 + (A/(w*\sqrt{\pi/2})) * \exp(-2*((x-xc)/w)^2)$	
Weighting:	y No weighting	
Chi <sup>2</sup> /DoF	= 6641.27967	
R <sup>2</sup>	= 0.97404	
y0	410.83867	±5.97667
xc1	15.93743	±0.03359
w1	4.27152	±0.07862
A1	4952.11658	±91.6107
xc2	22.2294	±0.01373
w2	2.67446	±0.02848
A2	6173.56314	±64.6414
xc3	33.39812	±0.59473
w3	3.86524	±1.38751
A3	-223.95303	±83.77851

(b)

**Figura B.4** – Ajuste da curva gaussiana aos dados experimentais de DRX de bagaço de cana pré-tratado (Ensaio 07) (a); dados de ajuste (b).

---

# *APÊNDICE C*

*Pré-tratamento de bagaço  
de cana-de-açúcar*

---

### *Planejamento Experimental*

As massas obtidas após cada ensaio de pré-tratamento, em base seca, encontram-se na Tabela C.1.

**Tabela C.1** – Massas das frações sólidas insolúveis obtidas em cada condição de pré-tratamento (em base seca).

Ensaio	Variáveis			Massa final (g)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	366,14
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	394,70
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	276,79
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	268,78
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	354,02
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	326,65
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	271,48
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	262,60
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	253,70
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	271,65
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	294,80

Uma massa seca de 500 g de bagaço de cana *in natura* foi submetida à etapa de pré-tratamento. Dados de caracterização química, em relação aos componentes individuais constituintes do bagaço, encontram-se na Tabela C.2, para uma base de 500 gramas de bagaço.

**Tabela C.2** – Componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com base em 500 gramas de massa seca.

Componentes	Massa (g)	Fração mássica (%)
Celobiose	3,07	0,61
Glicose	210,12	42,02
Ácido Fórmico	2,23	0,45
HMF	1,25	0,25
Xilose	118,63	23,73
Arabinose	11,58	2,32
Furfural	6,11	1,22
Ácido Acético	20,16	4,03
Lignina	92,60	18,52
Total	465,75	93,15

Na Tabela C.3 está apresentada a memória de cálculos aplicada na determinação das quantidades dos componentes macromoleculares (celulose e hemicelulose), que leva em consideração a aplicação de fatores de conversão para cada um dos componentes identificados, cujos valores mássicos encontram-se na Tabela C.2.

Na Tabela C.4 são apresentados os dados de composição química, em função dos componentes celulose, hemicelulose (cálculos apresentados na Tabela C.3) e da lignina, para uma massa base de 500 gramas de bagaço.

**Tabela C.3**– Memória de cálculos empregada para determinação dos componentes macromoleculares (celulose e hemicelulose) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Componente	Fator de Conversão	Componente macromolecular (Celulose – C; Hemicelulose – H)
Celobiose	0,95	C = Celobiose (g) *0,95 → <b>C = 2,92 g</b>
Glicose	0,90	C = Glicose (g) *0,90 → <b>C = 189,11 g</b>
Ác. Fórmico	3,09	C = Ác. Fórm (g) *3,09 → <b>C = 6,89 g</b>
HMF	1,29	C = HMF (g) * 1,29 → <b>C = 1,61 g</b>
Xilose	0,88	H = Xilose (g) * 0,88 → <b>H = 104,39 g</b>
Arabinose	0,88	H = Arabinose (g) * 0,88 → <b>H = 10,19 g</b>
Furfural	1,37	H = Furfural (g) * 1,37 → <b>H = 8,37 g</b>
Ác. Acético	0,72	H = Ác. Acéticos (g) * 0,72 → <b>H = 14,52 g</b>

C: Celulose; H: Hemicelulose

**Tabela C.4**– Componentes macromoleculares presentes no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com base em 500 gramas de bagaço.

Componente	Massa (g)
Celulose	200,53
Hemicelulose	137,47
Lignina	92,60

As Tabelas C.5 e C.6 apresentam os resultados de caracterização química das frações sólidas insolúveis, obtidas em cada uma das condições de pré-tratamento, de acordo com o planejamento experimental. Os resultados apresentados correspondem às massas reais obtidas após pré-tratamento (massas apresentadas na Tabela C.1).

**Tabela C.5** - Componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, com base na massa real da fração sólida obtida.

Ensaio	Variáveis			Componente (g)								
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Cb	Gli	Xl	Ara	AcF	AcA	HMF	Fur	Lig
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,00	179,10	63,90	1,45	4,90	10,91	1,43	5,77	88,10
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,78	189,40	66,68	2,85	2,07	11,18	1,19	4,10	92,23
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,00	181,21	9,54	0,00	0,87	1,23	1,27	0,00	81,17
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,00	178,67	7,11	0,00	0,74	0,93	1,16	0,00	79,66
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,54	189,00	50,66	1,14	1,00	7,77	1,26	2,20	90,81
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,00	183,82	42,48	2,32	2,00	7,20	1,28	3,53	83,74
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,00	163,28	3,03	0,56	1,93	0,99	1,10	0,84	78,90
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,00	161,03	1,90	0,40	1,99	0,71	1,10	0,55	79,57
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,00	145,98	16,20	0,86	1,10	2,57	0,93	1,17	65,28
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,00	162,56	17,16	1,01	1,36	3,03	1,01	1,13	71,33
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,00	172,48	19,78	1,07	1,30	3,24	1,10	1,23	77,50

Cb: Celobiose; Gli: Glicose; Xl: Xilose; Ara: Arabinose; AcF: Ácido Fórmico; AcA: Ácido Acético; HMF: Hidroximetilfurfural; Fur: Furfural; Lig: Lignina

**Tabela C.6** - Composição química (m/m) da fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes condições de pré-tratamento (planejamento experimental).

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Celulose (g)	Hemicelulose (g)	Lignina (g)
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	167,20	73,28	88,10
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	188,42	78,68	92,23
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	167,41	9,28	81,17
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	164,60	6,92	79,66
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	175,31	54,24	90,81
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	173,26	48,80	83,74
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	158,85	4,87	78,90
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	152,47	3,27	79,57
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	145,64	19,63	65,28
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	153,96	20,06	71,33
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	165,13	22,64	77,50

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico

**Tabela C.7** - Composição química dos hidrolisados ácidos obtidos após cada ensaio de pré-tratamento, após sofrerem um processo de pós-hidrólise

Ensaio	Variáveis			Concentração (g/L)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Cb	Gli	Xl	Ara	AcF	AcA	HMF	Fur
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,23	1,21	3,48	0,69	0,01	0,56	0,11	0,06
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,24	1,28	4,09	0,69	0,02	0,66	0,11	0,07
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,12	1,69	5,76	0,43	0,11	1,38	0,19	0,82
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,00	1,26	3,18	0,24	0,11	1,08	0,19	0,95
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,28	1,51	5,60	0,75	0,02	0,91	0,11	0,10
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,29	1,55	6,63	0,78	0,03	1,03	0,11	0,12
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,00	2,44	7,84	0,64	0,04	1,56	0,24	0,61
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,00	2,04	4,93	0,40	0,14	1,26	0,23	0,59
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,10	1,18	7,02	0,56	0,03	1,10	0,05	0,22
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,13	1,38	8,50	0,67	0,03	1,29	0,05	0,24
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,12	1,35	7,43	0,63	0,02	1,18	0,07	0,23

Cb: Celobiose; Gli: Glicose; Xl: Xilose; Ara: Arabinose; AcF: Ácido Fórmico; AcA: Ácido Acético; HMF: Hidroximetilfurfural; Fur: Furfural; Lig: Lignina

**Pré-tratamento hidrotérmico e com ácido mais concentrado**

**Tabela C.8** - Massas das frações sólidas insolúveis obtidas em cada condição de pré-tratamento aplicada na validação experimental (em base seca).

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Massa final (g)
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	
A	8	186	0,0	305,59
B	8	195	0,0	282,13
C	8	186	1,0	257,45
D	8	195	1,0	226,53

**Tabela C.9** – Componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com base em 500 gramas de massa seca (Bagaço safra 2010/2011).

Componentes	Massa (g)	Fração mássica (%)
Celobiose	N.D	0,00
Glicose	220,05	44,01
Ácido Fórmico	1,65	0,33
HMF	1,73	0,35
Xilose	126,96	25,39
Arabinose	10,65	2,13
Furfural	6,62	1,32
Ácido Acético	18,71	3,74
Lignina	98,56	19,71
Total	484,92	96,98

**Tabela C.10** – Componentes macromoleculares presentes no bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com base em 500 gramas de bagaço (bagaço utilizado nos ensaios de validação).

Componente	Massa (g)
Celulose	205,37
Hemicelulose	143,63
Lignina	98,56

**Tabela C.11** - Componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, com base na massa real da fração sólida obtida.

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Componente (g)								
	Tempo (min)	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (m/v)	Cb	Gli	Xl	Ara	AcF	AcA	HMF	Fur	Lig
A	8	186	0,0	0,00	192,19	21,18	1,15	0,99	0,86	1,46	0,72	83,56
B	8	195	0,0	0,00	189,09	11,88	0,69	0,90	0,00	1,35	0,16	87,59
C	8	186	1,0	0,00	164,02	4,06	0,70	0,83	0,00	1,18	0,00	88,30
D	8	195	1,0	0,00	134,96	2,83	0,48	0,69	0,00	0,97	0,00	86,56

Cb: Celobiose; Gli: Glicose; Xl: Xilose; Ara: Arabinose; AcF: Ácido Fórmico; AcA: Ácido Acético; HMF: Hidroximetilfurfural; Fur: Furfural; Lig: Lignina

**Tabela C.12** - Composição química (m/m) da fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar submetido pré-tratados sob condições hidrotérmica e com ácido mais concentrado.

Ensaio	Tempo (min)	T (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (% m/v)	Celulose (g)	Hemicelulose (g)	Lignina (g)
A	8	186	0,0	177,91	21,26	83,56
B	8	195	0,0	174,72	11,27	87,59
C	8	186	1,0	151,70	4,18	88,30
D	8	195	1,0	124,83	2,92	86,56

---

# ***APÊNDICE D***

***Análise estatística***

---

**Tabela D.1** – Estimativa dos efeitos para a concentração de celulose (C%) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	54,94	0,58	95,26	0,000000	53,34	56,54
X <sub>1</sub>	1,47	1,35	1,09	0,337506	-2,28	5,23
X <sub>2</sub>	10,60	1,35	7,83	0,001433	6,84	14,35
X <sub>3</sub>	1,01	1,35	0,75	0,495735	-2,74	4,77
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-1,33	1,35	-0,98	0,381939	-5,08	2,43
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,06	1,35	0,04	0,968129	-3,70	3,81
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-3,59	1,35	-2,65	0,056844	-7,34	0,17

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico;  
p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.2** – Coeficientes de regressão para a resposta concentração de celulose (C%) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	54,94	0,58	95,26	0,000000	53,34	56,54
X <sub>1</sub>	0,74	0,68	1,09	0,337506	-1,14	2,61
X <sub>2</sub>	5,30	0,68	7,83	0,001433	3,42	7,18
X <sub>3</sub>	0,51	0,68	0,75	0,495735	-1,37	2,38
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,66	0,68	-0,98	0,381939	-2,54	1,21
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,03	0,68	0,04	0,968129	-1,85	1,91
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-1,79	0,68	-2,65	0,056844	-3,67	0,08

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.3** – Estimativa dos efeitos para a concentração hemicelulose (H%) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	9,27	0,51	18,06	0,000055	7,84	10,69
X <sub>1</sub>	-0,45	1,20	-0,37	0,728893	-3,79	2,89
X <sub>2</sub>	-15,31	1,20	-12,72	0,000220	-18,65	-11,97
X <sub>3</sub>	-3,15	1,20	-2,62	0,059101	-6,49	0,19
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,21	1,20	-0,18	0,868435	-3,55	3,13
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	-0,02	1,20	-0,02	0,985980	-3,36	3,32
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	1,70	1,20	1,41	0,231244	-1,64	5,04

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.4** – Coeficientes de regressão para a resposta concentração de hemicelulose ( $H\%$ ) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	9,27	0,51	18,06	0,000055	7,84	10,69
X <sub>1</sub>	-0,22	0,60	-0,37	0,728893	-1,89	1,45
X <sub>2</sub>	-7,65	0,60	-12,72	0,000220	-9,32	-5,98
X <sub>3</sub>	-1,57	0,60	-2,62	0,059101	-3,24	0,10
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,11	0,60	-0,18	0,868435	-1,78	1,56
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	-0,01	0,60	-0,02	0,985980	-1,68	1,66
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	0,85	0,60	1,41	0,231244	-0,82	2,52

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.5** – Estimativa dos efeitos para a concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	26,88	0,25	106,43	0,000000	26,18	27,58
X <sub>1</sub>	0,11	0,59	0,18	0,864808	-1,54	1,75
X <sub>2</sub>	4,81	0,59	8,12	0,001253	3,16	6,45
X <sub>3</sub>	1,16	0,59	1,95	0,122367	-0,49	2,80
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,67	0,59	1,14	0,319636	-0,97	2,32
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,31	0,59	0,53	0,625694	-1,33	1,96
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-0,97	0,59	-1,63	0,177719	-2,61	0,68

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.6** – Coeficientes de regressão para a resposta concentração de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	26,88	0,25	106,43	0,000000	26,18	27,58
X <sub>1</sub>	0,05	0,30	0,18	0,864808	-0,77	0,88
X <sub>2</sub>	2,40	0,30	8,12	0,001253	1,58	3,23
X <sub>3</sub>	0,58	0,30	1,95	0,122367	-0,24	1,40
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,34	0,30	1,14	0,319636	-0,49	1,16
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,16	0,30	0,53	0,625694	-0,67	0,98
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-0,48	0,30	-1,63	0,177719	-1,31	0,34

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.7** – Estimativa dos efeitos para a celulose solubilizada ( $C_S$  %) a partir da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	17,84	1,90	9,39	0,000717	12,56	23,11
X <sub>1</sub>	-1,24	4,46	-0,28	0,795385	-13,61	11,14
X <sub>2</sub>	7,56	4,46	1,70	0,164996	-4,81	19,93
X <sub>3</sub>	3,45	4,46	0,77	0,481987	-8,92	15,82
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	3,55	4,46	0,80	0,470227	-8,82	15,92
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	3,35	4,46	0,75	0,493970	-9,02	15,72
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	1,73	4,46	0,39	0,718369	-10,65	14,10

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.8** – Estimativa dos efeitos para a hemicelulose solubilizada ( $H_S$  %) a partir da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	77,40	2,35	32,96	0,000005	70,88	83,92
X <sub>1</sub>	0,72	5,51	0,13	0,902642	-14,57	16,01
X <sub>2</sub>	41,95	5,51	7,62	0,001595	26,66	57,24
X <sub>3</sub>	10,38	5,51	1,89	0,132508	-4,91	25,67
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,72	5,51	0,13	0,902642	-14,57	16,01
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	1,86	5,51	0,34	0,752885	-13,43	17,15
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-7,44	5,51	-1,35	0,248250	-22,73	7,85

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.9** – Estimativa dos efeitos para a solubilização de lignina- $L_S$  (%) - na fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

	Efeito	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	12,66	3,55	3,57	0,023368	2,82	22,51
X <sub>1</sub>	1,42	8,32	0,17	0,872710	-21,67	24,51
X <sub>2</sub>	9,96	8,32	1,20	0,297171	-13,13	33,05
X <sub>3</sub>	1,85	8,32	0,22	0,835295	-21,24	24,93
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,98	8,32	-0,12	0,912321	-24,06	22,11
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	2,77	8,32	0,33	0,755801	-20,32	25,86
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-0,53	8,32	-0,06	0,952243	-23,62	22,56

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.10** – Coeficientes de regressão para a resposta hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) a partir da fração sólida de bagaço de cana-de-açúcar.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(4)	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança. 95%
Média	77,41	2,35	32,99	0,000005	70,89	83,92
X <sub>1</sub>	0,37	2,75	0,13	0,900880	-7,28	8,01
X <sub>2</sub>	20,97	2,75	7,62	0,001592	13,33	28,61
X <sub>3</sub>	5,19	2,75	1,88	0,132626	-2,46	12,83
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,35	2,75	0,13	0,904251	-7,29	7,99
X <sub>1</sub> . X <sub>3</sub>	0,92	2,75	0,34	0,754286	-6,72	8,56
X <sub>2</sub> . X <sub>3</sub>	-3,71	2,75	-1,35	0,248600	-11,35	3,93

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: temperatura e X<sub>3</sub>: concentração de ácido fosfórico  
 p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança)

**Tabela D.11** – Valores experimentais de concentrações de celulose (C%) na fração sólida de bagaço pré-tratado, previstas pelo modelo, erros de ajuste e erros relativos.

Ensaio	C%, experimental	C%, prevista	e= (Y-Ŷ)	Erro relativo (%)
01	45,64	49,64	-4	-8,76
02	47,72	49,64	-1,92	-4,02
03	60,49	60,24	0,25	0,41
04	61,24	60,24	1	1,63
05	49,52	49,64	-0,12	-0,24
06	53,04	49,64	3,4	6,41
07	58,52	60,24	-1,72	-2,94
08	58,06	60,24	-2,18	-3,75
09	57,41	54,94	2,47	4,30
10	56,67	54,94	1,73	3,05
11	56,02	54,94	1,08	1,93

Y: valor experimental, Ŷ: valor previsto pelo modelo

**Tabela D.12** – Valores experimentais de concentrações de hemicelulose (H%) na fração sólida de bagaço pré-tratado, previstas pelo modelo, erros de ajuste e erros relativos.

Ensaio	H%, experimental	H%, prevista	e= (Y-Ŷ)	Erro relativo (%)
01	20,01	16,92	3,09	15,44
02	19,93	16,92	3,01	15,10
03	3,35	1,62	1,73	51,64
04	2,58	1,62	0,96	37,21
05	15,32	16,92	-1,6	-10,44
06	14,93	16,92	-1,99	-13,33
07	1,79	1,62	0,17	9,50
08	1,24	1,62	-0,38	-30,65
09	7,74	9,27	-1,53	-19,77
10	7,38	9,27	-1,89	-25,61
11	7,68	9,27	-1,59	-20,70

Y: valor experimental, Ŷ: valor previsto pelo modelo

**Tabela D.13** – Valores experimentais de concentrações de lignina ( $L\%$ ) na fração sólida de bagaço pré-tratado, previstas pelo modelo, erros de ajuste e erros relativos.

Ensaio	$L\%$ , experimental	$L\%$ , prevista	$e = (Y - \hat{Y})$	Erro relativo (%)
01	24,07	24,48	-0,41	-1,70
02	23,35	24,48	-1,13	-4,84
03	29,33	29,28	0,05	0,17
04	29,64	29,28	0,36	1,21
05	26,04	24,48	1,56	5,99
06	25,63	24,48	1,15	4,49
07	29,05	29,28	-0,23	-0,79
08	30,30	29,28	1,02	3,37
09	25,73	26,88	-1,15	-4,47
10	26,26	26,88	-0,62	-2,36
11	26,29	26,88	-0,59	-2,24

Y: valor experimental,  $\hat{Y}$ : valor previsto pelo modelo

**Tabela D.14** – Valores experimentais de hemicelulose solubilizada ( $H_S\%$ ) na fração sólida de bagaço pré-tratado, previstas pelo modelo, erros de ajuste e erros relativos.

Ensaio	$H_S\%$ , experimental	$H_S\%$ , prevista	$e = (Y - \hat{Y})$	Erro relativo (%)
01	46,70	56,44	-9,74	-20,86
02	42,77	56,44	-13,67	-31,96
03	93,25	98,38	-5,13	-5,50
04	94,95	98,38	-3,43	-3,61
05	60,54	56,44	4,10	6,77
06	64,52	56,44	8,08	12,52
07	96,46	98,38	-1,92	-1,99
08	97,63	98,38	-0,75	-0,77
09	85,71	77,41	8,30	9,68
10	85,41	77,41	8,00	9,37
11	83,53	77,41	6,12	7,33

Y: valor experimental,  $\hat{Y}$ : valor previsto pelo modelo

---

# *APÊNDICE E*

*Produção de enzimas*

---

**Tabela E.1** – Concentrações de substrato (lactose) e de células, determinadas durante o processo de fermentação para produção de enzimas celulase e xilanase.

Tempo (h)	Lactose (g/L)	Concentração celular (g/L)
0	10,89	1,18
9	9,67	1,85
24	2,45	8,43
33	0,02	8,38
48	0,00	7,19

**Tabela E.2** – Atividades enzimáticas e seus respectivos desvios padrões referentes à produção em biorreator.

Tempo (h)	Atividades Enzimáticas (UI/mL)			
	FPase	$\beta$ -glicosidase	CMCase	Xilanase
0	0,03 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	1,57 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,12
9	0,06 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,43 $\pm$ 0,00	3,31 $\pm$ 0,06
24	0,85 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,00	9,31 $\pm$ 0,04	8,41 $\pm$ 0,06
33	0,96 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,00	10,74 $\pm$ 0,05	9,28 $\pm$ 0,00
48	0,98 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,01	12,70 $\pm$ 0,07	13,00 $\pm$ 0,02

---

# ***APÊNDICE F***

## ***Hidrólise enzimática***

---

*Estudos da cinética enzimática (minirreatores)*

*(Bagaços pré-tratados – planejamento experimental)*

**Tabela F.1** - Concentrações de celobiose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Celobiose (g/L)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,66	0,31	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,70	0,17	0,17	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	1,85	2,09	2,11	1,74	1,47	1,09	0,55	0,34
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	3,59	3,98	5,60	3,52	2,60	2,08	1,48	0,81
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,92	0,24	0,09	0,03	0,07	0,00	0,00	0,00
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,80	0,37	0,24	0,11	0,08	0,03	0,00	0,00
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	1,70	3,09	3,27	2,94	3,06	2,14	1,35	0,90
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	2,57	3,11	3,03	3,09	2,88	2,01	1,22	0,75
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	2,28	1,97	1,77	1,17	1,07	0,72	0,45	0,53
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	1,40	1,32	1,32	1,64	0,90	0,63	0,46	0,22
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	1,91	2,29	2,25	1,09	1,00	0,63	0,42	0,35

**Tabela F.2** - Concentrações de glicose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Glicose (g/L)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	1,55	2,81	3,14	3,00	4,76	5,34	5,45	5,53
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	1,47	3,15	3,48	5,16	5,91	5,82	6,24	6,06
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	1,45	4,33	6,64	10,65	12,59	14,81	15,71	16,66
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	1,22	5,28	9,41	12,37	13,52	16,10	19,48	16,63
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	1,53	2,39	4,11	4,08	6,69	6,54	8,59	9,78
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	1,24	3,45	4,04	5,69	6,58	7,41	8,05	8,78
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,84	4,29	6,68	11,44	15,82	16,83	18,89	20,19
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	1,52	4,34	6,68	12,32	15,53	17,06	19,30	19,95
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	2,03	4,62	6,25	8,66	11,19	12,59	13,54	16,11
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	1,19	3,47	4,88	9,98	9,30	10,80	12,78	11,62
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	1,45	4,33	6,37	6,89	10,42	11,25	12,55	12,02

**Tabela F.3** - Concentrações de xilose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Xilose (g/L)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,69	0,84	1,01	1,03	1,55	1,75	1,86	2,11
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,59	0,97	0,99	1,52	1,73	1,72	2,09	2,40
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,31	0,44	0,55	0,72	0,84	0,98	1,04	1,11
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,23	0,44	0,60	0,66	0,70	0,82	0,99	0,81
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,49	0,56	0,88	0,90	1,47	1,48	1,94	2,25
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,37	0,70	0,79	1,09	1,27	1,45	1,62	1,85
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,01	0,30	0,39	0,47	0,59	0,68	0,75	0,80
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,22	0,39	0,30	0,37	0,45	0,48	0,53	0,55
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,61	0,64	0,76	0,93	1,17	1,29	1,38	1,65
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,25	0,45	0,58	1,07	0,96	1,10	1,30	1,18
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,31	0,60	0,80	0,76	1,10	1,17	1,36	1,47

**Tabela F.4** - Massas de glicose obtidas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Glicose (g)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,12	0,22	0,24	0,22	0,35	0,38	0,37	0,39
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,12	0,24	0,26	0,39	0,43	0,42	0,43	0,38
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,11	0,34	0,51	0,79	0,92	1,06	1,08	1,01
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,10	0,41	0,72	0,84	0,92	0,99	1,34	1,24
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,12	0,19	0,31	0,30	0,49	0,47	0,59	0,63
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,10	0,27	0,31	0,42	0,48	0,53	0,55	0,53
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,07	0,33	0,51	0,85	1,16	1,20	1,30	1,28
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,12	0,34	0,51	0,92	1,14	1,22	1,32	1,27
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,16	0,36	0,48	0,65	0,82	0,90	0,93	0,95
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,09	0,27	0,37	0,74	0,68	0,77	0,88	0,73
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,11	0,34	0,48	0,51	0,76	0,81	0,86	0,76

**Tabela F.5-** Conversão de celulose em glicose obtida por hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Variáveis			Conversão (%)							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	11,55	20,54	22,52	21,03	32,75	35,97	35,20	34,13
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	11,63	24,46	26,48	38,52	43,22	41,67	42,84	39,77
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	8,28	24,33	36,55	57,47	66,56	76,70	77,96	79,05
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	6,46	27,41	47,91	61,76	66,12	77,12	89,40	72,97
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	10,50	16,14	27,15	26,43	42,48	40,68	51,17	55,76
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	8,13	22,20	25,54	35,19	39,91	44,02	45,80	47,80
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	4,08	20,50	31,33	52,61	71,28	74,25	79,86	81,61
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	8,17	22,94	34,64	62,60	77,32	83,18	90,19	89,15
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	12,30	27,39	36,33	49,37	62,53	68,89	70,98	80,76
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	7,92	22,59	31,15	62,44	57,00	64,84	73,57	63,92
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	9,24	27,14	39,16	41,49	61,53	65,04	69,52	63,67

**Tabela F.6-** Rendimento mássico de glicose obtido por hidrólise enzimática (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188), partindo de 500 gramas de bagaço *in natura* submetido à pré-tratamento de acordo com as condições do planejamento experimental.

Ensaio	Variáveis			g <sub>glicose</sub> /0,5 kg bagaço <i>in natura</i>							
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	0,5h	4h	8h	24h	34h	48h	72h	100h
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	21,44	38,13	41,81	39,05	60,81	66,79	65,35	63,36
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	24,34	51,20	55,42	80,62	90,46	87,21	89,66	83,22
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	15,40	45,27	68,00	106,92	123,83	142,68	145,03	147,05
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	11,81	50,13	87,62	112,95	120,92	141,05	163,50	133,46
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	20,45	31,45	52,88	51,48	82,75	79,24	99,68	108,62
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	15,66	42,74	49,16	67,75	76,82	84,74	88,17	92,01
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	7,19	36,19	55,31	92,86	125,83	131,07	140,98	144,06
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	13,84	38,86	58,68	106,04	130,98	140,91	152,79	151,02
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	19,90	44,32	58,80	79,89	101,19	111,49	114,87	130,69
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	13,54	38,64	53,28	106,80	97,50	110,91	125,84	109,34
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	16,95	49,79	71,85	76,14	112,91	119,34	127,56	116,83

*Bagaços pré-tratados–hidrotermicamente e com ácido mais concentrado)***Tabela F.7** - Concentrações de celbiose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Celbiose (g/L)			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	0,47	0,12	0,00
B	8	195	0,0	0,00	1,14	0,58	0,46
C	8	186	1,0	0,00	2,37	1,53	0,94
D	8	195	1,0	0,00	2,32	1,41	1,00

**Tabela F.8** - Concentrações de glicose identificadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Glicose (g/L)			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	7,50	8,73	9,44
B	8	195	0,0	0,00	9,60	10,27	12,58
C	8	186	1,0	0,00	9,58	11,89	12,36
D	8	195	1,0	0,00	9,66	12,04	14,01

**Tabela F.9** - Concentrações de xilose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Xilose (g/L)			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	0,41	0,51	0,55
B	8	195	0,0	0,00	0,30	0,36	0,45
C	8	186	1,0	0,00	0,01	0,03	0,04
D	8	195	1,0	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabela F.10** - Massas de glicose obtidas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188).

Ensaio	Condição de pré-tratamento			Glicose (g)			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	0,74	0,86	0,92
B	8	195	0,0	0,00	0,95	1,01	1,22
C	8	186	1,0	0,00	0,95	1,17	1,20
D	8	195	1,0	0,00	0,96	1,18	1,36

**Tabela F.11** - Rendimento mássico de glicose obtido por hidrólise enzimática (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188), partindo de 500 gramas de bagaço *in natura* submetido à pré-tratamento.

Ensaio	Condição de pré-tratamento			g <sub>glicose</sub> /0,5 kg bagaço <i>in natura</i>			
	Tempo (min)	T (°C)	[H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ] (m/v)	0 h	24 h	48 h	72 h
A	8	186	0,0	0,00	119,74	137,92	147,69
B	8	195	0,0	0,00	111,05	117,58	142,64
C	8	186	1,0	0,00	113,77	139,81	143,85
D	8	195	1,0	0,00	84,55	104,28	120,16

**Comparação de hidrólise enzimática realizada com enzimas comerciais e com as enzimas produzidas no laboratório**

*(Hidrólise realizada em frascos agitados)*

**Tabela F.12** - Massas de glicose obtidas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas comerciais (Celluclast® 1,5L e Novozym® 188) e enzimas produzidas no laboratório.

Ensaio	Variáveis			Glicose (g)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Enzimas comerciais	Enzimas produzidas no laboratório
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	0,12	0,11
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	0,15	0,19
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	0,66	0,72
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	0,74	0,83
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	0,28	0,26
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	0,31	0,27
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	0,87	0,85
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	0,79	0,82
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,47	0,55
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,44	0,51
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	0,49	0,47

**Tabela F.13** – Conversão enzimática de celulose em glicose (CC%) obtida por hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Hidrólise realizada utilizando-se diferentes preparados enzimáticos.

Ensaio	Variáveis			CC (%)	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Enzima comerciais	Enzimas produzidas no laboratório
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	10,83	11,39
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	14,10	19,86
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	52,10	53,27
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	48,30	54,69
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	24,43	23,38
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	27,84	23,99
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	56,38	57,97
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	56,31	57,86
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	38,32	41,83
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	36,52	40,31
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	37,66	39,15

**Tabela F.14** - Rendimento mássico de glicose obtido por hidrólise enzimática partindo de 500 gramas de bagaço *in natura* submetido à pré-tratamento de acordo com as condições do planejamento experimental.

Ensaio	Variáveis			$\frac{\text{g}_{\text{glicose}}}{0,5 \text{ kg bagaço } in \text{ natura}}$	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Enzima comerciais	Enzimas produzidas no laboratório
01	-1(8)	-1(144)	-1(0,05)	20,11	21,15
02	+1(24)	-1(144)	-1(0,05)	29,51	41,56
03	-1(8)	+1(186)	-1(0,05)	96,96	99,10
04	+1(24)	+1(186)	-1(0,05)	88,33	100,02
05	-1(8)	-1(144)	+1(0,20)	47,58	45,54
06	+1(24)	-1(144)	+1(0,20)	53,59	46,18
07	-1(8)	+1(186)	+1(0,20)	99,52	102,33
08	+1(24)	+1(186)	+1(0,20)	95,39	98,01
09	0(16)	0(165)	0(0,13)	62,01	67,70
10	0(16)	0(165)	0(0,13)	62,46	68,95
11	0(16)	0(165)	0(0,13)	69,10	71,84

*(Hidrólise realizada em minirreatores)*

**Tabela F.15** - Concentrações dos componentes: celobiose, glicose e xilose liberadas durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se as enzimas produzidas no laboratório.

Tempo (h)	Ensaio 03: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05%			Ensaio 07: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,20%		
	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	1,47	9,39	0,69	2,28	8,96	0,44
48	0,97	12,13	0,88	1,45	11,90	0,58
72	0,65	13,25	0,94	1,00	13,02	0,62

**Tabela F.16** - Massas de glicose obtidas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.

Tempo (h)	Glicose (g)	
	Ensaio 03: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05%	Ensaio 07: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,20%
0	0,00	0,00
24	0,92	0,88
48	1,16	1,14
72	1,25	1,22

**Tabela F.17** - Conversão de celulose em glicose obtida por hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.

Tempo (h)	Conversão (%)	
	Ensaio 03: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05%	Ensaio 07: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,20%
0	0,00	0,00
24	61,18	57,89
48	77,44	75,37
72	82,84	80,71

**Tabela F.18** – Massa de glicose obtida por hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado utilizando-se enzimas produzidas no laboratório.

Tempo (h)	g <sub>glicose</sub> /0,5 kg bagaço <i>in natura</i>	
	Ensaio 03: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,05%	Ensaio 07: 8 min, 186 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,20%
0	0,00	0,00
24	113,82	102,19
48	144,06	133,05
72	154,11	142,48

### *Hidrólise realizada em biorreator*

**Tabela F.19** - Componentes liberados durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Condições de pré-tratamento (8 minutos, 186 °C e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

Tempo (h)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
0,5	1,31 ± 0,06	0,60 ± 0,00	0,11 ± 0,00
4	2,09 ± 0,04	2,79 ± 0,01	0,18 ± 0,01
8	2,09 ± 0,03	4,22 ± 0,12	0,24 ± 0,00
12	1,99 ± 0,09	5,23 ± 0,05	0,27 ± 0,00
24	1,42 ± 0,02	7,39 ± 0,55	0,38 ± 0,01
36	0,93 ± 0,10	8,42 ± 0,04	0,42 ± 0,02
48	0,63 ± 0,01	8,65 ± 0,49	0,42 ± 0,01
60	0,50 ± 0,00	9,25 ± 0,82	0,44 ± 0,02
72	0,41 ± 0,00	9,21 ± 0,43	0,44 ± 0,01

**Tabela F.20** - Conversão de celulose em glicose (biorreator) de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Condições de pré-tratamento (8 minutos, 186 °C e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%).

Tempo (h)	Conversão (%)
0	0,00 ± 0,00
0,5	4,68 ± 0,10
4	21,52 ± 0,45
8	32,48 ± 1,46
12	40,10 ± 1,04
24	56,50 ± 5,10
36	64,03 ± 0,67
48	65,62 ± 4,74
60	69,88 ± 7,27
72	69,31 ± 4,34

**Tabela F.21** - Rendimento mássico de glicose obtido por hidrólise enzimática partindo de 500 gramas de bagaço *in natura*, após pré-tratamento. Condições de pré-tratamento (8 minutos, 186 °C e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,20%, m/v).

Tempo (h)	g <sub>glicose</sub> /0,5 kg bagaço <i>in natura</i>
0	0,00 ± 0,00
0,5	8,26 ± 0,17
4	38,00 ± 0,80
8	57,33 ± 2,58
12	99,73 ± 9,00
24	113,03 ± 1,18
36	108,76 ± 7,23
48	115,83 ± 8,37
60	123,36 ± 12,83
72	122,35 ± 7,66

---

# *APÊNDICE G*

## *Fermentação alcoólica*

---

**Tabela G.1** – Concentrações de glicose e etanol durante o processo de fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático obtido em biorreator.

Tempo (h)	Concentração (g/L)	
	Glicose	Etanol
0	$8,87 \pm 0,51$	$0,00 \pm 0,00$
2	$6,17 \pm 0,48$	$0,58 \pm 0,23$
3	$4,07 \pm 0,33$	$1,46 \pm 0,39$
4	$1,20 \pm 1,04$	$2,41 \pm 0,72$
6	$0,01 \pm 0,01$	$2,82 \pm 0,47$
8	$0,00 \pm 0,00$	$2,93 \pm 0,32$
9	$0,00 \pm 0,00$	$3,05 \pm 0,18$
10	$0,00 \pm 0,00$	$3,10 \pm 0,16$
11	$0,00 \pm 0,00$	$3,21 \pm 0,16$
12	$0,00 \pm 0,00$	$3,33 \pm 0,18$

---

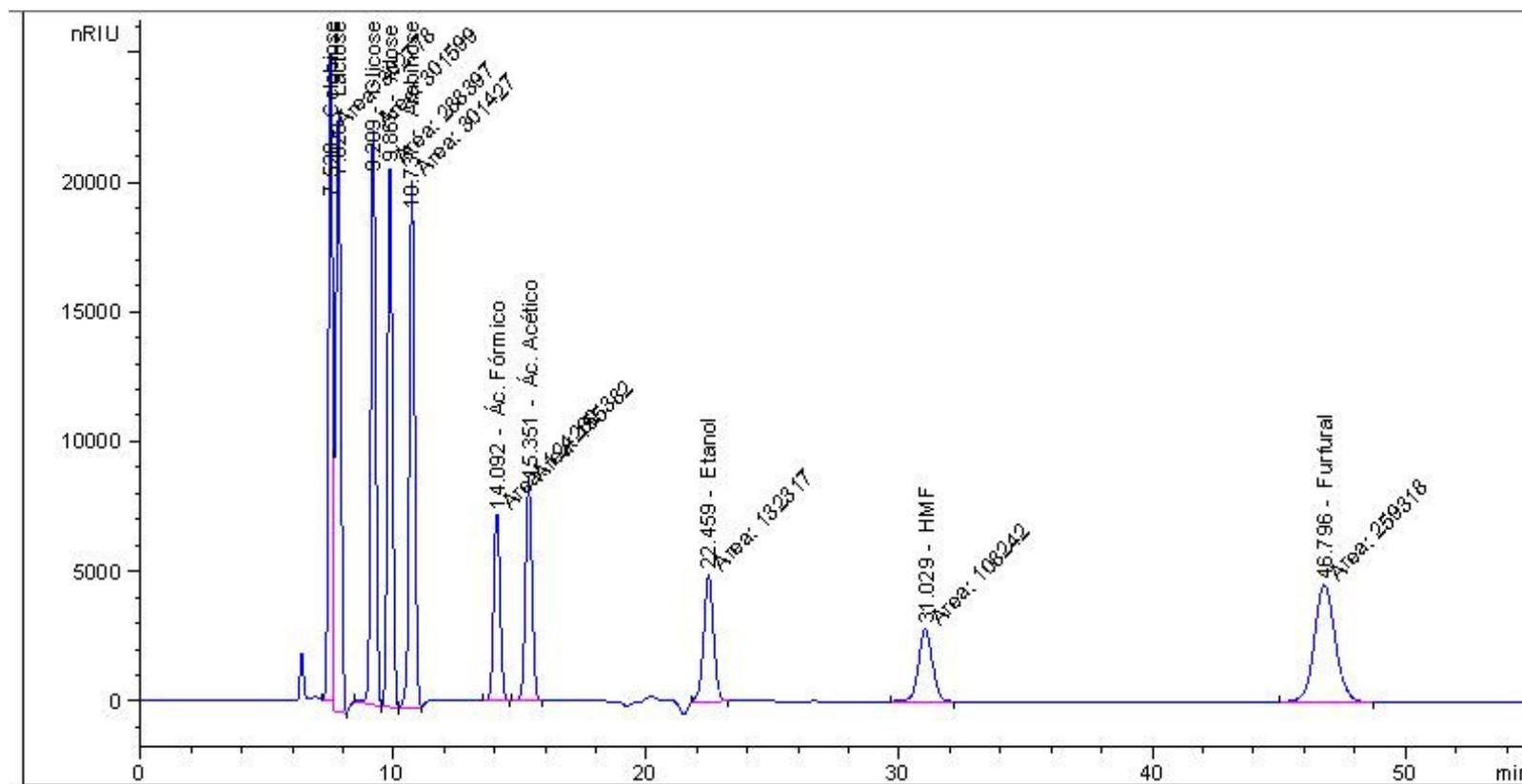
---

# *APÊNDICE H*

*Cromatograma–curva  
padrão*

---

---



**Figura H.1** – Cromatograma ilustrativo (curva padrão).

---

---

# *APÊNDICE I*

*Artigo publicado*

---

---

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

# Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

## Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery

Solange Maria de Vasconcelos<sup>a,b</sup>, Andreлина Maria Pinheiro Santos<sup>b</sup>, George Jackson Moraes Rocha<sup>c</sup>, Ana Maria Souto-Maior<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biotechnological Processes, Federal University of Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, 50740-521 Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), P.O. Box 6170, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

### HIGHLIGHTS

- ▶ Diluted phosphoric acid was employed as catalyst in sugarcane bagasse pretreatment.
- ▶ Factorial design showed the effects of temperature, time and acid concentration.
- ▶ Very effective hemicellulose solubilization was achieved at 186 °C, reaching 98%.
- ▶ Relatively low amounts of fermentation inhibitors were released in the hydrolysate.
- ▶ Phosphoric acid in the hydrolysate can be a P-source for subsequent fermentation.

### ARTICLE INFO

Article history:  
Available online xxx

Keywords:  
Pretreatment  
Sugarcane bagasse  
Enzymatic hydrolysis  
Fermentable sugars

### ABSTRACT

The influence of time (8–24 min), temperature (144–186 °C) and phosphoric acid concentration (0.05–0.20%, w/v) on the pretreatment of sugarcane bagasse in a 20 L batch rotary reactor was investigated. The efficiency of the pretreatment was verified by chemical characterization of the solid fraction of the pretreated bagasse and the conversion of cellulose to glucose by enzymatic hydrolysis. Models representing the percentage of cellulose, hemicelluloses, lignin, solubilized hemicellulose and the enzymatic conversion of cellulose to glucose were predictive and significant. Phosphoric acid concentration of 0.20% at temperature of 186 °C, during 8 and 24 min, was shown to be very effective in solubilizing hemicellulose from sugarcane bagasse, reaching solubilization of 96% and 98%, respectively. Relatively low amounts of inhibitors were produced, and the phosphoric acid remaining in the hemicellulosic hydrolysate is at adequate levels for supplying phosphorous requirement during subsequent fermentation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Social and environmental concerns, such as the world's dependence on nonrenewable fuels derived of petroleum, use of food for fuel production and the reduction the negative impacts to the environment, particularly due to the emission of greenhouse gasses, are the driving forces that propel the use of renewable raw materials for the production of alternative energy. For these reasons, the concept of biorefinery is emerging as a promising alternative because it is based on the integration of processes for the production of energy, fuel – especially second generation ethanol – and a wide variety of high value-added chemical products from the full use of renewable biomass (Ragauskas et al., 2006).

In this way, Brazil is in a privileged position to assume the leadership in the full use of biomass because it is one of the largest producers of renewable raw materials in the world (CGEE, 2010). Sugarcane plantations are a notable source of these materials, of which Brazil itself represents the largest producer in the world, reaching a production capacity exceeding 623 million tons in the 2010/2011 harvest (MAPA, 2011). However, only sucrose, which corresponds to one-third of the sugarcane biomass, is used to produce sugar and ethanol. The remaining two-thirds represent the bagasse, by-product obtained after crushing the sugarcane for stripping the juice to be used for sugar and/or ethanol production, and the leaves and tips, which constitute sugarcane straw (BNDES, 2008; DEAGRO, 2011). Approximately 250 kg of bagasse are generated per ton of sugarcane, thus representing the main lignocellulosic material generated in Brazil. The bagasse is largely used as the main source of energy for the production of steam used in the mill, and electricity (CGEE, 2010; Pandey et al., 2000; Stambuk

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 21268347; fax: +55 81 21268346.  
E-mail address: [soutomaior@ufpe.br](mailto:soutomaior@ufpe.br) (A.M. Souto-Maior).

et al., 2008). However, if technological improvements are made to the boilers it is possible to satisfy the energy requirements of the plants with only half of the produced bagasse. If residual bagasse from the sugar mills in Brazil were converted to ethanol, then the amount of ethanol produced per unit area of sugarcane crop land in Brazil would improve significantly.

Lignocellulosic materials consist of three main organic fractions: cellulose (35–50%), hemicellulose (20–35%) and lignin (12–20%). They also contain small amounts of minerals (ash) and various other compounds, which are called extractives. The cellulose chains are packed by hydrogen bonds in so-called 'microfibrils', which are attached to each other by hemicellulose, and covered by lignin. These microfibrils are often associated in the form of macrofibrils. Because of this complexity, pretreatment of these lignocellulosic materials is normally necessary before enzymatic hydrolysis (Himmel, 2008).

Pretreatment is mainly aimed at disorganizing the complex lignocellulose by reducing the lignin and hemicellulose content, reducing the cellulose crystallinity, and increasing the porosity, causing the opening of the lignocellulose cell wall structure for enzymatic degradation (Hendriks and Zeeman, 2009). The pretreatment can be accomplished by appropriate physical, physico-chemical, chemical or biological means (Alvira et al., 2010; Mosier et al., 2005). Dilute acid hydrolysis is one of the most commonly used method of chemical pretreatment, which main objective is to solubilize the hemicellulosic fraction of the biomass and to render the cellulose more accessible for enzymatic hydrolysis. It can be performed during a short retention time at a high temperature (above 160 °C) or over a relatively long retention time at a lower temperature. In general, pretreatments performed at higher temperatures and shorter residence times generate higher recovery yields of soluble xylose and improved enzymatic cellulose digestibility. Depending on the substrate and the conditions applied, 80–95% of the hemicellulosic sugars can be recovered from the lignocellulosic feedstock by dilute acid pretreatment (Balat et al., 2008).

Diluted phosphoric acid for chemical pretreatment of different biomasses have been investigated (Gámez et al., 2006, 2004; Israilides et al., 1978; Um et al., 2003; Vázquez et al., 2007). These studies have shown that treatments performed at low temperatures and long residence times can be effective using relatively high concentration solutions of phosphoric acid (2–6%). However, phosphoric acid is much more expensive than sulfuric acid, which is the cheapest and most widely investigated acid catalyst. Recently, steam treatment of sugarcane bagasse with more diluted phosphoric acid was investigated at shorter residence times and higher temperatures, and shown to be an effective method to hydrolyse hemicelluloses (Geddes et al., 2010). Phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse allowed efficient fermentation of hemicellulose hydrolysate by engineered *Escherichia coli* without the need of detoxification (Nieves et al., 2011).

In this work, dilute phosphoric acid pretreatment of sugarcane bagasse was investigated using concentration levels adequate for the subsequent microbial fermentation of the hemicellulose hydrolysate for fuel, chemical or enzyme production. An experimental design was applied to assess the effects of temperature, time and phosphoric acid concentration on the pretreatment in a 20 L batch rotary reactor.

## 2. Methods

### 2.1. Raw material

The sugarcane bagasse used in this study was provided by Olho D'Água sugar plant ([www.grupoolhodagua.com.br/BACKUP/site/](http://www.grupoolhodagua.com.br/BACKUP/site/)

[index.php](#)). The bagasse was collected straight from the mill and left to dry at sunlight for two days.

### 2.2. Pretreatment

#### 2.2.1. Experimental design

A linear experimental design  $2^3$  with 3 central points and a total of 11 assays was applied to evaluate the best conditions for pretreatment. Three levels were defined for each independent variable (time: 8, 16 and 24 min; temperature: 144, 165 and 186 °C; and phosphoric concentration: 0.05, 0.13 and 0.20%, w/v). The following response factors were considered: the percentages in the solid fraction of cellulose (%C), hemicellulose (%H) and lignin (%L); the solubilized hemicellulose (%H<sub>S</sub>); and the enzymatic conversion of cellulose (%CC).

The software Statistica (Statsoft 7.0) was used to analyze the results, which were subjected to an analysis of variance (ANOVA). The independent variables and responses (coded values) were correlated through the linear model represented by Eq. 1 in which  $y_i$  represents the response variable;  $\beta_0$ ,  $\beta_j$ , and  $\beta_{ij}$  are the coefficients of the regression model; and  $X_i$  and  $X_j$  represent the coded levels of the independent variables.

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_j X_j + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

#### 2.2.2. Experimental procedure

Bagasse samples of 500 g each were introduced into a 20 L rotary reactor (Regmed Indústria Técnica Ltda., model AU/E-20) with phosphoric acid solutions at different concentrations, according to the experimental design. The concentration of bagasse in the reactor was maintained at 5% (w/v). The reactor temperature was increased by an electrical resistance heating system, and the counted time was initialized when the process reached the desired temperature. After finishing the reaction, the temperature was reduced to 80 °C, and the reactor was discharged. The pretreated sugarcane bagasse was filtered, and the pulp obtained (solid fraction) was washed three times (10 L per wash) with hot water (70 °C). The solid fractions obtained were separated for chemical and morphological characterization and enzymatic hydrolysis. The liquid fractions were submitted to chromatographic analysis to determine the concentration of fermentation inhibitors.

### 2.3. Enzymatic hydrolysis

The effects of the pretreatment conditions on cellulose conversion were evaluated by enzymatic hydrolysis of the solid fractions obtained in each pretreatment. For the enzymatic hydrolysis, the commercial enzymes Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L and Novozym<sup>®</sup> 188 ( $\beta$ -glucosidase) were used. The assays were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks to which the bagasse and the enzyme diluted in 50 mM sodium citrate (pH 4.8) were added. The conditions were as follows: activity of 20 FPU g<sup>-1</sup> bagasse and 4 IU g<sup>-1</sup> bagasse of  $\beta$ -glucosidase, maintaining a final ratio of 5:1 (Celluclast: $\beta$ -glucosidase); 50 °C and 150 rpm in a shaker (New Brunswick Scientific, model C25KC); a final volume of 100 mL, and a 2.0% (w/v) final concentration of bagasse. The sample (1 mL) was taken after 72 h of hydrolysis, subjected to a boiling bath for 5 min, immersed in an ice bath, and then centrifuged and filtered through a 0.22  $\mu$ m membrane.

### 2.4. Analytical methodology

#### 2.4.1. Analysis of chemical composition

The raw and pretreated bagasse samples were analyzed according to the methodology described by Rocha et al. (2011). The methodology is based on acid hydrolysis of extractive-free material

followed by chromatographic analysis of sugars and degradation products contained in the hydrolysate and by the gravimetric determination of acid-insoluble lignin. All samples were milled and sieved to 20 mesh. Raw bagasse extractives were removed using 95% ethanol for 8 h in a Soxhlet apparatus. For the pretreated bagasse, no ethanol extraction was performed since the pretreatment practically remove all the extractives. A 2-g aliquot of the material was treated with 10 mL of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in a 100-mL beaker maintained in a thermostatic bath at 45 °C for 8 min under mixing. The reaction was interrupted through the addition of 50 mL of distilled water. The sample was transferred to a 500-mL Erlenmeyer flask, where the acid was diluted by water addition up to a final volume of 275 mL. The flasks were sealed with aluminum foil and autoclaved for 30 min at 1.05 atm for completing the hydrolysis of the unhydrolysed oligosaccharides. After elapsing the reaction time and depressurization, the flask was removed from the autoclave and cooled to room temperature. The mixture was filtered using a paper filter (J. Prolab, 18.5 cm diameter, ash 0.00021 g) previously weighed. The hydrolysate was collected in a 500-mL volumetric flask and the solid residue was washed with 50-mL portions of distilled water until reaching the flask volume. The solid (lignin and ash) retained in the paper filter was washed with 1500 mL of distilled water to remove sulfate anions, and dried at 105 °C until constant weight. The dry residue was quantitatively transferred to a previously weighed porcelain crucible and the sample was calcined to 300 °C for approximately 1 h and then at 800 °C for 2 h. After cooling the crucible in a desiccator, the mass of the ashes present in acid-insoluble lignin was quantified in an analytical balance.

Soluble lignin in acid hydrolysate was determined by UV-spectroscopy in a 5-mL aliquot of the hydrolysate, which was adjusted to pH 12 with 6 M NaOH and 20-fold diluted. The absorbance was read at 280 nm (Hewlett–Packard, model 8453). The concentration of lignin was determined by a calibration curve obtained from lignin isolated from bagasse.

The sugars and degradation products were analyzed by HPLC (Agilent Technologies 1100), employing the following conditions: an HPX 87H (BIO-RAD) column at 60 °C, 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mobile phase at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>, and a refractive index detector (RID) (Martín et al., 2007; Sluiter et al., 2008a). The quantification was performed with calibration curves for each analyzed component, using a solution containing cellobiose, glucose, xylose, arabinose, formic acid, acetic acid, hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. Stoichiometric factors were used to convert these components to their precursor polymers: cellulose and hemicellulose (Rocha, 2000; Sluiter et al., 2008b).

#### 2.4.2. Calculation of solubilization

The yields of the solid fraction obtained in the pretreatment, which were determined gravimetrically in relation to the dry weight of the bagasse initially submitted to the process, were calculated according to Eq. (2).

$$Y = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

where  $Y$  = yield of solid fraction (%),  $M_f$  = weight (g) of bagasse after pretreatment (dry basis),  $M_i$  = weight (g) of bagasse before pretreatment (dry basis).

To calculate the solubility of the macromolecular component, hemicellulose, in the solid fraction determined by Eq. 3.

$$\%H_s = 100 - \left( \frac{H_f \cdot Y}{H_i} \right) \quad (3)$$

where  $\%H_s$  = hemicelluloses solubilization (%),  $H_i$  = hemicelluloses content in the raw sugarcane bagasse (%),  $H_f$  = hemicellulose in the sugarcane bagasse after pretreatment (%).

#### 2.4.3. Morphological analysis

Morphological analysis of the raw and pretreated sugarcane bagasse was performed using scanning electron microscopy (SEM). The samples were fixed with carbon tape and coated with a gold film of controlled thickness in an argon atmosphere for 60 s.

The micrographs were obtained on a JSM instrument (model 5900 LV) with a voltage of 10 kV under different magnifications.

#### 2.4.4. Enzyme activity

The enzyme activities (filter paper and  $\beta$ -glucosidase) were determined according to methodology proposed by Ghose (1987).

#### 2.4.5. Enzymatic conversion

The enzymatic conversion of cellulose (%CC) present in the pretreated bagasse samples was determined using Eq. 4.

$$\%CC = \frac{\text{Glucose released (g)}}{1.111 \times \text{Cellulose (g)}} \times 100 \quad (4)$$

where 1.111 is the factor of conversion for cellulose to glucose.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Pretreatment

##### 3.1.1. Sugarcane bagasse composition

Raw sugarcane bagasse contained (wt.%): 40.10  $\pm$  0.93 cellulose, 27.49  $\pm$  0.67 hemicellulose, 18.52  $\pm$  0.76 total lignin, 5.75  $\pm$  0.14 ashes and 5.44  $\pm$  0.14 ethanol extractives. The compositions of the main components (cellulose, hemicellulose and lignin) are in agreement with the previously reported values, whose percentages ranged from 40–48% for cellulose, 19–30% for hemicellulose and 17–21% for lignin (Chen et al., 2012; Guo et al., 2009; Mesa et al., 2011; Rocha et al., 2012, 2011).

The experimental parameters and their respective values applied to the pretreatment of sugarcane bagasse, according to the experimental design, as well as the results for the percentage of cellulose (%C), hemicellulose (%H) and lignin (%L) determined by the chemical characterization, and solubilized hemicellulose (calculated according to Equation 3) are shown in Table 1.

Statistical analysis allows estimation of the main effect by evaluating the difference in the process performance caused by a change from the low (–1) to the high (+1) level of the corresponding factor or independent variable. For this analysis, the software Statistica (Statsoft 7.0) was used to verify the significance of the factors studied at the 0.05 level of significance ( $\alpha = 5\%$ ). The coded models that represent the cellulose (%C), hemicellulose (%H) and lignin (%L) percentages present in the pretreated bagasse and in the solubilized hemicellulose ( $H_s$ ) are shown in Eqs. 5–8, respectively, including only the terms that are statistically significant ( $p < 0.05$ ) under the conditions applied in the present study.

$$\%C = 54.94 + 5.30 X_2 \quad (5)$$

$$\%H = 9.27 - 7.65 X_2 \quad (6)$$

$$\%L = 26.88 + 2.40 X_2 \quad (7)$$

$$\%H_s = 77.41 + 20.97 X_2 \quad (8)$$

An analysis of variance (ANOVA; Table 2) was performed by applying the variables used in the pretreatment to determine whether the models are predictive and significant. The analysis showed that all of the results (Table 2) had correlation coefficients higher than 90%. The calculated  $F$  values for the significance level of 0.05 are higher than the critical  $F$  value ( $F_{0.05; 1; 9} = 5.12$ ) for all of the analyzed responses. Thus, it is concluded that the

**Table 1**  
Chemical composition (w/w) of the solid fraction of the different types of pretreated bagasses and solubilization of hemicellulose.

Assay	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	Ashes (%)	H <sub>5</sub> (%)
1	-1(8)	-1(144)	-1(0.05)	45.64 ± 1.23	20.01 ± 0.92	24.07 ± 0.60	4.72 ± 0.80	46.70
2	+1(24)	-1(144)	-1(0.05)	47.72 ± 2.28	19.93 ± 1.37	23.35 ± 0.17	4.22 ± 0.18	42.77
3	-1(8)	+1(186)	-1(0.05)	60.49 ± 0.87	3.35 ± 0.08	29.33 ± 0.63	7.31 ± 0.54	93.25
4	+1(24)	+1(186)	-1(0.05)	61.24 ± 0.41	2.58 ± 0.17	29.64 ± 0.57	5.26 ± 1.61	94.95
5	-1(8)	-1(144)	+1(0.20)	49.52 ± 0.60	15.32 ± 0.10	26.04 ± 0.13	6.19 ± 0.92	60.54
6	+1(24)	-1(144)	+1(0.20)	53.04 ± 0.48	14.93 ± 0.42	25.63 ± 0.41	4.98 ± 0.58	64.52
7	-1(8)	+1(186)	+1(0.20)	58.52 ± 0.20	1.79 ± 0.06	29.05 ± 0.65	8.05 ± 1.02	96.46
8	+1(24)	+1(186)	+1(0.20)	58.06 ± 1.78	1.24 ± 0.04	30.30 ± 0.45	3.55 ± 0.27	97.63
9	0(16)	0(165)	0(0.13)	57.41 ± 0.04	7.74 ± 0.02	25.73 ± 0.50	4.08 ± 0.45	85.71
10	0(16)	0(165)	0(0.13)	56.67 ± 0.23	7.38 ± 0.12	26.26 ± 0.29	3.27 ± 0.22	85.41
11	0(16)	0(165)	0(0.13)	56.02 ± 0.02	7.68 ± 0.28	26.29 ± 0.69	3.75 ± 0.63	83.53

X<sub>1</sub>: time, X<sub>2</sub>: temperature, X<sub>3</sub>: acid phosphoric concentration, and H<sub>5</sub>: solubilized hemicellulose.

**Table 2**  
ANOVA for responses: percentage of cellulose (%C), percentage of hemicellulose (%H), percentage of lignin (%L) and solubilized hemicellulose (%H<sub>5</sub>).

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	R <sup>2</sup>	p-value
<b>%C</b>						
Regression	224.61	1	224.61	40.18	94.68	0.000134
Residual	50.29	9	5.59			
Total	274.90	10				
<b>%H</b>						
Regression	468.64	1	468.64	112.11	97.71	0.000002
Residual	37.66	9	4.18			
Total	506.30	10				
<b>%L</b>						
Regression	46.22	1	46.22	49.17	94.87	0.000062
Residual	8.48	9	0.94			
Total	54.70	10				
<b>%H<sub>5</sub></b>						
Regression	3517.93	1	3517.93	54.92	94.08	0.000041
Residual	576.51	9	64.06			
Total	4094.44	10				

F<sub>0.05; 1, 9</sub> = 5.12.

first-order models for the cellulose (%C), hemicellulose (%H), recovered lignin (%L) and solubilized hemicellulose (%H<sub>5</sub>) percentages are significant and predictive.

The analysis of the chemical composition of the pretreated sugarcane bagasse (Table 1) showed that the percentage of cellulose and lignin increased for all assays when compared to raw bagasse, while a reduction occurred for hemicellulose. The best results (Table 1) for the percentage of cellulose (%C) present in the solid fraction after pretreatment were obtained in assays 3, 4, 7 and 8, which correspond to higher temperatures employed in the pretreatment (186 °C).

The hemicellulose was reduced in all conditions of pretreatment applied (Table 1), reaching 3.35%, 2.58%, 1.79% and 1.24% in assays 3, 4, 7 and 8, respectively, which correspond to solubilities of 93.25–97.63%, calculated from Eq. 3. The high solubilization demonstrated in this study is indicative of the efficiency of the applied pretreatment since the main aim of treatment with dilute acids is the solubilization of the hemicellulose, which presents an amorphous and branched structure slightly resistant to hydrolysis (Alvira et al., 2010; Taherzadeh and Karimi, 2008).

The pretreatment with 0.20% phosphoric acid at 186 °C and 8 min was compared with other pretreatments of sugarcane bagasse carried out in the same reactor (Table 3). The comparison was performed with the results obtained in two different studies: (i) an acid-catalyzed process with diluted sulfuric acid and acetic acid (Rocha et al., 2011), and (ii) an hydrothermal pretreatment (Silva et al., 2010).

Comparing this work phosphoric acid pretreatment with the hydrothermal pretreatment performed by Silva et al. (2010), it

can be observed that the use of low concentration of phosphoric acid as a catalyst for sugarcane bagasse pretreatment is much more effective in removing hemicellulose, while less removal of cellulose and lignin occurs. With relation to the results obtained with sulphuric and acetic mixed-acid pretreatment (Rocha et al., 2011), the use of phosphoric acid at much lower concentration shows a slightly higher capacity of solubilizing the hemicellulose, with the advantage of being a source of phosphorous for the subsequent fermentation of the hydrolysate. The hemicellulosic hydrolysate might be used for fuel, chemical or enzyme production in a sugarcane-based biorefinery, where, for instance, it could be mixed to sugarcane molasses (a poor P-source) to formulate media with appropriate sugar levels.

### 3.1.2. Composition of the hydrolysates

The results of the composition of fermentation inhibition compounds produced during the pretreatment are shown in Table 4.

Low levels of degradation products in the hydrolysates were achieved for all of the experimental conditions employed (Table 4). However, increases in the concentrations of these products were generally observed when the temperature was elevated to 186 °C (assays 3, 4, 7 and 8). The high concentration of these products are justified by the high solubilization of hemicelluloses at this condition, since furfural and HMF are derived from the dehydration of pentose and hexose, formic acid from HMF decomposition, and acetic acid from hemicellulose deacetylation (Lavarack et al., 2000; Mittal et al., 2009; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Taherzadeh and Karimi, 2007).

**Table 3**

Chemical composition (w/w) of the solid fraction after hydrothermal and diluted acid pretreatment of sugarcane bagasse in 20 L batch reactor.

Component	Assay 7 <sup>a</sup>		Rocha et al. (2011) <sup>b</sup>		Silva et al. (2010) <sup>c</sup>	
	Composition (%)	Solubilization (%)	Composition (%)	Solubilization (%)	Composition (%)	Solubilization (%)
Cellulose	58.52	20.76	61.65	14.60	58.80	23.80
Hemicellulose	1.79	96.46	2.79	93.40	15.10	67.60
Lignin	29.05	14.83	32.96	4.70	24.80	37.70

<sup>a</sup> Pretreatment conditions: phosphoric acid 0.20% w/v, 186 °C, 8 min. Composition of raw bagasse: cellulose, 40.1%; hemicelluloses, 27.5%; lignin, 18.5%.<sup>b</sup> Pretreatment conditions: sulfuric acid 1% w/v, and acetic acid 1% w/v, 190 °C, 10 min. Composition of raw bagasse: cellulose, 45.5%; hemicelluloses, 27%; lignin, 21.1%.<sup>c</sup> Pretreatment conditions: 185 °C, 10 min. Composition of raw bagasse: cellulose, 42.8%; hemicellulose, 25.9%; lignin, 22.1%.**Table 4**

Chemical composition of the hydrolysates obtained during the pretreatment of sugarcane bagasse according to the inhibition products.

Assay	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Concentration (g L <sup>-1</sup> )			
				Formic acid	Acetic acid	HMF	Furfural
1	-1(8)	-1(144)	-1(0.05)	0.01	0.56	0.11	0.06
2	+1(24)	-1(144)	-1(0.05)	0.02	0.66	0.11	0.07
3	-1(8)	+1(186)	-1(0.05)	0.11	1.38	0.19	0.82
4	+1(24)	+1(186)	-1(0.05)	0.11	1.08	0.19	0.95
5	-1(8)	-1(144)	+1(0.20)	0.02	0.91	0.11	0.10
6	+1(24)	-1(144)	+1(0.20)	0.03	1.03	0.11	0.12
7	-1(8)	+1(186)	+1(0.20)	0.04	1.56	0.24	0.61
8	+1(24)	+1(186)	+1(0.20)	0.14	1.26	0.23	0.59
9	0(16)	0(165)	0(0.13)	0.03	1.10	0.05	0.22
10	0(16)	0(165)	0(0.13)	0.03	1.29	0.05	0.24
11	0(16)	0(165)	0(0.13)	0.02	1.18	0.07	0.23

X<sub>1</sub>: time, X<sub>2</sub>: temperature, X<sub>3</sub>: acid phosphoric concentration.

### 3.2. Morphological analysis

When micrographs of pretreated sugarcane bagasse at 186 °C (assays 3, 4, 7 and 8) were compared with the micrograph of raw bagasse, significant changes in the morphology could be observed in the bagasse subjected to pretreatment. The parenchyma cells (cells of flattened format that constitute a layer on the cellulose fibers) were removed when the bagasse passed through the pretreatment process. Also, the fibers were exposed, presenting a set of bundles in a linear shape, and an increase in the surface area could be observed.

However, the morphological differences among the micrographs of the bagasse pretreated under different time and acid concentration (assays 3, 4, 7 and 8) were not as significant as the differences between the treated and untreated fibers. This result confirms the values found in the analysis of chemical compositions (Table 1) in which the percentages of cellulose (%C), hemicellulose (%H) and lignin (%L) showed no significant differences.

### 3.3. Enzymatic hydrolysis

To evaluate the efficiency of the pretreatment, enzymatic hydrolysis was performed using the samples obtained after each pretreatment. Eq. 4 was used to calculate the %CC. The values at the end of 72 h of hydrolysis are presented in Table 5. The highest conversions were obtained for bagasse pretreated under conditions 3, 4, 7 and 8, which correspond to higher temperatures and greater removal of the hemicellulose fraction. These samples reached values close to or greater than 50%, approaching those found in the literature (Geddes et al., 2010; Silva et al., 2010).

Yield of 383 g<sub>glucose</sub> kg<sup>-1</sup> of untreated bagasse was obtained from the enzymatic hydrolysis (50 FPU g<sup>-1</sup><sub>bagasse</sub>) of the sugarcane bagasse pretreated with steam and phosphoric acid at temperature of 180 °C for 10 min (Geddes et al., 2010). In the present study, when 20 FPU g<sup>-1</sup><sub>bagasse</sub> of Celluclast were employed in the enzymatic hydrolysis process of the bagasse pretreated with 0.20% of

**Table 5**

Enzymatic cellulose conversion of pretreated bagasse (%CC).

Assay	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	%CC
1	-1(8)	-1(144)	-1(0.05)	10.83
2	+1(24)	-1(144)	-1(0.05)	14.10
3	-1(8)	+1(186)	-1(0.05)	52.12
4	+1(24)	+1(186)	-1(0.05)	48.30
5	-1(8)	-1(144)	+1(0.20)	24.43
6	+1(24)	-1(144)	+1(0.20)	27.84
7	-1(8)	+1(186)	+1(0.20)	56.38
8	+1(24)	+1(186)	+1(0.20)	56.31
9	0(16)	0(165)	0(0.13)	38.32
10	0(16)	0(165)	0(0.13)	36.52
11	0(16)	0(165)	0(0.13)	37.66

X<sub>1</sub>: time, X<sub>2</sub>: temperature, and X<sub>3</sub>: phosphoric acid concentration.**Table 6**

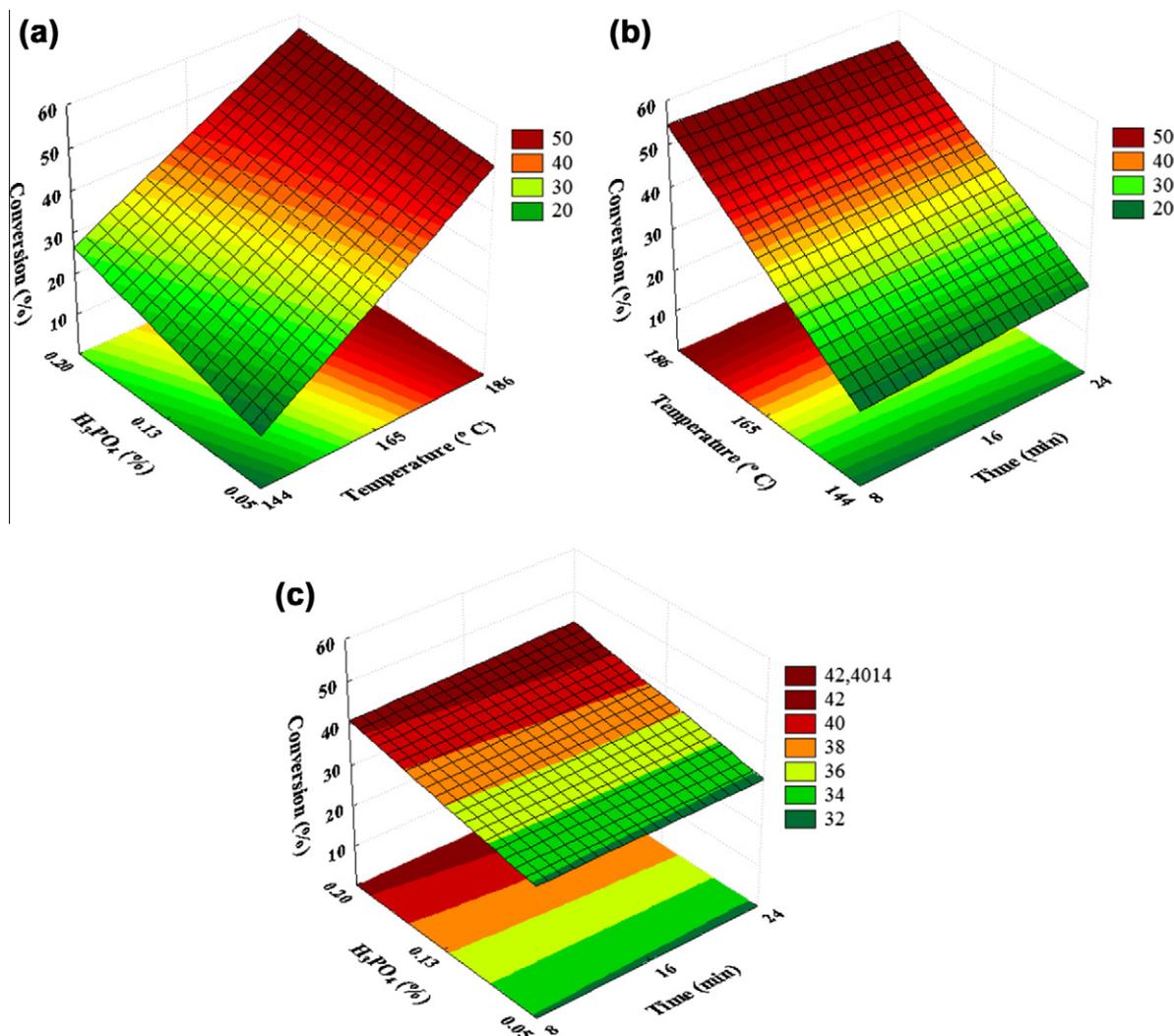
ANOVA for enzymatic conversion of the cellulose (%CC).

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	R <sup>2</sup>	p-value
Regression	2547.03	4	636.76	408.18	99.75	0.0000002
Residual	9.35	6	1.56			
Total	2556.38	10				

F<sub>0.05; 4; 6</sub> = 4.53.

phosphoric acid and 8 min at 186 °C, 367 g<sub>glucose</sub> kg<sup>-1</sup> of pretreated bagasse was obtained, which correspond to a conversion of cellulose to glucose of 56.38% (Table 5).

An analysis of variance (ANOVA; Table 6) was performed to verify whether the model representing %CC of the different samples of pretreated sugarcane bagasse was significant and predictive. The correlation coefficient (R<sup>2</sup>) showed a value close to 100% (99.75%), and the calculated F value was 408.18, higher than the



**Fig. 1.** Response surfaces of the enzymatic conversion of cellulose to glucose as a function of the following: (a) Temperature and phosphoric acid concentration; (b) Temperature and time; and (c) Time and phosphoric acid concentration.

critical  $F$  value ( $F_{0.05; 4; 6} = 4.53$ ), representing a level of significance of 5%. Consequently, the model for the cellulose conversion is considered to be significant and predictive. On the basis of the ANOVA results, it was established a first-order coded model for the %CC, as represented by Eq. 9. This model includes only the statistically significant terms ( $p < 0.05$ ). The model was used to generate a response surface for the analysis of the effects of the independent variables (time, temperature and phosphoric acid concentration) on the conversion of cellulose to glucose. All possible combinations of the three variables were used (Fig. 1).

$$\%CC = 36.62 + 16.99X_2 + 4.95X_3 - 1.32X_1X_2 - 1.88X_2X_3 \quad (9)$$

The response surfaces show that the cellulose conversion (%CC) increases considerably when the temperature is changed from 144 °C (level  $-1$ ) to 186 °C (level  $+1$ ) (Fig. 1a and b). The greatest influence occurs with the combination of the temperature and the phosphoric acid concentration. However, the influence of the acid concentration variable is more significant at low temperatures. This influence can be proven by increasing the concentration of phosphoric acid from 0.05% ( $-1$ ) to 0.20% ( $+1$ ) while maintaining the temperature at 144 °C (assays 1 and 5; Table 5). At these values, the cellulose conversion was slightly more than twice as effec-

tive as the conversion for assay 1. However, when the time and the temperature remained at 8 min and 186 °C, respectively (assays 3 and 7), the increase in the cellulose converted was only 8.1%.

#### 4. Conclusion

High solubilization of hemicellulose can be achieved by phosphoric acid pretreatment of sugarcane bagasse at 186 °C. Acid catalysis with 0.20% phosphoric acid at 186 °C, during 8 and 24 min, is very effective in solubilizing hemicellulose, reaching solubilization of 96% and 98%, respectively. The highest enzymatic conversions of cellulose to glucose were achieved under these conditions of pretreatment. Relatively low amounts of inhibitors are produced, and the phosphoric acid remaining in the hemicellulosic hydrolysate is at adequate levels for supplying the phosphorous requirement for the subsequent fermentation of the hydrolysate for fuel, chemical or enzyme production in a biorefinery-based process.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científ-

ico e Tecnológico (CNPq), for the financial support; to Usina Central Olho D'Água, for the supply of sugarcane bagasse; to Novozymes Latin America, for the supply of enzymes; and to Centro de Nano-ciências e Nanotecnologia César Lattes, for the SEM analyses.

## References

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C., 2008. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 551–573.
- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/organização. BNDES, Rio de Janeiro.
- CGEE, 2010. Química verde no Brasil: 2010–2030. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Brasília, DF.
- Chen, W.-H., Ye, S.-C., Sheen, H.-K., 2012. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Appl. Energy* 93, 237–244.
- Departamento de Agroindústria da Área Industrial do BNDES (DEAGRO), 2011. Available at: <<http://www.bndes.gov.br>> (accessed June 28, 2011).
- Gámez, S., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M., 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J. Food Eng.* 74, 78–88.
- Gámez, S., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M., 2004. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. *J. Agric. Food Chem.* 52 (13), 4172–4177.
- Geddes, C.C., Peterson, J.J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M.T., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2010. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresour. Technol.* 101, 1851–1857.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Guo, G.L., Hsu, D.C., Chen, W.H., Chen, W.H., Hwang, W.S., 2009. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 80–87.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.
- Himmel, M.E. (Ed.), 2008. Biomass Recalcitrance. Deconstructing The Plant Cell Wall for Bioenergy. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Israelides, C.J., Grant, G.A., Han, Y.W., 1978. Sugar level, fermentability, and acceptability of straw treated with different acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1), 43–46.
- Lavarack, B.P., Griffin, G.J., Rodman, D., 2000. Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *Catal. Today* 63, 257–265.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2011. Available at: <<http://www.agricultura.gov.br>> (accessed June 30, 2011).
- Martín, C., Klinke, H.B., Thomsen, A.B., 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 426–432.
- Mesa, L., González, E., Cara, C., González, M., Castro, E., Mussato, S.I., 2011. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Chem. Eng. J.* 168, 1157–1162.
- Mittal, A., Chatterjee, S.G., Scott, G.M., Amidon, T.E., 2009. Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple and aspen wood chips: reaction kinetics and mass transfer. *Chem. Eng. Sci.* 64, 3031–3041.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
- Nieves, I.U., Geddes, C.C., Mullinnix, M.T., Hoffman, R.W., Tong, Z., Castro, E., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2011. Injection of air into the headspace improves fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by *Escherichia coli* MM170. *Bioresour. Technol.* 102, 6959–6965.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25–33.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 74, 69–80.
- Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick Jr., W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T., 2006. The Path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–489.
- Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Oliveira, B.R., Olivares, E.G., Rossel, C.E.V., 2012. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 35, 274–279.
- Rocha, G.J.M., Martín, C., Soares, I.B., Souto-Maior, A.M., Baudel, H.M., Abreu, C.A.M., 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass Bioenergy* 35, 663–670.
- Rocha, G.J.M., 2000. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio, Doctoral Thesis, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Silva, V.F.N., Arruda, P.V., Felipe, M.G.A., Gonçalves, A.R., Rocha, G.J.M., 2010. Fermentation of cellulose hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0815-5>.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008a. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. In: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42623, National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. In: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory.
- Stambuk, B.U., Eleutherio, E.C.A., Florez-Pardo, L.M., Souto-Maior, A.M., Bon, E.P.S., 2008. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research* 67, 918–926.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–1651.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2, 472–499.
- Um, B.H., Karim, M., Henk, L., 2003. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105–108, 115–125.
- Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. *Bioresour. Technol.* 98, 3053–3060.