



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Rodolfo Márcio da Silva Ramos

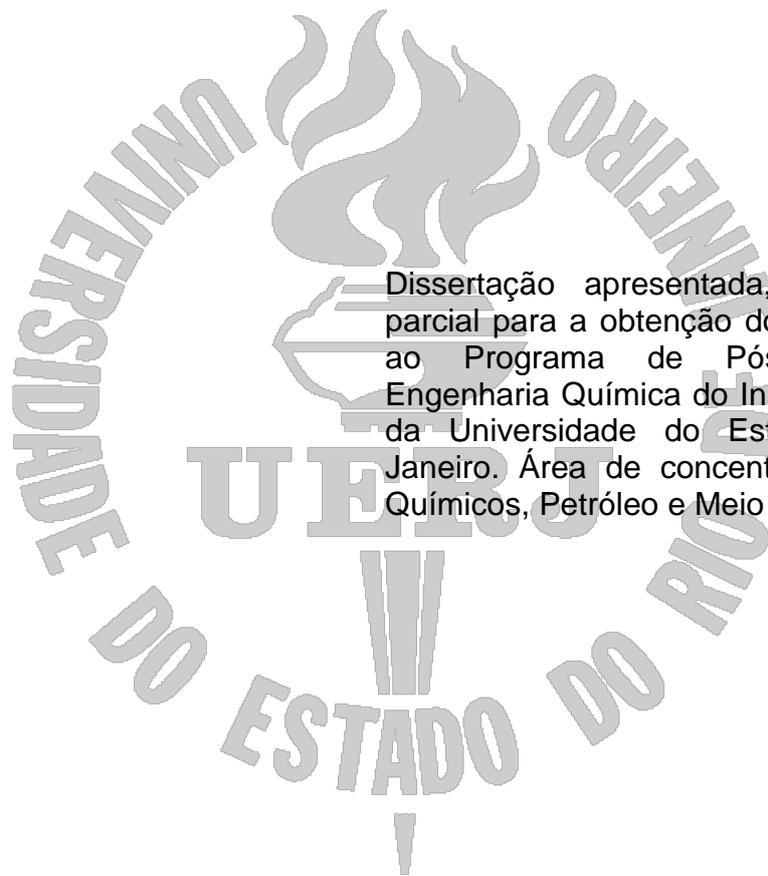
**Produção de açúcares a partir da palha de cana-de-açúcar para a
produção de etanol**

Rio de Janeiro

2013

Rodolfo Márcio da Silva Ramos

Produção de açúcares a partir da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Antunes Pereira Langone

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/IQ

R175 Ramos, Rodolfo Márcio da Silva.

Produção de açúcares a partir da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol / Rodolfo Márcio da Silva Ramos. – 2013.

118 f.

Orientador: Marta Antunes Pereira Langone.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Palha - Utilização - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Glicose - Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. III. Título.

CDU 664.162.6

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rodolfo Márcio da Silva Ramos

Produção de açúcares a partir da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2013.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química – UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Instituto de Química – UERJ

Prof.^a Dra. Mônica Antunes Pereira da Silva
Escola de Química – UFRJ

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio dado em todos estes anos de luta.

À minha noiva Chéslida, pelo apoio, ajuda, paciência, cumplicidade, amizade e amor dados ao longo deste trabalho. Sem ela, não seria possível a realização deste trabalho.

À professora e orientadora Marta Langone, pelo aconselhamento, orientação, confiança e paciência.

Aos meus colegas de trabalho, pela ajuda prestada ao longo deste período.

Ao técnico em química Vinícius, pela grande ajuda na realização das reações realizadas em laboratório.

Aos técnicos de operação das Plantas Piloto do CENPES, pela realização das reações em planta piloto.

RESUMO

RAMOS, Rodolfo Márcio da Silva. *Produção de açúcares a partir da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol*. 2013. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A crescente demanda por tecnologias que produzam biocombustíveis de maneira sustentável vem incentivando a utilização de diversos materiais lignocelulósicos para tal finalidade. O objetivo deste trabalho foi comparar o potencial de produção de açúcares (glicose e xilose) da palha e do bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente, as duas biomassas foram caracterizadas, mostrando percentuais muito similares de celulose e hemicelulose (42,1% e 22,6% para o bagaço e 39,2% e 22,7% para a palha, respectivamente). Isto evidencia potenciais similares de produção de açúcares. Posteriormente, foram realizados experimentos em laboratório para comparar os resultados de rendimento de xilose e produção de furfural após as reações de hidrólise ácida das duas biomassas, com o intuito de verificar se este processo, comumente utilizado para o bagaço, pode ser utilizado para a palha. As variáveis que foram avaliadas foram a concentração de ácido (0,5-3,0%*m/m*), o tempo reacional (15-60min) e a relação sólido-líquido (RSL - 0,1-0,2*m/m*). Concentrações de 42,72g/L e de 41,31g/L de xilose foram encontradas para a palha e para o bagaço, respectivamente, alcançando rendimentos de xilose superiores a 80%, em reações em laboratório. Também foram realizados ensaios de hidrólise ácida em planta piloto e de hidrólise enzimática em laboratório para avaliar os resultados de rendimento de glicose da palha. Os resultados de rendimento de xilose e produção de inibidores para estas reações foram avaliados e comparados com os dados obtidos em laboratório. Concentrações de 35,2g/L de xilose e de 27,3g/L de glicose foram encontradas para a palha, alcançando rendimentos de xilose próximos a 100% e de glicose superiores a 64%, em reações de pré-tratamento em planta piloto e em reações de hidrólise enzimática em laboratório. Os resultados evidenciaram que as variáveis concentração de ácido e relação sólido:líquido são as mais influenciam na produção de xilose e glicose.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar. Hidrólise ácida. Xilose. Glicose.

ABSTRACT

RAMOS, Rodolfo Márcio da Silva. *Sugar production using sugarcane straw for ethanol production*. 2013. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The growing demand for technologies that produce sustainable biofuels encourages the use of various lignocellulosic materials for this purpose. The aim of this study was to compare the potential production of sugars (glucose and xylose) from sugarcane straw and bagasse. First, the biomasses were characterized, showing very similar percentage of cellulose and hemicellulose (42.1% and 22.6% for the bagasse and 39.2% and 22.7% for the straw, respectively). This is a evidence that the potential of sugar production for bagasse and straw are almost the same. Laboratory experiments were carried out to compare the results of xylose yield and production of furfural after acid hydrolysis reactions for both biomasses in order to determine whether this process, commonly used for bagasse, can be used for straw. The variables that were evaluated were acid concentration (0.5 to 3.0 wt.%), reaction time (15-60min) and liquid-solid ratio (RSL - 0.1-0.2 wt.%). Concentrations of 42.72 g/L to 41.31 g/L of xylose were found to straw and bagasse, respectively, reaching xylose yields higher than 80% in laboratory reactions. Also acid hydrolysis reactions in pilot plant and enzymatic hydrolysis reactions in laboratory were carried out to evaluate the results of straw glucose yields. Also the results of xylose yields and production of inhibitors for these reactions were evaluated and compared to the data obtained in the laboratory. Concentrations of 35.2g/L of xylose and 27.3g/L of glucose were found for straw, reaching xylose yields close to 100% and glucose yields up to 64%, in pretreatment reactions in pilot plant and in enzymatic hydrolysis reactions in the laboratory. It was observed that acid concentration and solid: liquid ratio are the variables that most influence in the results of formation of xylose and glucose.

Keywords: Sugarcane straw. Acid hydrolysis. Xylose. Glucose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Diversidade de processos e produtos gerados a partir de fontes renováveis.....	18
Figura 2-	Tendência de crescimento da produção de biocombustíveis no mundo na última década (2001-2011).....	22
Figura 3-	Estrutura molecular do etanol.....	23
Figura 4-	Redução das emissões atmosféricas ao longo dos anos para misturas gasolina-etanol.....	27
Figura 5-	Esquema da estrutura do material lignocelulósico.....	30
Figura 6-	Estrutura molecular da celulose.....	33
Figura 7-	Estrutura molecular da hemicelulose.....	34
Figura 8-	Principais açúcares presentes na estrutura da hemicelulose.....	35
Figura 9-	Estrutura molecular da lignina.....	36
Figura 10-	Diagrama de bioconversão da biomassa em etanol.....	40
Figura 11-	Potencial de produção de etanol a partir da palha de cana-de-açúcar.....	55
Figura 12-	Bagaço de cana-de-açúcar utilizada no estudo.....	60
Figura 13-	Palha de cana-de-açúcar utilizada no estudo.....	61
Figura 14-	Aspecto do bagaço e da palha antes e após a hidrólise ácida realizada em laboratório.....	65
Figura 15-	Aspecto do sólido após a hidrólise ácida realizada em planta piloto.....	67
Figura 16-	Aspecto das reações de hidrólise enzimáticas realizadas neste estudo.....	68
Figura 17-	Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Tempo x Ácido.....	83
Figura 18-	Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Tempo x RSL.....	84
Figura 19-	Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Ácido x RSL.....	85
Figura 20-	Superfícies de resposta para Produção de Furfural.....	89
Figura 21-	Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – testes em planta piloto.....	98
Figura 22-	Superfícies de resposta para a produção de furfural – testes em planta piloto.....	100
Figura 23-	Superfícies de resposta para o rendimento de glicose – testes em laboratório.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Evolução da produção de biocombustíveis no mundo na última década (2001-2011).....	21
Tabela 2-	Especificação do AEAC e AEHC de acordo com a ANP.....	24
Tabela 3-	Comparação das propriedades físicas e químicas do etanol, da gasolina e do diesel.....	26
Tabela 4-	Potencial de produção de diversas matérias-primas.....	28
Tabela 5-	Materiais lignocelulósicos e suas composições típicas.....	31
Tabela 6-	Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.....	56
Tabela 7-	Planejamento fatorial 2 ³ , com fatores dos ensaios e níveis das variáveis.....	69
Tabela 8-	Condições Operacionais do Cromatógrafo.....	70
Tabela 9-	Composição química do bagaço e da palha.....	72
Tabela 10-	Resultados da hidrólise ácida realizada para a palha.....	75
Tabela 11-	Resultados das hidrólises ácidas realizadas para o bagaço.....	76
Tabela 12-	Rendimentos de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para a palha.....	78
Tabela 13-	Rendimentos de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para o bagaço.....	79
Tabela 14-	Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de xilose (%) para a palha.....	81
Tabela 15-	Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural (mg/g) para a palha.....	86
Tabela 16-	Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural (mg/g) para o bagaço.....	86
Tabela 17-	Concentração de produtos e inibidores nas reações de pré-tratamento em escala piloto.....	91
Tabela 18-	Concentração de produtos nas reações de hidrólise enzimática em laboratório.....	93
Tabela 19-	Rendimentos de glicose (%) e de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para a palha – escala piloto (pré-tratamento) e laboratório (HE).....	94
Tabela 20-	Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de xilose – testes em planta piloto.....	96
Tabela 21-	Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural – testes em planta piloto.....	99
Tabela 22-	Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de glicose – testes em planta piloto.....	101

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Biocombustíveis	16
2.2	Bioetanol	22
2.3	Materiais lignocelulósicos	29
2.3.1	<u>Constituintes dos materiais lignocelulósicos</u>	32
2.3.1.1	Celulose.....	32
2.3.1.2	Hemicelulose.....	33
2.3.1.3	Lignina.....	36
2.3.1.4	Cinzas.....	37
2.3.1.5	Extrativos.....	38
2.4	Bioconversão dos materiais lignocelulósicos	38
2.4.1	<u>Processos de pré-tratamento</u>	41
2.4.1.1	Moagem ou fragmentação da biomassa.....	41
2.4.1.2	Extrusão.....	42
2.4.1.3	Pré-tratamento alcalino.....	42
2.4.1.4	Organosolv.....	42
2.4.1.5	Ozonólise.....	43
2.4.1.6	Oxidação úmida (Wet Oxidation).....	43
2.4.1.7	Liquid hot water (Água quente).....	44
2.4.1.8	AFEX (Ammonia Fiber Explosion).....	44
2.4.1.9	Explosão a vapor.....	45
2.4.1.10	Pré-tratamento ácido.....	46
2.4.2	<u>Processos de hidrólise enzimática</u>	47
2.4.3	<u>Processo de fermentação</u>	49
2.4.4	<u>Estratégias para a produção do etanol</u>	50
2.4.5	<u>Efeitos inibitórios no processo de produção de etanol lignocelulósico</u>	52
2.5	Produção de etanol a partir dos resíduos da cana-de-açúcar	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	60
3.1	Matéria-prima	60
3.2	Caracterização do bagaço e da palha de cana-de-açúcar	61
3.2.1	<u>Umidade</u>	61
3.2.2	<u>Fração mássica de extrativos</u>	62
3.2.3	<u>Fração mássica de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas – Método Klason</u>	62
3.3	Enzimas e quantificação da atividade celulásica	63
3.4	Pré-tratamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar	64
3.4.1	<u>Hidrólise ácida – Laboratório</u>	64
3.4.2	<u>Hidrólise ácida – Planta piloto</u>	66
3.5	Hidrólise enzimática	67
3.6	Planejamento experimental	68
3.7	Determinação da concentração de açúcares, co-produtos e inibidores na fração líquida	70
3.8	Variáveis de resposta	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72

4.1	Caracterização do bagaço e da palha de cana de açúcar e potencial de produção de açúcares e etanol.....	72
4.2	Comparação dos resultados do pré-tratamento do bagaço e da palha – escala de laboratório.....	74
4.3	Avaliação das variáveis do pré-tratamento da palha no rendimento de glicose.....	90
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	105
5.1	Conclusões.....	105
5.2	Sugestões.....	106
	REFERÊNCIAS.....	108

INTRODUÇÃO

Atualmente, os biocombustíveis possuem uma participação muito importante no cenário energético mundial. Estima-se que, em 2030, o consumo deste tipo de combustível represente cerca de 5% do total de combustíveis consumidos no mundo. Os biocombustíveis já estão presentes de forma estratégica na matriz energética de diversos países, principalmente nos Estados Unidos (maiores produtores de biocombustíveis no mundo) e no Brasil (45% da matriz energética brasileira é proveniente de biocombustíveis) (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

Diversos estudos foram ou estão sendo realizados objetivando o desenvolvimento de tecnologias que produzam combustíveis a partir de fontes renováveis. Processos de produção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar, do milho e da beterraba já estão consolidados. Porém, é imprescindível o desenvolvimento de outros processos que utilizem outras biomassas.

Uma das matérias-primas mais promissoras para a produção de biocombustíveis, principalmente etanol, é a matéria lignocelulósica. Ela é composta, em sua maioria, por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) que podem ser convertidos em açúcares (glicose e xilose) e, posteriormente, estes podem ser transformados em etanol através da fermentação alcoólica.

A matéria lignocelulósica de maior expressão no Brasil é o bagaço da cana-de-açúcar. Por ser um resíduo do processo de produção de etanol a partir do caldo da cana, ele já está disponível na usina para ser utilizado em um processo de 2ª geração. Atualmente, o bagaço é queimado nas caldeiras das usinas para a produção de energia elétrica. Porém, existe um excedente deste material. Ainda existem estudos de melhoria de eficiência da queima do bagaço, o que acarretará em uma maior disponibilidade deste produto (SANTOS *et al.*, 2012).

Entretanto, ainda existe a necessidade de desenvolver tecnologias que utilizem outras biomassas. Uma opção é a palha da cana-de-açúcar. Atualmente, ela é queimada antes da colheita da cana ou é deixada no próprio canavial, para devolver determinados nutrientes ao solo. Por ser muito similar ao bagaço em termos composicionais e por estar disponível para utilização, a palha também é um material que tem um grande potencial para a produção de etanol (SANTOS *et al.*, 2012). Sendo assim, o desenvolvimento de um processo que utilize tanto bagaço

quanto palha seria de grande importância para a matriz energética brasileira. Como os processos utilizando bagaço já estão em um estágio mais avançado, é interessante a avaliação da palha utilizando tais processos (hidrólise ácida, explosão a vapor etc).

Com base no exposto, a presente dissertação de mestrado tem o objetivo de realizar uma comparação do potencial de produção de açúcares utilizando a palha e o bagaço, usando o processo de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, com o intuito de avaliar se estes processos, que são comumente utilizados para o bagaço, podem ser usados para a palha. Desta forma, o trabalho será apresentado da seguinte maneira: no Capítulo I, serão apresentados os objetivos específicos desta dissertação. No Capítulo II, será explicitada a revisão bibliográfica, que visa fornecer embasamento teórico, além de possibilitar a análise dos resultados obtidos na literatura sobre pontos pertinentes ao tema. No Capítulo III serão descritos os métodos e materiais utilizados nesta pesquisa; no Capítulo IV serão descritos os resultados encontrados os sistemas estudados e, finalmente, serão apresentadas no Capítulo V as conclusões e sugestões para futuros estudos.

1. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial de produção de açúcares (glicose e xilose) a partir da palha de cana-de-açúcar utilizando o pré-tratamento ácido diluído e a hidrólise enzimática, processos comumente utilizados para o bagaço de cana-de-açúcar, gerando matéria-prima para posterior produção de etanol a partir da fermentação alcoólica. Para tal, foram realizados diversos ensaios com palha e com bagaço, tendo como objetivos específicos:

- Avaliar o potencial teórico de produção de açúcares e de etanol das duas biomassas e efetuar uma comparação entre elas e com a literatura.
- Realizar, em escala laboratorial, ensaios de pré-tratamento (hidrólise ácida) utilizando a palha e o bagaço, com o objetivo de determinar a concentração de açúcares na fase líquida e determinar o rendimento de xilose e a produção de inibidores (principalmente, furfural).
- Verificar, através de métodos estatísticos, quais os principais efeitos e interações que possuem maior significância no rendimento de xilose e na produção de inibidores para os ensaios realizados em escala laboratorial, utilizando como variáveis o tempo de reação, a concentração de ácido no meio reacional e a relação sólido:líquido.
- Realizar, em escala piloto, ensaios de pré-tratamento (hidrólise ácida) utilizando a palha para gerar material para as reações de hidrólise enzimática.
- Determinar a concentração de açúcares gerados nas reações de pré-tratamento realizadas em escala piloto, calcular os valores de rendimento de xilose e de produção de inibidores (furfural) e comparar tais valores com os obtidos em escala piloto.
- Verificar, através de métodos estatísticos, quais os principais efeitos e interações que possuem maior significância no rendimento de xilose e produção de inibidores para os ensaios de pré-tratamento realizados em escala piloto, utilizando como variáveis o tempo de reação, a concentração de ácido no meio e a relação sólido:líquido (RSL), e comparar com os resultados encontrados em escala laboratorial.

- Realizar, em escala laboratorial, ensaios de hidrólise enzimática utilizando a palha pré-tratada, determinar a concentração de açúcares gerados e calcular o rendimento de glicose destes ensaios.

- Verificar, através de métodos estatísticos, quais são os principais efeitos e interações das variáveis do pré-tratamento que mais influenciam nno rendimento de glicose para os ensaios realizados em escala laboratorial e comparar com resultados encontrados na literatura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis líquidos e gasosos produzidos a partir de fontes renováveis de energia (biomassa) para uso no setor de transportes e na produção de energia. As principais fontes de biomassa utilizadas na produção de biocombustíveis são as biomassas agrícolas e florestais e a porção biodegradável dos resíduos industriais e municipais (DUFÉY, 2006).

Diversos são os motivos que tornam a biomassa uma matéria-prima atrativa para a produção de biocombustíveis (RAJAGOPAL *et al.*, 2007):

- São produzidos a partir de uma fonte inesgotável, uma vez que seus estoques podem ser reabastecidos através da agricultura.

- São considerados como uma solução para a mudança climática. Embora isso possa ser considerado um fato muito otimista, as emissões provenientes da queima de biocombustíveis são insignificantes comparadas com as de combustíveis fósseis, pois o CO₂ liberado pelos biocombustíveis é facilmente absorvido pela natureza. Entretanto, em inúmeras vezes, não se consegue contabilizar as emissões indiretas de carbono (de agricultura e processamento) e as emissões de outros poluentes nocivos durante o plantio da biomassa, o que pode ser significativo.

- Em função da demanda de biomassa para a produção dos biocombustíveis, o rendimento agrícola poderá aumentar. Hoje, o declínio deste fator é um problema em todo o mundo (GARDNER, 2003). Com os biocombustíveis, a maioria dos países será capaz de desenvolver uma ou mais culturas nas quais eles possuam uma vantagem comparativa e usá-las para atender tanto a demanda interna ou externa. Esta maior demanda para a agricultura influencia no aumento do rendimento agrícola. Em países com excesso de oferta, isto significa um aumento da renda dos agricultores e uma redução da necessidade de incentivos ao aperfeiçoamento deste rendimento (HAZELL E PACHAURI, 2006).

– O fato acima também sugere que os biocombustíveis podem trazer auto-suficiência energética para os países, o que reduz a dependência de fontes externas de energia (HAZELL E PACHAURI, 2006).

– Os biocombustíveis têm propriedades físicas e químicas semelhantes as dos combustíveis fósseis, como a gasolina ou o diesel. Para sua utilização em motores de combustão interna já existentes, as modificações necessárias são mínimas. Como resultado disto, as adaptações necessárias a frota original para uso dos biocombustíveis (pelo menos, em baixos níveis de mistura como 10% ou 20%) são mais rentáveis do que as adaptações necessárias para uso de outras tecnologias (UGARTE, 2006; FULTON *et al.*, 2004).

Entretanto, a produção dos biocombustíveis tem causado problemas no setor alimentício, pois tem diminuído a produção de alimentos no mundo. Procurando maiores lucros, muitos agricultores preferem produzir milho, soja, canola ou cana-de-açúcar para a transformação em biocombustível. Há também o consumo de água para a irrigação, o gasto de energia no cultivo e o desmatamento de áreas para o cultivo. Como resultado, ocorre a perda da biodiversidade, a diminuição da variedade de produtos agrícolas e a possível elevação de seus preços. Adicionalmente, isto eleva a demanda por substâncias utilizadas na agricultura, como fertilizantes e pesticidas, produtos que causam impactos negativos no meio ambiente (RAJAGOPAL *et al.*, 2007).

Atualmente, com o avanço tecnológico, a produção de diversas substâncias a partir de biomassa tem sido amplamente avaliada e processos de produção de compostos como bio-hidrogênio, bio-metanol, dimetilformamida (DMF), bio-dimetil-éter (Bio-DME), diesel a partir do processo Fischer-Tropsch, alcoóis superiores e diesel de madeira têm sido desenvolvidos (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010). A Figura 2.1 mostra esta diversidade de produtos e processos (DERMIBAS, 2009).

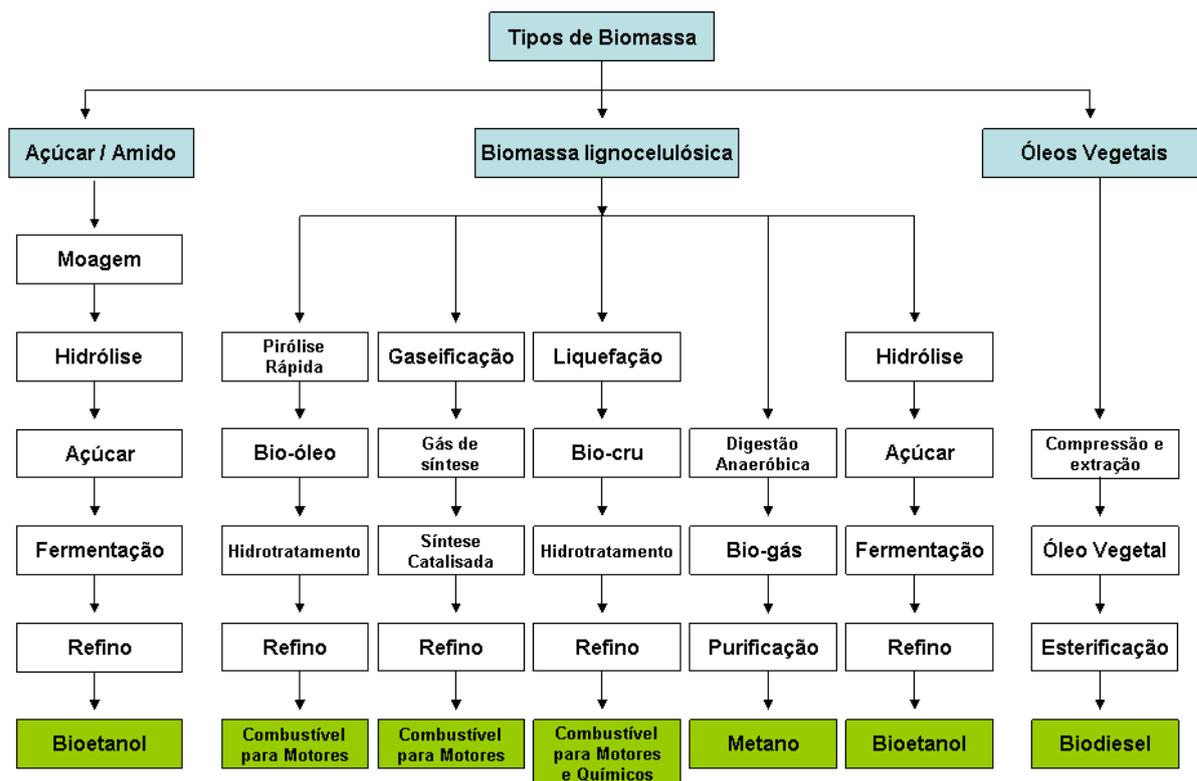


Figura 2.1- Diversidade de processos e produtos gerados a partir de fontes renováveis
 Fonte: (DEMIRBAS, 2009)

Entretanto, existem dois principais biocombustíveis produzidos no mundo: o etanol (produzido da fermentação de açúcares gerados a partir da conversão de alguma biomassa) e o biodiesel (produzido a partir da transesterificação de um óleo vegetal ou de gordura animal com um álcool) (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

De acordo com as últimas estatísticas oficiais, a produção global de biocombustíveis atingiu um nível recorde de quase 59 milhões de toneladas de óleo-equivalente em 2011, respondendo por 1,6% de todo o combustível consumido (BP, 2012). Espera-se que a produção mundial de biocombustíveis continue a crescer nos próximos anos. A Agência Internacional de Energia (AIE) estima uma taxa média de crescimento anual de 7%, o que significa que, até 2030, os biocombustíveis representarão cerca de 5% do total do transporte rodoviário, em comparação com o valor atual de cerca de 2%. Estima-se que os Estados Unidos, que são hoje os maiores produtores de biocombustíveis do mundo, vão aumentar o seu consumo nos próximos anos. A Europa vai liderar o crescimento global da demanda nos próximos anos e o bioetanol será o principal responsável por este crescimento. Em relação ao uso da terra, o crescimento projetado levará a um

aumento da terra arável utilizada para produção de biocombustíveis de 1% do total da terra atualmente disponível para cerca de 2,5% em 2030 (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

Atualmente, dois países, Brasil e EUA, são responsáveis por cerca de 70% da produção global de biocombustíveis (BP, 2012). Ambos produzem, principalmente, bioetanol: os EUA a partir do milho e o Brasil a partir de cana-de-açúcar. A Europa, por outro lado, produz principalmente biodiesel e hoje é responsável por quase 90% da produção mundial deste biocombustível. A produção de biodiesel na Europa está crescendo rapidamente, principalmente devido aos subsídios e a outros incentivos oferecidos pelo governo. China e Índia também são importantes produtores de bioetanol. Nas próximas décadas, a demanda global por combustíveis deve crescer em até 55% até 2030, em relação a 2004 (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

A demanda por biocombustíveis irá crescer em todo o mundo, mas particularmente nos países em desenvolvimento. A maioria dos biocombustíveis continuará a ser produzido e consumido internamente, embora seja esperado um aumento significativo do comércio internacional. O bioetanol produzido a partir de cana-de-açúcar será responsável pela maior parcela das exportações e o Brasil deverá manter-se como principal exportador (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

Além das Américas e da Europa, diversos outros países, principalmente na África e na Ásia, têm potencial para se tornar grandes produtores e exportadores de biocombustíveis. Países do sudeste asiáticos que são grandes produtores de óleo de palma podem desenvolver uma produção competitiva de biodiesel (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010).

Alguns países estabeleceram metas para uso doméstico de biocombustíveis, quer para uso como combustível puro ou para uso em misturas com um combustível convencional. Em mais de 10 países, as empresas petrolíferas são obrigadas a adicionar uma determinada quantidade de biocombustíveis ao combustível fóssil. A União Européia, por exemplo, visa um percentual de 10% de biocombustíveis em sua demanda para consumo rodoviário até 2020 (WORLD ENERGY COUNCIL, 2010). No Brasil, devido à importância que será dada pelo mercado externo, a capacidade de produção de bioetanol deverá alcançar, em 2015, cerca de 47 bilhões de litros, equivalente a uma taxa de crescimento anual de 9% (MILANEZ *et al.*, 2008). Uma avaliação da evolução da frota de veículos leves no

Brasil e do histórico de consumo de combustíveis indica que, para 2015, a demanda interna de bioetanol poderá estar entre 28 bilhões de litros e 34,3 bilhões de litros, assumindo que entre 50% e 75% do consumo dos veículos flexíveis, respectivamente, serão atendidos pelo bioetanol hidratado (MILANEZ *et al.*, 2008).

A Tabela 2.1 mostra a evolução da produção de biocombustíveis no mundo na última década (2001-2011) (adaptado de BP, 2012). A Figura 2.2 representa graficamente esta evolução, revelando a tendência de crescimento mundial destes produtos (adaptado de BP, 2012).

x 1000 toneladas de equivalentes de óleo												
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Aumento de 2010 para 2011
América do Norte	3.399	4.100	5.339	6.470	7.612	9.906	13.922	19.600	22.395	26.226	29.225	11,4%
Estados Unidos	3.288	3.987	5.226	6.357	7.478	9.746	13.456	19.096	21.670	25.467	28.251	10,9%
Américas Central e do Sul	5.638	6.280	7.227	7.291	8.093	9.405	12.303	15.788	15.942	17.863	16.129	-9,7%
Brasil	5.600	6.149	7.068	7.135	7.835	8.729	11.323	14.132	13.962	15.575	13.196	-15,3%
Europa e Euroásia	889	1.206	1.619	2.031	3.157	5.052	6.820	8.196	10.243	10.811	9.837	-9,0%
África	6	6	6	6	6	6	6	10	14	29	29	0,0%
Ásia e Oceania	89	238	491	603	834	1.280	1.563	2.468	3.207	3.528	3.649	3,4%
TOTAL NO MUNDO	10.021	11.830	14.682	16.401	19.702	25.649	34.614	46.062	51.801	58.457	58.869	0,7%

Tabela 2.1- Evolução da produção de biocombustíveis no mundo na última década (2001-2011)

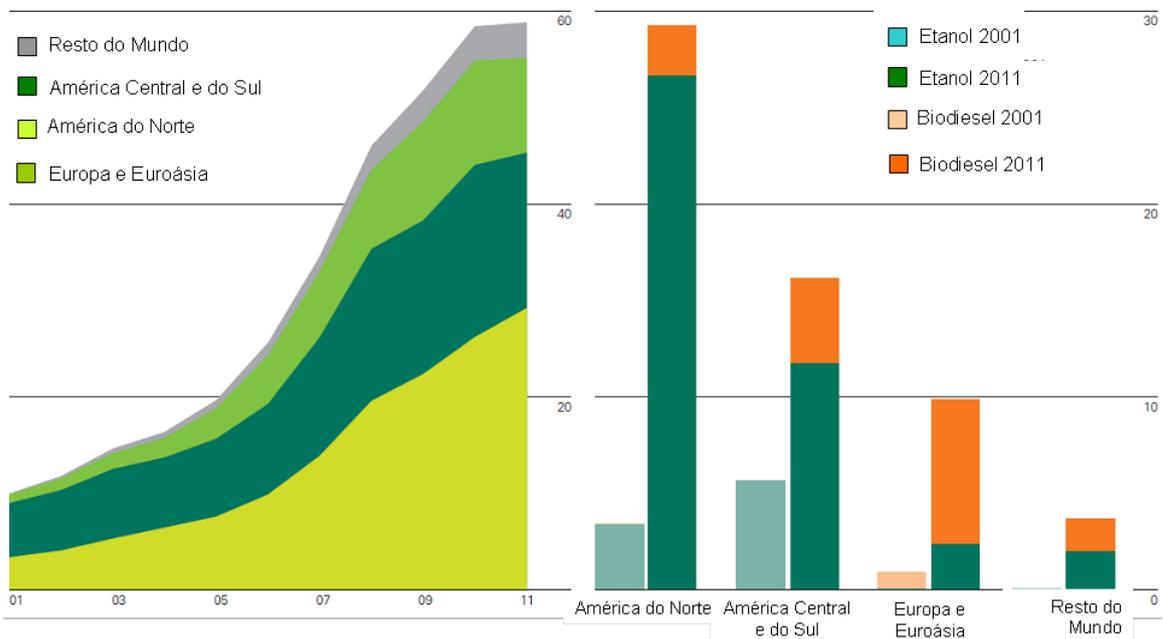


Figura 2.2 - Tendência de crescimento da produção de biocombustíveis no mundo na última década (2001-2011)

2.2 Bioetanol

O etanol (C_2H_5OH) é um álcool incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água, derivado da cana-de-açúcar (produzido no Brasil), do milho (produzido nos Estados Unidos), da uva, da beterraba (especialidade dos países europeus) ou de outros cereais, produzido através da fermentação da sacarose. Uma definição mais genérica para o etanol, que inclui o bioetanol produzido através de outras matérias-primas, é: biocombustível líquido que pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa e tecnologias de conversão. A Figura 2.3 mostra a estrutura molecular do etanol.

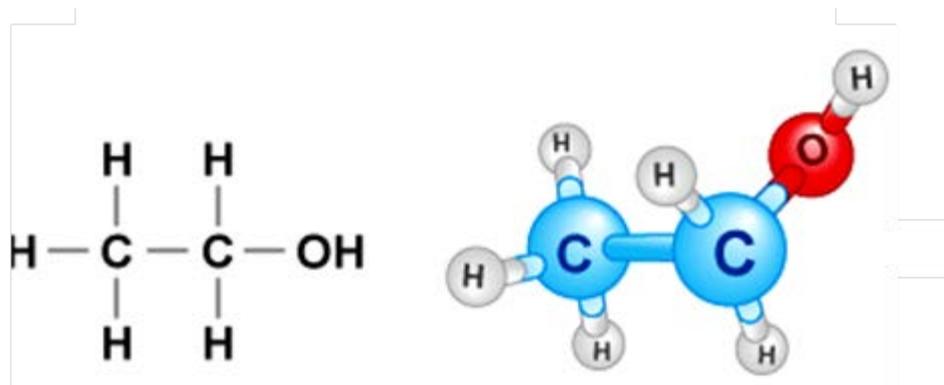


Figura 2.3 - Estrutura molecular do etanol

O bioetanol é um combustível alternativo atrativo por possuir características similares as da gasolina e por ser produzido utilizando uma fonte de base renovável. Basicamente, ele é utilizado de duas maneiras: 1) em misturas de gasolina e etanol anidro; ou 2) como etanol puro, geralmente hidratado.

Apesar de similares, as especificações do etanol têm sensíveis diferenças entre os países que o utilizam. No Brasil, os produtores e distribuidores devem atender às especificações definidas pela Portaria ANP 309/2001, para a gasolina com etanol anidro, e pela Resolução ANP 36/2005, para o etanol anidro e hidratado, denominados, respectivamente, álcool etílico anidro combustível (AEAC) e álcool etílico hidratado combustível (AEHC), na legislação brasileira (BNDES e CGEE, 2008). A Tabela 2.2 mostra a especificação completa dos dois tipos de álcool (ANP, 2005).

Tabela 2.2 - Especificação do AEAC e AEHC de acordo com a ANP

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	ESPECIFICAÇÕES		MÉTODO	
		AEAC	AEHC	ABNT/NBR	ASTM (1)
Aspecto	-	(2)	(2)	Visual	
Cor	-	(3)	(4)	Visual	
Acidez total (como ácido acético), máx.	mg/L	30	30	9866	D 1613
Condutividade elétrica, Max	µS/m	500	500	10547	D 1125
Massa específica a 20°C	kg/m ³	791,5 máx.	807,6 a 811,0 (5)	5992	D 4052
Teor alcoólico	°INPM	99,3 mín.	92,6 a 93,8 (5)	5992	-
Potencial hidrogeniônico (pH)	-	-	6,0 a 8,0	10891	-
Resíduo por evaporação, máx. (6)	mg/100mL	-	5	8644	-
Teor de hidrocarbonetos, máx.(6)	%vol.	3	3	13993	-
Íon Cloreto, máx. (6)	mg/kg	-	1	10894 / 10895	D 512(7)
Teor de etanol, mín. (8)	%vol.	99,6	95,1	-	D 5501
Íon Sulfato, máx.(9)	mg/kg	-	4	10894/12120	-
Ferro, máx. (9)	mg/kg	-	5	11331	-
Sódio, máx. (9)	mg/kg	-	2	10422	-

(1) Poderão ser utilizados como métodos alternativos para avaliação das características nos casos de importação do álcool, com exceção do método ASTM D4052, que poderá ser sempre utilizado como método alternativo para a determinação da massa específica.

(2) Límpido e isento de impurezas.

(3) Incolor antes da adição de corante, segundo especificação constante da Tabela II deste Regulamento Técnico, que deverá ser adicionado no teor de 15 mg/L proporcionando ao produto a cor laranja.

(4) Incolor.

(5) Aplicam-se na Importação, Distribuição e Revenda os seguintes limites para massa específica e teor alcoólico do AEHC: 805,0 a 811,0 e 92,6 a 94,7 respectivamente.

(6) Limite requerido na Importação, Distribuição e Revenda, não sendo exigida esta análise para emissão do Certificado da Qualidade pelos Produtores.

(7) Procedimento C e modificação constante na ASTM D4806.

(8) Requerido quando o álcool não for produzido por via fermentativa a partir da cana-de-açúcar ou em caso de dúvida quando da possibilidade de contaminação por outros tipos de álcool.

(9) O produtor deverá transcrever no Certificado da Qualidade o resultado obtido na última determinação quinzenal, conforme previsto no § 1º do Art.5º da presente Resolução.

(10) Deverá ser determinado no AEAC que tiver sido transportado ou produzido em local que possua equipamentos ou linhas de cobre, ou ligas que contenham este metal.

Sendo um combustível que pode ser utilizado em conjunto ou em substituição à gasolina, é inevitável a comparação das principais características dos dois produtos. A Tabela 2.3 mostra esta comparação, onde se utiliza as características de uma gasolina típica e a comparação entre estes dois combustíveis com um diesel típico.

Tabela 2.3 - Comparação das propriedades físicas e químicas do etanol, da gasolina e do diesel

	Diesel	Etanol	Gasolina
Poder Calorífico Inferior - PCI (MJ/kg)	42,7	26,9	43,7
Poder Calorífico Inferior - PCI (MJ/l)	36,4	21,0	32
Viscosidade (cSt)	2,5	-	-
Massa específica (kg/m³) a 15°C	830-880	790	700-780
Número de Cetano	> 45	abaixo de 8	-
Número de Octano (MON)	-	96-106	79-98
Razão Estequiométrica	14,5	9	15,1
Pressão de Vapor a 38°C (psi)	0,04	2,5	7-9
Ponto de flash (°C)	55-65	13	-40
Temperatura de ebulição (°C)	170-340	78	33-213
Calor de vaporização (kJ/kg)	-	842	300
Temperatura de auto-ignição (°C)	230-315	366	300-371
Limites de inflamabilidade (°C)	64-150	13-42	(-40) - (-18)
Limites de inflamabilidade (% vol)	0,6-5,6	3,3-19,0	1,4-7,6

Fonte: RANALLI, 2007

Comparado com a gasolina, o bioetanol possui uma alta octanagem (96-106 contra 79-98, limites de inflamabilidade mais amplos (13 a 42°C contra -40 a -18°C, sendo necessário maior volume – 3,3-19,0% contra 1,4-7,6%), alta temperatura de auto-ignição (366°C contra 300-371°C) e alto calor de vaporização (842kJ/kg contra 300kJ/kg). Estas propriedades permitem altas taxas de compressão, tempo de queima mais curto e uma combustão mais limpa, o que traz uma melhor eficiência teórica sobre a gasolina. As desvantagens do bioetanol incluem uma menor densidade energética que a gasolina, sua corrosividade e sua baixa pressão de vapor (o que prejudica a partida a frio do motor) (BNDES e CGEE, 2008).

A combustão da mistura gasolina-etanol e do etanol puro em motores produz menores emissões de monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SOx), hidrocarbonetos e outros compostos poluentes. Ao mesmo tempo, elevam-se os

aldeídos (compostos do tipo R-CHO) e, dependendo das características do motor, os óxidos de nitrogênio (NOx). Normalmente, os limites legais de emissão para veículos são atendidos em sua plenitude, sendo os benefícios resultantes do uso do etanol bastante conhecidos. Um estudo do IBAMA elaborado em 2006 mostra a redução da emissão de gases dos veículos produzidos no Brasil ao longo das últimas décadas, por conta do desenvolvimento tecnológico dos motores e da introdução do etanol (Figura 2.4).

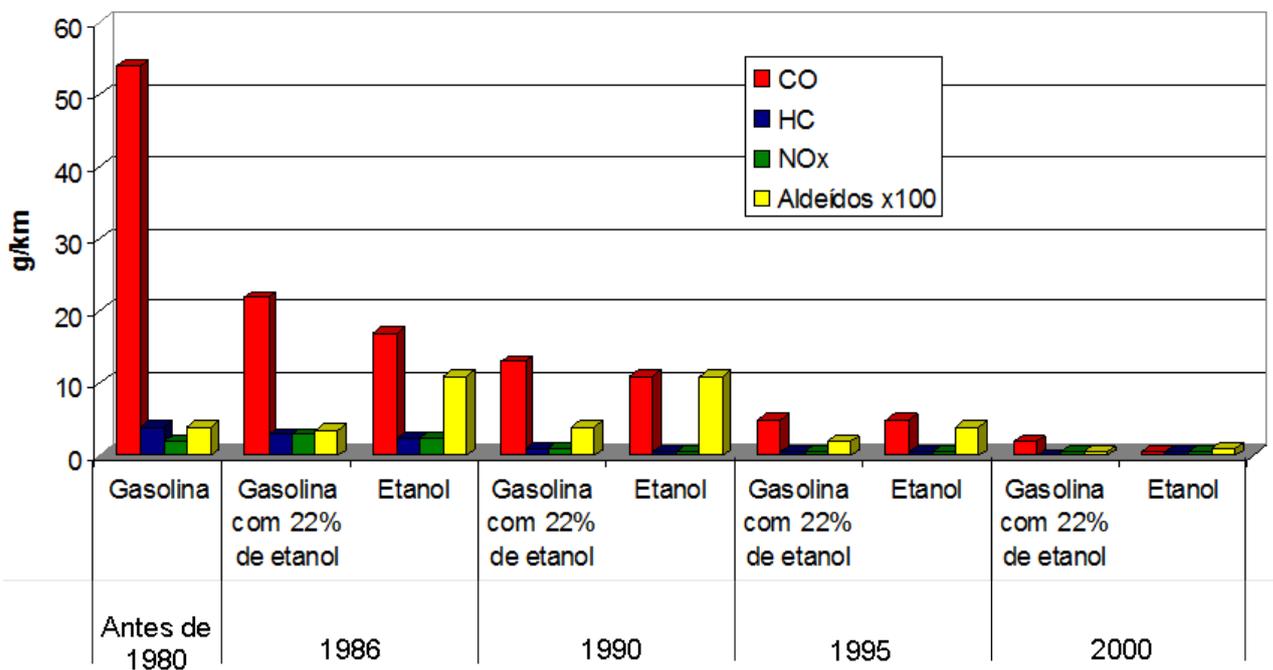


Figura 2.4 - Redução das emissões atmosféricas ao longo dos anos para misturas gasolina-etanol
Fonte: BNDES e CGEE, 2008

Além da aplicação como combustível, o etanol pode ser utilizado, principalmente, como matéria-prima de diversos produtos, como etileno (intermediário de diversos produtos químicos e polímeros), ácido acético (utilizado como solvente e na indústria de tecidos, entre outras aplicações) e acetato de etila (utilizado como solvente e como componente de formulações de essências).

As principais matérias-primas para a produção de bioetanol podem ser classificadas em três tipos: i) materiais contendo sacarose, ii) materiais amiláceos e iii) biomassa lignocelulósica. Diferentes matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de bioetanol e uma comparação do potencial de produção destas

são apresentadas na Tabela 2.4. Um dos maiores problemas na produção de bioetanol é a disponibilidade destas matérias-primas, que pode variar de estação para estação e depende da localização geográfica. O preço da matéria-prima também é flutuante, o que afeta diretamente os custos de produção (BALLAT *et al.*, 2008).

Tabela 2.4 - Potencial de produção de diversas matérias-primas

Biomassa	Potencial de produção de bioetanol (L/ton)
Cana-de-açúcar	70
Beterraba	110
Batata doce	125
Batata	110
Mandioca	180
Milho	360
Arroz	430
Cevada	250
Trigo	340
Bagaço e outras biomassas celulósicos	280

Fonte: BALLAT *et al.*, 2008

A sacarose para a produção de bioetanol é, essencialmente, advinda da cana-de-açúcar e da beterraba. Os açúcares são removidos destas matérias-primas através de um processo de extração, produzindo um xarope (solução de açúcares). Um micro-organismo é utilizado para promover a fermentação destes açúcares, produzindo o bioetanol. Brasil, Ásia (utilizando cana-de-açúcar) e Europa (utilizando a beterraba) são os principais produtores de etanol através deste processo.

O amido é uma matéria-prima de alto rendimento para a produção de etanol, embora sua hidrólise seja requerida antes da realização da fermentação. O amido é tradicionalmente hidrolisado por ácidos, porém, por causa de sua especificidade, de suas condições brandas de reação e pela ausência de reações secundárias, as enzimas se tornam os catalisadores normalmente utilizados. A hidrólise do amido produz um caldo concentrado em glicose, que pode ser

fermentada para a produção do álcool. Esta tecnologia é amplamente utilizada nos Estados Unidos, na produção de etanol a partir de milho.

Os materiais lignocelulósicos tem tido um papel importante na produção de etanol, uma vez que este é o biopolímero mais abundante da Terra. A bioconversão da celulose e da hemicelulose (componentes do material lignocelulósico) a monômeros de açúcar é de difícil realização, se comparado à conversão do amido. Esta dificuldade está sendo estudada por diversos pesquisadores do mundo, onde o objetivo é obter um processo que realize: i) a despolimerização eficiente da hemicelulose e da celulose para a produção de açúcares de 5 e 6 átomos de carbono, ii) uma fermentação eficiente de uma mistura de açúcares, iii) que seja energeticamente eficiente e iv) que tenha um custo competitivo.

2.3 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, participando em cerca de 50% da biomassa terrestre. O termo “estrutura lignocelulósica” está relacionado com a parte da planta que forma a parede celular, composta por estruturas fibrosas, basicamente constituídas por polissacarídeos [celulose (40-60%) e hemicelulose (20 - 40%)]. Estes componentes estão associados a uma estrutura macromolecular que contém substâncias aromáticas, denominada lignina (15-25%) (SUN e CHENG, 2002). De forma geral, pode-se afirmar que esses materiais possuem nas suas composições, aproximadamente, 60-70% de polissacarídeos (em base seca), que contém nas suas unidades monoméricas glicosídeos valiosos (açúcares). Estes componentes estão associados em diferentes graus de complexidade em uma hetero-matriz, variando sua composição relativa de acordo com o tipo, a espécie e mesmo a fonte da biomassa (CARERE *et al.*, 2008; CHANDRA *et al.*, 2007; FENGEL e WEGENER, 1984). A abundância relativa de celulose, de hemicelulose e de lignina é, entre outros, fator-chave na determinação de uma rota de conversão ótima para cada tipo de biomassa (MCKENDRY, 2002). As matérias-primas lignocelulósicas exigem um agressivo pré-tratamento, para se obter um substrato facilmente hidrolisado por enzimas

celulolíticas comerciais, produzindo os açúcares necessários à fermentação. A Figura 2.5 mostra um esquema da estrutura do complexo lignocelulósico.

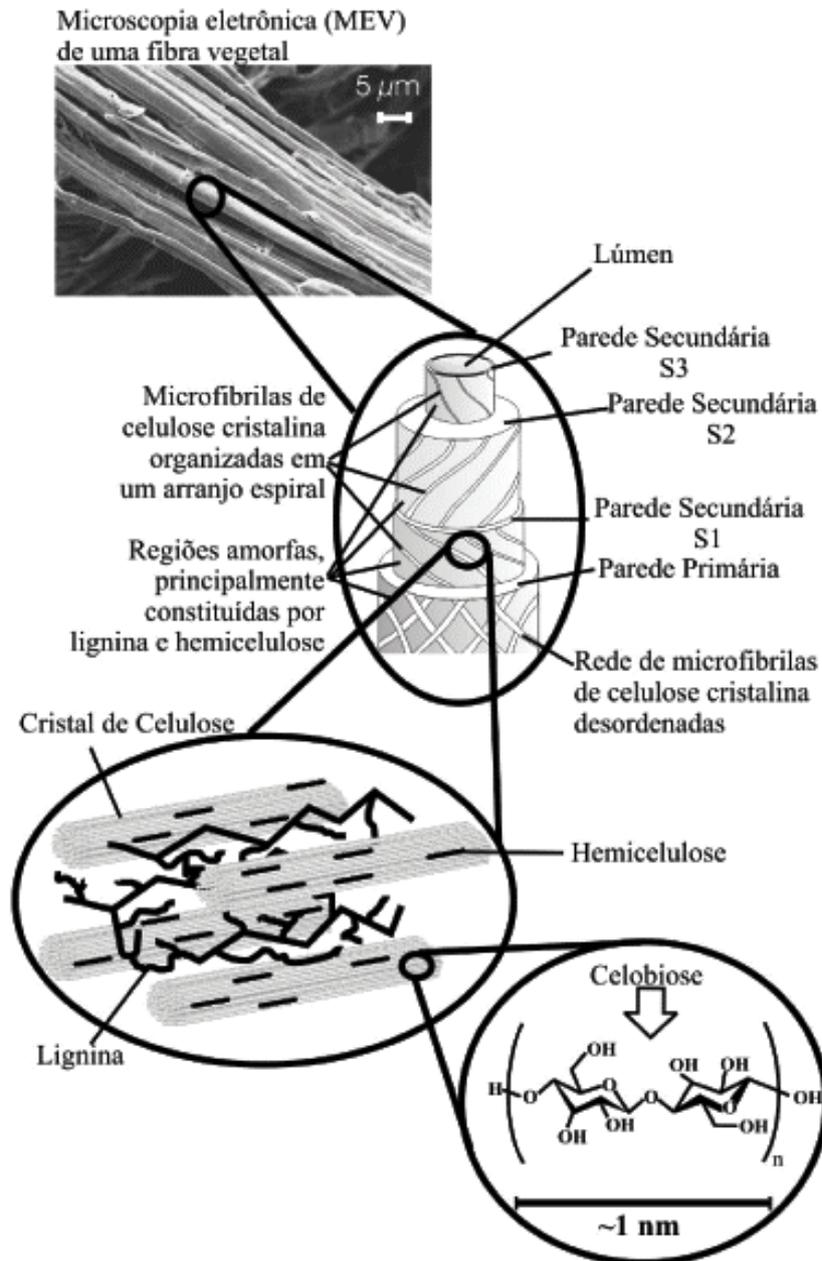


Figura 2.5 - Esquema da estrutura do material lignocelulósico
Fonte: SANTOS *et al.*, 2012

A Tabela 2.5 mostra diversos materiais lignocelulósicos e suas composições típicas. Pode-se observar que o bagaço e a palha de cana-de-açúcar possuem percentuais similares de celulose. Em contrapartida, o percentual de hemicelulose do bagaço é superior ao da palha, apontando um maior potencial para produção de açúcares a partir deste polissacarídeo. Já o percentual de lignina da palha é inferior

ao do bagaço, o que indica a possibilidade do pré-tratamento da palha ser mais eficiente do que o do bagaço.

Tabela 2.5 - Materiais lignocelulósicos e suas composições típicas

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	36	28	20
Palha de cana-de-açúcar	36	21	16
Madeira de Lei	40-55	24-40	18-25
Madeira Conífera	45-50	25-35	25-35
Casca da noz	25-30	25-30	30-40
Palha de milho	36	28	29
Palha de arroz	33	26	7
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Papel	85-99	0	0-15
Palha de trigo	30	50	15
Lixo classificado	60	20	20
Folhas	15-20	80-85	0
Fibras da semente do algodão	80-95	5-20	0
Jornal	40-55	25-40	18-30
Resíduos da indústria do papel	60-70	10-20	5-10
Dejetos de suínos	6	28	NA
Esterco bovino sólido	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Bermudagrass	25	35,7	6,4
Switchgrass	45	31,4	12

NA - não avaliado

Fonte: adaptado de SUN e CHENG, 2002

2.3.1 Constituintes dos materiais lignocelulósicos

2.3.1.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte da parede celular da planta, conferindo propriedades estruturais à biomassa. A celulose é um polímero formado por radicais β -D-glicose unidos através de ligações β -(1,4)-glicosídicas. O grau de polimerização das cadeias da celulose é da ordem de 10.000 unidades de glicose para a madeira e de 15.000 unidades para algodão nativo. A unidade de repetição da cadeia da celulose é o dissacarídeo celobiose, o contrário do que se encontra em outros polímeros de glucana, onde a unidade principal é a glicose (DESVAUX, 2005; FENGEL e WEGENER, 1984). As cadeias de celulose (20-300 unidades monoméricas) se agrupam para formar microfibras, que são empacotadas juntas, formando as fibras de celulose. As microfibras de celulose são, na sua maioria, independentes, mas a estrutura maior do polímero possui a presença de ligações covalentes, de pontes de hidrogênio e de ligações de Van der Waals. Ligações de hidrogênio no interior da microfibra da celulose determinam a linearidade da cadeia, mas ligações de hidrogênio intercadeias podem introduzir ordem (cristalinidade) ou desordem (amorficidade) na estrutura da celulose (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005). A Figura 2.6 ilustra a estrutura da celulose.

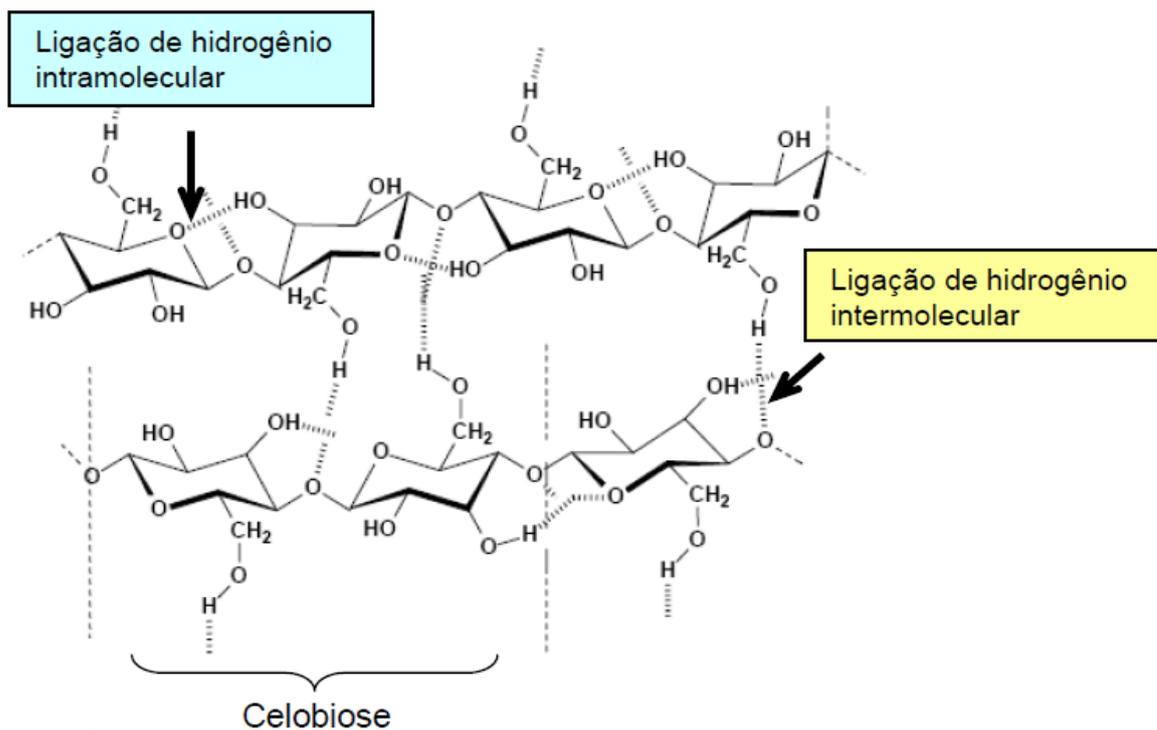


Figura 2.6 - Estrutura molecular da celulose

Fonte: MORAIS *et al.*, 2005

2.3.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante (20-50% da biomassa lignocelulósica) e difere da celulose por não ser quimicamente homogênea. As hemiceluloses são polímeros ramificados e heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glucose, galactose) e açúcares acetilados. Ela tem um menor peso molecular em relação à celulose e ramificações com cadeias laterais curtas, que são facilmente hidrolisadas (FENGEL e WEGENER, 1984; SAHA, 2003). A Figura 2.7 abaixo apresenta a estrutura da hemicelulose.

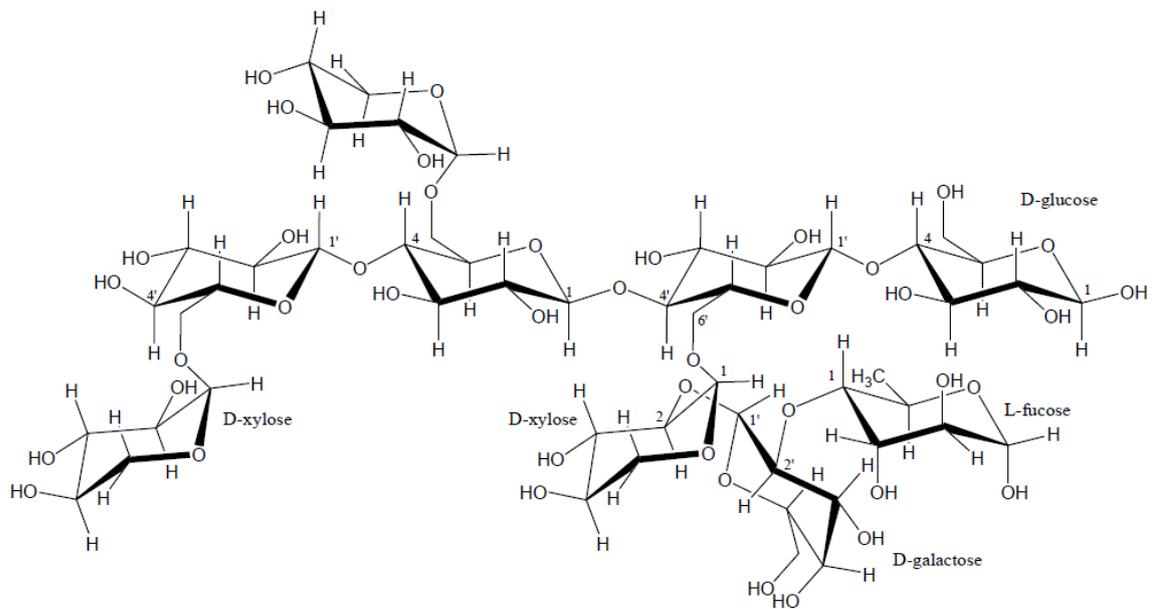


Figura 2.7 - Estrutura molecular da hemicelulose
 Fonte: VERMERRIS, 2008

As hemiceluloses constituintes das diversas biomassas diferem em composição. Em biomassas provenientes da agricultura como a palha e gramíneas, elas são compostas principalmente de xilana, enquanto hemiceluloses de madeira contêm principalmente glucomananas. Em muitas plantas, as xilanas são heteropolissacarídeos formados por unidades de 1,4- β -D-xiloses. Além de xilose, as xilanas podem conter arabinose, ácido glucurônico, ácido acético e ácidos ferúlicos e p-cumáricos. A Figura 2.8 mostra os principais açúcares presentes na estrutura da hemicelulose. As xilanas podem ser facilmente extraídas em meios ácido ou alcalino, enquanto a extração de glucomananas requer um meio forte alcalino (BALABAN e UCAR, 1999; FENGEL e WEGENER, 1984).

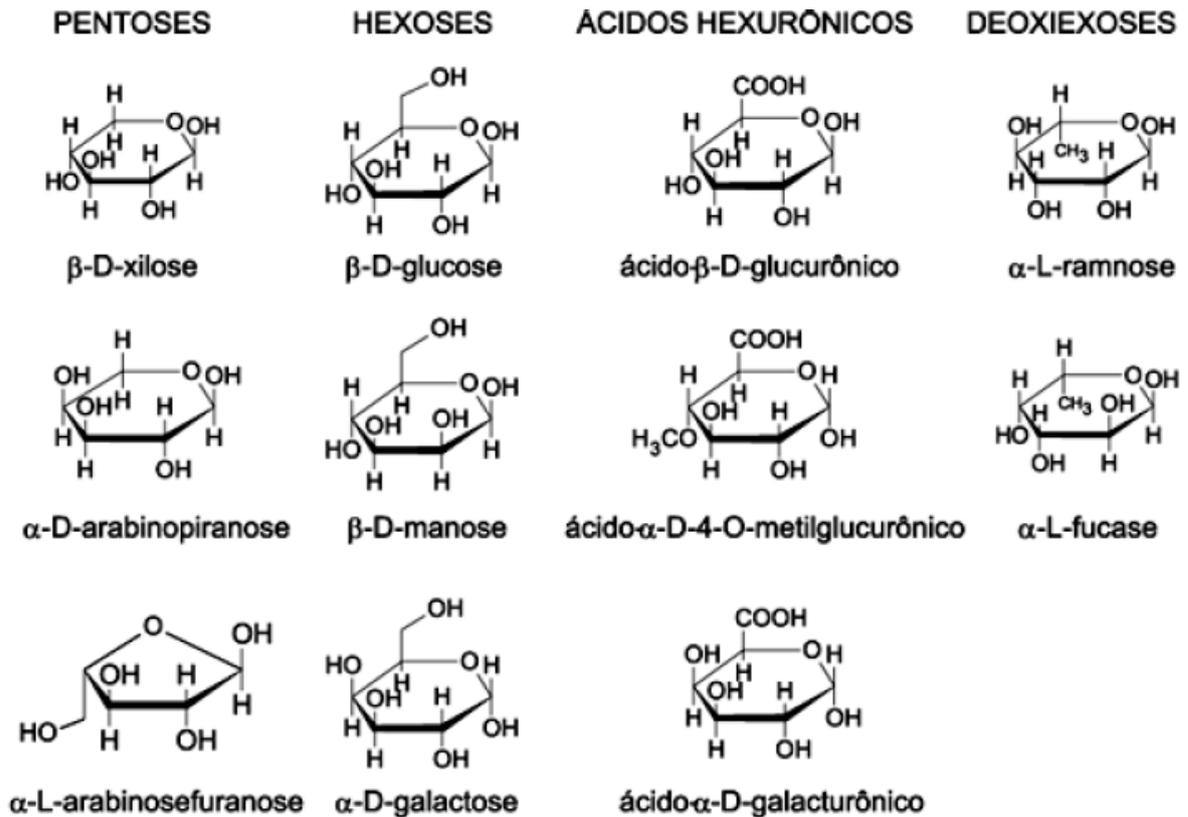


Figura 2.8 - Principais açúcares presentes na estrutura da hemicelulose
Fonte: MORAIS *et al.*, 2005

Entre os principais componentes dos materiais lignocelulósicos, as hemiceluloses são os mais termo-quimicamente sensíveis (HENDRICKS e ZEEMAN, 2009; LEVAN *et al.*, 1990). As hemiceluloses presentes nas paredes das células vegetais atuam como um revestimento da fibra da celulose e tem sido proposto que, pelo menos, 50% da hemicelulose deve ser removida para se ter um aumento significativo na digestibilidade da celulose. No entanto, os parâmetros de severidade devem ser cuidadosamente otimizados para evitar a formação de produtos de degradação da hemicelulose como furfural e hidroximetilfurfural, que são conhecidos por inibir o processo de fermentação dos açúcares (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a,b).

2.3.1.3 Lignina

A lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza. Está presente na parede celular dos vegetais e confere rigidez, impermeabilidade, resistência ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo. A lignina é um heteropolímero amorfo composto de unidades fenil-propano (alcóois p-coumaril, coniferil e sinapil) mantidos juntos por diferentes ligações (HENDRICKS e ZEEMAN, 2009). A Figura 2.9 apresenta uma parte da estrutura da lignina. A principal função da lignina é de “manter unidos” os diferentes componentes da biomassa lignocelulósica, tornando-se assim insolúvel em água. Por causa de sua estreita associação com as microfibras de celulose, a lignina tem sido identificada como a principal barreira para a hidrólise enzimática e microbiana da biomassa lignocelulósica (AVGERINOS e WANG, 1983). Chang e Holtzapple (2000) mostraram que a digestibilidade da biomassa melhora com o aumento da remoção da lignina. Além de ser uma barreira física, os efeitos prejudiciais da lignina incluem: i) adsorção não-específica da lignina às enzimas hidrolíticas; ii) interferência da ligação entre as enzimas celulolíticas e o complexo de carboidratos da lignina, que prejudica a produtividade da hidrólise da celulose, e iii) a toxicidade dos derivados da lignina para os micro-organismos.

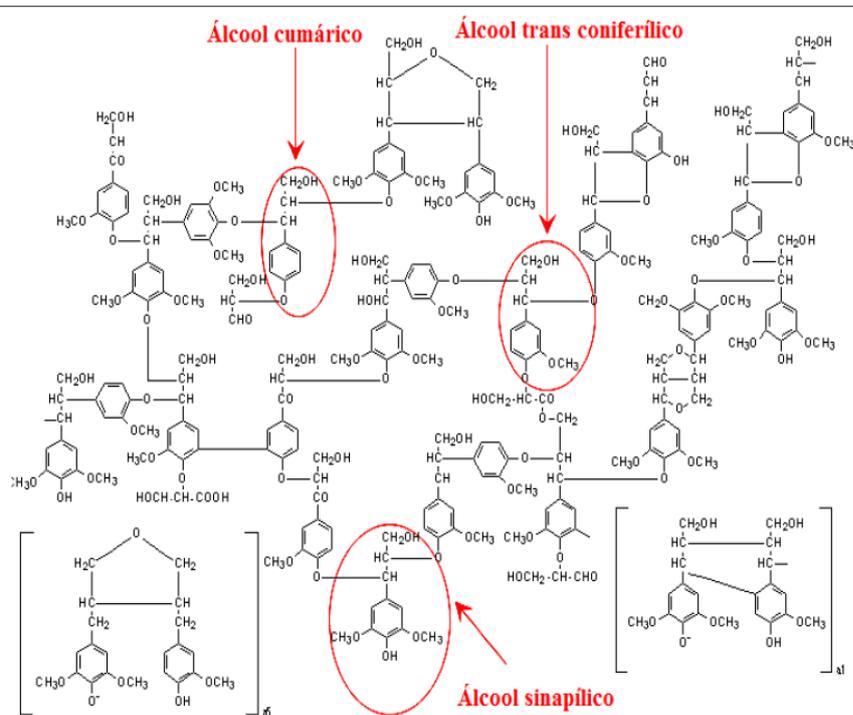


Figura 2.9 - Estrutura molecular da lignina
Fonte: AGUIAR, 2010

Diferentes matérias-primas contêm diferentes quantidades de lignina, que deve ser removida por meio de algum pré-tratamento para melhorar a digestibilidade da biomassa. Acredita-se que, durante o pré-tratamento, a lignina se separa da estrutura da biomassa. Após o resfriamento da biomassa pré-tratada, a lignina precipita, podendo ser removida do meio (BROWNELL e SADDLER, 1987; CONVERSE, 1993; LYND *et al.*, 2002). A deslignificação (extração da lignina por produtos químicos) promove a abertura da fibra da biomassa, a ruptura da estrutura da lignina, o aumento da área superficial interna e o aumento da acessibilidade das enzimas celulolíticas às fibras de celulose. Embora nem todos os pré-tratamentos resultem em uma deslignificação substancial, a estrutura da lignina pode ser alterada sem a sua extração, devido às alterações nas propriedades químicas da lignina. A digestibilidade da biomassa pré-tratada aumenta comparando-se com a biomassa *in natura*, embora se tenha aproximadamente o mesmo conteúdo de lignina da biomassa não-tratada.

2.3.1.4 Cinzas

As cinzas, em amostras vegetais, representam basicamente os minerais presentes na amostra, apesar de também poderem consistir em resíduos de produtos usados durante o preparo da amostra, em materiais metálicos com os quais ela entrou em contato, nos minerais da própria amostra, ou em substâncias adicionadas propositalmente, o que permite, por exemplo, o uso do seu teor como uma predição para a contaminação com areia ou solo.

As cinzas presentes na biomassa podem trazer problemas ao pré-tratamento, pois, além de diminuir o potencial energético da matéria-prima para o processo de fermentação, acarreta em um aumento na capacidade tamponante da matéria-prima, levando a uma neutralização parcial dos catalisadores ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa. Além disso, uma alta quantidade de cinzas pode causar maior abrasão e corrosão aos equipamentos do processo (PITARELO, 2007)

2.3.1.5 Extrativos

Os extrativos são definidos como compostos que podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, que não são componentes estruturais da parede celular. Nessa categoria, incluem-se vários compostos de baixa ou de média massa molecular, incluindo uma grande variedade de moléculas, como: alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água); ácidos ou ésteres graxos; álcoois de cadeia longa; ceras; resinas; esteróides; e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos).

Os extrativos podem variar quantitativa ou qualitativamente, oscilando, em materiais provenientes de madeiras, de 2% a 5%, podendo alcançar níveis de 15% em algumas espécies tropicais. Suas principais funções fisiológicas incluem o acúmulo de nutrientes e a preservação da madeira contra ataques de bactérias, fungos e cupins, e contra a formação de cor e de aromas.

É extremamente importante a remoção destes compostos para que se tenha uma boa caracterização da biomassa. Estes compostos interferem nos processos analíticos de determinação das frações mássicas de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa (SLUITER, 2008b).

2.4 Bioconversão dos materiais lignocelulósicos

A bioconversão de celulose e de hemicelulose em monômeros de açúcares para a produção de etanol é um processo mais complexo do que os processos utilizados a partir do amido e do caldo de cana-de-açúcar. Existem diversas opções para o processo de etanol lignocelulósico, porém, independente da escolha do processo, as seguintes características devem ser atendidas (BALLAT *et al.*, 2008):

- a. Despolimerização eficiente da celulose e da hemicelulose a açúcares solúveis;
- b. Fermentação eficiente de uma solução contendo diversos tipos de açúcares (pentoses - açúcares com 5 átomos de carbono - e hexoses - açúcares com 6 átomos de carbono), além de conter compostos inibitórios à fermentação;

- c. Uma integração avançada do processo para minimizar sua demanda energética;
- d. Uma baixa fração de lignina na carga promove um baixo custo de produção do etanol.

Uma das vantagens da bioconversão de materiais lignocelulósicos é a possibilidade de criação de uma biorrefinaria, produzindo, além de etanol, produtos de alto valor agregado. Os açúcares obtidos neste processo podem ser fermentados em condições aeróbicas e anaeróbicas, produzindo uma variedade de outros produtos (BALLAT *et al.*, 2008).

O processamento de um material lignocelulósico em bioetanol consiste de quatro grandes operações: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/destilação de produto. A Figura 2.10 mostra um diagrama da bioconversão da biomassa em etanol (BALLAT *et al.*, 2008).

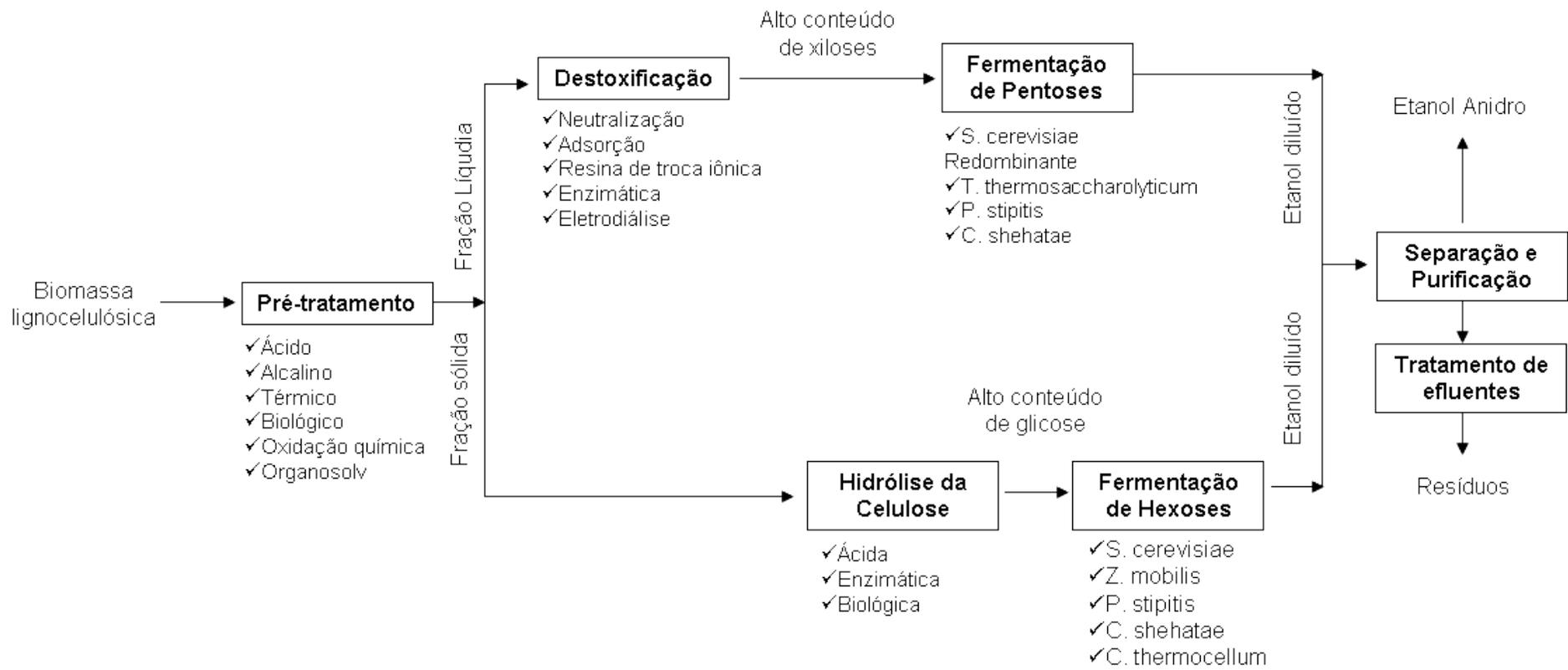


Figura 2.10 - Diagrama de bioconversão da biomassa em etanol
 Fonte: adaptado de CORDONA, 2010

2.4.1 Processos de pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para a sua conversão biológica a etanol. Em vez disso, contêm polissacarídeos, tais como celulose e hemicelulose, que devem ser hidrolisados para a formação de açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática é um caminho promissor para a obtenção de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos, mas a baixa acessibilidade enzimática da celulose nativa é um problema para o processo de obtenção de etanol a partir desta biomassa (CORDONA *et al.*, 2010). A celulose das plantas está intimamente associada com as hemiceluloses e a lignina. A lignina é parcialmente associada à hemicelulose, evitando assim o acesso de agentes hidrolíticos à celulose. Além disso, a estrutura cristalina da celulose em si representa um obstáculo adicional para a hidrólise. Um pré-tratamento é necessário para a remoção de lignina e de hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade do material (KELLER *et al.*, 2003). Isto aumenta a susceptibilidade enzimática da celulose. Um pré-tratamento eficaz deve preservar as características da hemicelulose e evitar a formação de inibidores (LASER *et al.*, 2002). Para ter um processo economicamente viável, o pré-tratamento deve utilizar produtos químicos de baixo custo e equipamentos e procedimentos simples (MARTÍN *et al.*, 2007).

Existem diversos processos de pré-tratamento da biomassa. Durante as últimas décadas, diversas tecnologias foram sugeridas e investigadas.

2.4.1.1 Moagem ou fragmentação da biomassa

Este tipo de pré-tratamento é usado para diminuir o tamanho de partícula e a cristalinidade do material, aumentando a área superficial específica e reduzindo o grau de polimerização (SUN e CHENG, 2002). Existem referências na literatura comparando a eficiência de processos de moagem (HIDENO *et al.*, 2009) e a integração em outros processos (BUABAN *et al.*, 2010). Porém, por ser um processo com um alto consumo de energia e não apresentar uma boa eficiência comparada com outros processos (tratamento ácido, por exemplo, ZHU *et al.*, 2010), este processo não é muito utilizado.

2.4.1.2 Extrusão

É um processo onde o material é submetido a altas temperaturas e a um processo muito efetivo de mistura e cisalhamento, resultando em modificações químicas e físicas nas fibras do material. Isto provoca uma ruptura na estrutura lignocelulósica, causando uma desfibrilação do material e aumentando a acessibilidade dos carboidratos ao ataque enzimático (KARUNANITHY *et al.*, 2008a,b). Por estes motivos, a extrusão é uma opção interessante no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Recentemente, este processo foi avaliado para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática de “switchgrass” (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010a), palha de milho (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010b), farelo de trigo e casa de soja (LAMSAL *et al.*, 2010).

2.4.1.3 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento utilizando alguns álcalis aumenta a digestibilidade da celulose e é mais efetivo na solubilização da lignina, exibindo um menor efeito sobre a celulose e a hemicelulose que os processos ácidos e hidrotérmicos (CARVALHEIRO *et al.*, 2008). Está descrito na literatura que este processo causa uma menor degradação dos açúcares que o pré-tratamento ácido e é mais efetivo para resíduos agrícolas do que para madeira (KUMAR *et al.*, 2009). Entretanto, comparado com outros processos, o pré-tratamento alcalino promove perdas consideráveis de açúcares fermentáveis e ainda produz alguns compostos inibidores. Alguns estudos reportam o aumento da superfície interna da celulose, decréscimo do grau de polimerização e cristalinidade (TAHERZADEH e KARIMI, 2008) e aumento da digestibilidade através da remoção de lignina (KUMAR *et al.*, 2009; NLEWEM e THRASH, 2010)

2.4.1.4 Organosolv

Este processo consiste em empregar um solvente orgânico (metanol, etanol, acetona, etileno, glicerol, entre outros) cuja função é extrair a lignina e aumentar a

acessibilidade à celulose. A adição de ácidos, como ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), oxálico ou salicílico, ao solvente aumenta a taxa de deslignificação e o rendimento de xiloses (ZHAO *et al.*, 2009). Apesar destas vantagens, é relatado que o emprego de solventes orgânicos aumenta a quantidade de inibidores e de fenóis provenientes da lignina (GÍRIO *et al.*, 2010; ZHU e PAN, 2010).

Para reduzir os custos, esses solventes devem ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados. Essa remoção se faz necessária, pois os mesmos podem ser inibitórios ao processo de hidrólise enzimática e ao crescimento dos micro-organismos na posterior fermentação (SUN e CHENG, 2002).

2.4.1.5 Ozonólise

O ozônio é um agente oxidante que apresenta uma alta eficiência de deslignificação (SHATALOV, 2008), tendo seu efeito limitado à remoção da lignina. Seu efeito sobre a hemicelulose é muito baixo e sobre a celulose é quase nulo. Desta forma, a degradação dos componentes da hemicelulose e da celulose é muito baixa. Entretanto, o ozônio pode reagir com a base aromática da lignina, gerando outros produtos de degradação.

Alguns estudos têm utilizado o ozônio para pré-tratar biomassa, como palha de trigo e de centeio (GARCÍA-CUBERO *et al.*, 2009), palha de algodão (SILVERSTEIN *et al.*, 2007) e bagaço (KUMAR *et al.*, 2009).

2.4.1.6 Oxidação úmida (Wet Oxidation)

A oxidação úmida (WO) é um processo de tratamento que utiliza água e ar ou oxigênio em temperaturas acima de 120°C. É conhecido que este processo é eficiente para a solubilização de hemicelulose e de lignina. Entretanto, não ocorre a hidrólise da hemicelulose solúvel. Portanto, não há a obtenção dos monômeros dos açúcares, mas sim de oligômeros (KLINKE *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a adição de compostos alcalinos a este processo reduz a formação de inibidores, como furaldeídos tóxicos e aldeídos fenólicos (KLINKE *et al.*, 2002). Este processo está sendo avaliado para a produção de etanol a partir da palha de milho

(PALONEM *et al.*, 2004; VARGA *et al.*, 2004), de trevos de azevém (MARTIN *et al.*, 2008) e da polpa da azeitona (HAAGENSEN *et al.*, 2009).

2.4.1.7 *Liquid hot water* (Água quente)

É um processo hidrotérmico que utiliza água a pressões altas, para mantê-la no estado líquido, e a elevadas temperaturas (160-240°C), provocando alterações na estrutura lignocelulósica. Durante o processo, a maior parte da hemicelulose é solubilizada, fazendo com que a celulose fique mais acessível. A celulose e a lignina não são significativamente afetadas e permanecem na fase sólida (CARA *et al.*, 2007). A hemicelulose solúvel permanece na forma de oligômeros e a formação de monômeros é mínima (MOSIER *et al.*, 2005). A literatura mostra que este processo alcança uma remoção superior a 80% da hemicelulose e aumenta a digestibilidade enzimática do material pré-tratado de algumas matérias-primas, tais como palha de milho (MOSIER *et al.*, 2001), bagaço de cana-de-açúcar (LASER *et al.*, 2002) e palha de trigo (PÉREZ *et al.*, 2007 e 2008).

2.4.1.8 AFEX (Ammonia Fiber Explosion)

No processo AFEX, a biomassa é tratada com amônia anidra líquida a temperaturas entre 60 e 100°C e altas pressões por períodos de tempo variáveis. Após a reação, ocorre a despressurização do sistema e a vaporização da amônia, o que permite a recuperação da mesma e seu reciclo. A amônia causa a desestruturação da fibra da biomassa, diminui o grau de cristalinidade da celulose e a quebra das ligações lignina-carboidratos (CHUNDAWAT *et al.*, 2007; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005). Não há solubilização e hidrólise significativa da hemicelulose, necessitando de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas na etapa de hidrólise enzimática.

Alguns estudos já investigaram e demonstraram a efetividade deste processo com resíduos agrícolas e herbáceos (WYMAN *et al.*, 2005a) e com madeira (BALAN *et al.*, 2009; BALS *et al.*, 2011). Em condições otimizadas, pode

alcançar mais de 90% de conversão de celulose e de hemicelulose a açúcares fermentáveis (WYMAN *et al.*, 2005b)

2.4.1.9 Explosão a vapor

A explosão a vapor, também chamada de auto-hidrólise, é uma tecnologia de compressão e rápida descompressão. A sua operação funciona através da impregnação do material lignocelulósico em água, num sistema de alta pressão (7-50 atm) e temperatura (160 a 190°C) (SUN e CHENG, 2002). Depois disso, a pressão é aliviada repentinamente. Esta mudança provoca uma explosão violenta, resultando na ruptura das ligações estruturais do material lignocelulósico (NEGRO *et al.*, 2003). Os produtos gerados neste processo são um material sólido úmido (o complexo lignocelulósico desorganizado, chamado de celulignina) e uma fase líquida extraível por explosão, composto por xilose, xilo-oligossacrídeos e os ácidos urônico e acético.

A explosão a vapor é uma operação de grande conhecimento no setor sucroalcooleiro brasileiro, que a utiliza para aumentar a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar para consumo na alimentação animal. Desta forma, a adoção desta tecnologia de pré-tratamento para a produção de etanol de segunda geração seria facilmente incorporada por este setor industrial.

Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados envolvendo o uso de agentes químicos, com o objetivo de aumentar a eficiência do processo de explosão a vapor. Neste caso, a denominação de "explosão a vapor catalisada" tem sido utilizada. Os principais agentes químicos utilizados são: ácido sulfúrico, com uma concentração variando entre 0,1 e 5% v/v, e anidrido sulfuroso, que, em solução, se transforma em ácido sulfúrico. Quando se utiliza o ácido sulfúrico, previamente à explosão de vapor, o material é embebido na solução ácida. É após esta fase que o processo de explosão a vapor é realizado. No caso da utilização de anidrido sulfuroso, uma corrente rica deste gás é introduzida na fase vapor. Em ambos os casos, o intervalo de temperatura e tempo de exposição não são diferentes do processo convencional (sem utilização de agentes químicos) (LYND, 1996; OGIER *et al.*, 1999; HAMELINCK *et al.*, 2005).

Na tecnologia de vapor de explosão, a recuperação das pentoses no fluxo de líquido ocorre no intervalo de 45 a 65%, e quando catalisada, ela aumenta para 80-90%. A retenção da celulose na fração de sólidos, em ambos os casos, é superior a 90% da estrutura original.

2.4.1.10 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido consiste em empregar um ácido para promover a hidrólise da fração hemicelulose, remover a lignina e expor a celulose para uma melhor ação das enzimas. Este tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácido diluído ou concentrado. Este último é menos efetivo para a produção de etanol por causa da alta formação de compostos inibidores, por provocar problemas de corrosão e pela impossibilidade de recuperação do ácido. Portanto, a utilização de ácido diluído é preferida. Pode ser realizado em altas temperaturas, utilizando baixos tempos de residência, ou em baixas temperaturas, utilizando altos tempos reacionais. Possui a vantagem de solubilizar a hemicelulose, principalmente as xilanas, mas também converte a hemicelulose solúvel em açúcares fermentáveis, evitando a adição de enzimas hemicelulolíticas ao processo de hidrólise enzimática. Altos rendimentos de açúcares decorrentes da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos pré-tratados com ácido diluído têm sido reportados na literatura. Apesar do H_2SO_4 ser o ácido mais empregado em estudos deste processo (SAHA *et al.*, 2005; CARA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; ROCHA *et al.*, 2009), os ácidos clorídrico (HCl), fosfórico (H_3PO_4) e nítrico (HNO_3) também têm sido testados (MOSIER *et al.*, 2005). Ácidos orgânicos, como os ácidos maléico, furâmico e acético, também têm sido investigados (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

Altos rendimentos de hidrólise têm sido reportados utilizando o pré-tratamento ácido diluído. Saha *et al.* (2005) atingiram rendimentos superiores a 74% nas reações de hidrólise enzimática utilizando palha de trigo como biomassa. Rendimentos de 76,5% na hidrólise enzimática foram obtidos no trabalho de Cara *et al.* (2008) utilizando biomassa proveniente de oliveiras.

Por ser um dos processos que possui alta efetividade no aumento da digestibilidade da biomassa frente à ação enzimática (aumento da área superficial) e na solubilização e conversão da hemicelulose, além de promover uma considerável

remoção de lignina (Alvira *et al.*, 2010), o pré-tratamento ácido é um processo preferido por muitos pesquisadores. Outros fatores para esta predileção é a alta produtividade de etanol e o baixo custo, se comparado a outros processos. Sua grande desvantagem é a alta geração de compostos tóxicos (inibidores) para o processo de hidrólise enzimática e para a fermentação.

2.4.2 Processos de hidrólise enzimática

A hidrólise da celulose pode ser realizada através de um processo químico ou enzimático. O primeiro, de maior conhecimento, é executado em condições estabelecidas de temperatura (pressão), tempo de exposição, tipo e concentração de ácido e razão sólido:líquido (RSL). A opção pela hidrólise enzimática da celulose vem da utilização de condições bem mais brandas que as utilizadas na hidrólise química. Esta estratégia tecnológica difere da concepção de processos antigos, em que a hidrólise química de celulose e de hemicelulose era realizada em uma única etapa. Estes processos geravam hidrolisados com alta toxicidade, o que dificulta o metabolismo dos microrganismos utilizados nos processos fermentativos. Portanto, a hidrólise química da celulose foi abandonada e substituída pela hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas denominadas celulasas, que possuem uma alta especificidade para este processo. As celulasas são normalmente uma mistura de várias enzimas. Pelo menos, três grupos principais de celulasas estão envolvidas no processo de hidrólise: (1) endoglucanase (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4) que ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, criando finais de cadeia livres; (2) exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91) que degrada as moléculas removendo unidades de celobiose dos finais de cadeia livres; e (3) β -glucosidase (BG - EC 3.2.1.21), que hidrolisa a celobiose produzindo a glicose (COUGHLAN e LJUNGDAHL, 1988).

As celobiohidrolases são diferenciadas em dois tipos: as enzimas do tipo I (CBH I) hidrolisam os terminais redutores, enquanto as do tipo II (CBH II) hidrolizam terminais não-redutores. Estas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (AWAFO, 1997).

Além destes três principais grupos de enzimas, há também um número de enzimas auxiliares que atacam a hemicelulose, tais como acetilesterase, glucuronidase, xilanase, β -xilosidase, galactomananase e glucomananase (DUFF e MURRAY, 1996). Durante a hidrólise enzimática, a celulose é degradada pelas celulasas, produzindo açúcares redutores que podem ser fermentados por leveduras ou bactérias para produção de etanol.

Quando atuam em conjunto, as celulasas apresentam um melhor rendimento do que a soma dos efeitos individuais quando as mesmas atuam de maneira isolada. Tal fato é conhecido como sinergia. Existem pelo menos três formas de sinergia (LYND et. al., 2002.):

- Sinergia Endo-Exo: as endoglucanases, atuando nas regiões amorfas da fibra, produzindo terminais redutores e não-redutores para a ação da CBH I e CBH II, respectivamente;
- Sinergia Exo-Exo: a CBH I e CBH II agindo simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não-redutores produzidos pela ação das endoglucanases;
- Sinergia Exo-BG: as celobiohidrolases liberam a celobiose, que é o substrato para as β -glucosidases.

Vários fatores podem influenciar a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos e estes podem estar associados a características do substrato e ao comportamento das enzimas durante o processo de sacarificação. Em baixos níveis de substrato, o aumento da concentração de substrato, normalmente, resulta em um aumento do rendimento e da taxa de reação da hidrólise (CHEUNG e ANDERSON, 1997). No entanto, uma elevada concentração de substrato pode causar a inibição pelo substrato, o que reduz substancialmente a taxa de hidrólise. A extensão da inibição pelo substrato depende da razão substrato/enzima (HUANG e PENNER, 1991; PENNER e LIAW, 1994). A susceptibilidade dos substratos às celulasas depende das características estruturais do substrato incluindo a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, área superficial e o conteúdo de lignina. A lignina interfere na hidrólise através do bloqueio do acesso das celulasas à celulose e através de sua ligação irreversível com as enzimas. Portanto, a remoção de lignina pode aumentar dramaticamente a velocidade de hidrólise (MCMILLAN, 1994).

Os fatores associados às enzimas envolvem a inibição pelos produtos da hidrólise enzimática (glucose e celobiose) (LASER *et al.*, 2002; CANTARELLA *et al.*, 2004), à desnaturação térmica das enzimas por longos tempos reacionais e à desativação da enzima por conta dos efeitos da agitação mecânica (cisalhamento) (LAUREANO *et al.*, 2005).

Alguns métodos de pré-tratamento descrito anteriormente têm sido avaliados em conjunto com a hidrólise enzimática (sacarificação). Entre eles, estão pré-tratamento ácido (SCHELL *et al.*, 2003), o pré-tratamento alcalino (HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009), explosão a vapor (SENDELIUS, 2005; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009) e a oxidação química (MARTÍN *et al.*, 2007a).

2.4.3 Processo de fermentação

O material hidrolisado obtido nos processos de pré-tratamento e de hidrólise enzimática é utilizado no processo de fermentação. Tal processo utiliza micro-organismos que utilizam os açúcares como substrato para a produção de bioetanol e outros sub-produtos. Pelo fato dos hidrolisados não conterem apenas glicose, mas também, outros monossacarídeos, como xilose, manose, galactose e arabinose, e oligossacarídeos, estes micro-organismos devem ser capazes de fermentar de maneira eficiente todos estes açúcares para ter sucesso no processo de produção de bioetanol (KONDO *et al.*, 2006). De acordo com a estequiometria das reações, o máximo rendimento teórico é 0,51kg de bioetanol e 0,49kg de dióxido de carbono por quilograma de xilose e glicose (HAMELINCK *et al.*, 2005). As equações de transformação de xilose e glicose em etanol (Equações 1 e 2) estão representadas a seguir:



Um dos mais efetivos micro-organismos utilizados na fermentação para a produção de etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura possui diversas vantagens, como a alta produção de etanol a partir de hexoses e alta tolerância à

presença de bioetanol e aos compostos inibitórios produzidos no pré-tratamento da biomassa. Entretanto, pelo fato deste micro-organismo não ser capaz de fermentar as pentoses, a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* é inadequada (KONDO *et al.*, 2006). Para viabilizar sua utilização, são necessários estudos de engenharia genética para inclusão da capacidade de conversão das xiloses no metabolismo da levedura (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2006). Micro-organismos como a *Escherichia coli*, a *Klebsiella oxytoca* e a *Zymomonas mobilis* estão sendo estudados para realizar tal feito (DIEN *et al.*, 2003).

2.4.4 Estratégias para a produção do etanol

A transformação dos materiais lignocelulósicos para a produção de etanol tem sido estudada utilizando diferentes estratégias. Devido à presença de açúcares diferentes, muitas vezes o multiprocessamento é necessário, ou seja, a utilização de enzimas simultaneamente com a ação dos micro-organismos. Ou ainda a utilização de diferentes microrganismos em estágios sucessivos ou de microrganismos recombinantes para a utilização de todos os açúcares disponíveis (substratos). Neste sentido, quatro estratégias são concebidas, cada uma em uma fase de desenvolvimento diferente.

- Hidrólise e fermentação separadas (SHF): É a concepção mais antiga, no qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da matéria-prima para a solubilização de hemicelulose, ocorre em uma etapa separada do processo de fermentação. Esta estratégia está em desuso devido à baixa eficiência da hidrólise enzimática da celulose quando esta etapa é realizada separada da etapa de fermentação da glicose, devido à inibição da enzima pela formação de glicose e celobiose (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2006).
- Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF): Como o nome indica, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação ocorrem em uma mesma etapa. A fração de hemicelulose é hidrolisada e fermentada em um estágio separado, bem como a produção de enzimas. Esta foi

uma alternativa que foi desenvolvida para resolver os problemas de inibição pelos produtos da hidrólise, objetivando o aumento da extensão da reação de hidrólise. Para atingir este objetivo, a estratégia consiste em acoplar a reação enzimática ao processo fermentativo, uma vez que o micro-organismo consome os açúcares, diminuindo suas concentrações no meio reacional. Entretanto, as condições ótimas de funcionamento para uma hidrólise enzimática eficiente não são necessariamente as mesmas da fermentação. Em relação a este aspecto, os esforços têm sido feitos no sentido da produção de enzimas que atuem em temperaturas e valores de pH próximos aos do processo de fermentação (DIEN *et al.*, 2003).

– Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF): Este processo envolve três fases, das quais a hidrólise da hemicelulose e a produção de celulasas ainda são realizadas em etapas separadas. De acordo com esta concepção, o fluxo de líquido rico em pentoses, obtido após o pré-tratamento, permanece no meio no qual as celulasas são adicionadas, seguindo para a fermentação com um micro-organismo recombinante (capaz de fermentar pentoses e hexoses). A principal vantagem desta estratégia reside no fato de que apenas um reator é usado para a produção de etanol (WINGREN *et al.*, 2003).

– Bio-processo consolidado (CBP): é a concepção de processo mais avançada, onde todas, ou pelo menos três das fases, podem ser realizadas no mesmo equipamento. No CBP, o etanol e todas as enzimas necessárias são produzidos no mesmo bio-reator. Com as ferramentas modernas da Biologia Molecular, é extremamente interessante se ter um microrganismo capaz de realizar diversas atividades, no caso, produzir as enzimas xilanases e celulasas necessárias para hidrólise enzimática e fermentar de maneira eficiente pentoses ou hexoses geradas no processo. Este processo parece ser o ponto final lógico da evolução das tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósicas, no qual a Biologia Molecular desempenhará papel importante neste desenvolvimento (WINGREN *et al.*, 2003).

2.4.5 Efeitos inibitórios no processo de produção de etanol lignocelulósico

As celulasas sofrem inibição pelos próprios produtos da hidrólise enzimática (a celobiose e, em menor proporção, a glicose). Vários métodos têm sido desenvolvidos para reduzir tal inibição, incluindo a utilização de altas concentrações de enzimas, a suplementação de β -glicosidases durante a hidrólise, a remoção de açúcares durante a hidrólise por ultra-filtração ou a utilização de estratégias distintas de hidrólise e fermentação, como a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (SUN e CHENG, 2002).

Em comparação com o processo de hidrólise e fermentação em duas etapas (SHF), o SSF tem as seguintes vantagens: (1) aumento da taxa de hidrólise pela conversão de açúcares que inibem a atividade da celulase, (2) menor necessidade de enzima, (3) rendimentos mais elevados de produto; (4) requisitos mais baixos para condições estéreis, uma vez que a glicose é transformada rapidamente em etanol após a sua produção, (5) menor tempo de processo e (6) um volume reacional menor, pois apenas um reator será utilizado. No entanto, o etanol também pode inibir a ação da celulase no processo SSF. Wu e Lee (1997) verificaram que a celulase perde 9%, 36% e 64% da sua atividade original com concentrações de etanol de 9, 35 e 60g/L, respectivamente, a 38 °C durante o processo SSF. As desvantagens deste processo também incluem a temperatura incompatível dos processos de hidrólise e de fermentação, ou seja, a temperatura ótima para o processo de hidrólise não é a mesma para o processo de fermentação.

Os processos de pré-tratamento também produzem compostos inibitórios, como o furfural, o hidróxi-metil-furfural (HMF), ácidos carboxílicos (como o ácido acético) e compostos fenólicos. A produção destas substâncias é mais susceptível em processos que utilizam ácidos no pré-tratamento. Verificou-se que a quantidade de furfural aumentam com a concentração dos catalisadores ácidos tais como H_2SO_4 (PATTRA *et al.*, 2008). Estes compostos são conhecidos por afetar o desempenho da fermentação. O furfural, gerado a partir da degradação das pentoses, quando presente em altas concentrações, promove um efeito inibitório nas enzimas celulolíticas e provoca um aumento na fase lag, reduzindo a produtividade de etanol (ALMEIDA *et al.*, 2007; KLINKE *et al.*, 2004) Os ácidos carboxílicos podem se difundir através da membrana celular e se dissociar dentro da célula. Isto provoca o aumento do pH intracelular, a acidificação do citoplasma e, conseqüentemente,

ocorre morte celular (ALMEIDA *et al.*, 2007; KEATING *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos são tóxicos, pois afetam a integridade da membrana dos micro-organismos (ALMEIDA *et al.*, 2007).

2.5 Produção de etanol a partir dos resíduos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das principais fontes alternativas de energia no Brasil, sendo a principal matéria-prima para a produção de bioetanol. A prova disso é que o setor sucroalcooleiro é responsável por 1,6% do PIB brasileiro (dados de 2010 – FNS, 2012).

A cana-de-açúcar é constituída por três componentes que possuem um grande potencial energético (o caldo, o bagaço e o palhiço – ou palha). Tradicionalmente, apenas o caldo da cana era utilizado para a produção de etanol, por possuir em sua composição açúcares que já estão disponíveis para a fermentação.

A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare, sendo que para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca, ou seja, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço. Tradicionalmente, a maior parte do bagaço é queimada em caldeiras nas usinas para a geração de energia elétrica. Entretanto, existe um excedente de bagaço nas usinas. A melhoria da eficiência de queima do bagaço também tem gerado uma menor demanda deste material para este fim (SANTOS *et al.*, 2012).

A palha, normalmente, é queimada (nos canaviais que utilizam o processo de colheita com queima prévia). Atualmente, a queima dos canaviais antes da colheita é uma prática amplamente adotada em todas as regiões canavieiras do Brasil e tem como objetivo principal facilitar as operações de corte, carregamento e transporte da cana-de-açúcar. No entanto, devido aos problemas ambientais que tal prática ocasiona, existe uma forte pressão social para que a agroindústria sucroalcooleira venha abolir esta prática, passando a utilizar a colheita da cana crua (SANTOS *et al.*, 2012). Neste tipo de colheita, a palha da cana-de-açúcar é deixada quase intacta sobre a superfície do solo quando colhida manualmente ou, então, é triturada, caso a colheita seja feita mecanicamente. O Decreto Federal n. 2.661/98

estabeleceu o fim gradativo da queima da cana-de-açúcar para os próximos 20 anos, o que acarretará em um aumento na disponibilidade de palha para ser recuperada e, posteriormente, utilizada como nova fonte de biomassa para produção de etanol celulósico (SANTOS *et al.*, 2012).

Com o desenvolvimento das tecnologias de produção a partir de materiais lignocelulósicos e o aumento da disponibilidade desta matéria-prima, diversos estudos de produção de bioetanol, principalmente a partir de bagaço de cana-de-açúcar, têm sido realizados. O bagaço consiste em, aproximadamente, 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Por possuir uma baixa fração de cinzas (em torno de 2,4%) comparado a outras biomassas e por ser um resíduo já presente nas usinas de etanol que utilizam cana-de-açúcar como matéria-prima, o bagaço possui inúmeras vantagens para uso em processos de bio-conversão e, normalmente, é a matéria-prima preferida, principalmente no Brasil (CARDONA *et al.*, 2010)

A palha da cana-de-açúcar também é constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina (aproximadamente 40, 30 e 25%, respectivamente). Trabalhos realizados por Santos *et al.* (2012) com a palha de cana *in natura* mostraram que o material apresenta 38% de celulose, 29% de hemicelulose e 24% de lignina. Adicionalmente, eles ainda verificaram que a palha de cana apresenta uma quantidade de cinzas entre duas a quatro vezes maior do que o bagaço de cana, variando em função do local de coleta do material, condições climáticas, estágio de desenvolvimento vegetativo e cultivo.

Mesmo tendo uma alta fração de cinzas (comparado com o bagaço), é perceptível que a palha tem um grande potencial para a produção de bioetanol, uma vez que a quantidade de polissacarídeos que ela possui é muito similar à quantidade presente no bagaço. Considerando que toda glicose vai ser convertida em etanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (colmo, palha e bagaço) poderá aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, passando dos atuais 7.000 litros para aproximadamente 14.000 litros, sem necessidade de expansão da área cultivada (SANTOS *et al.*, 2011). A Figura 2.11 demonstra este ganho potencial. A palha de cana-de-açúcar representa 15% do peso dos colmos da cana madura, ou 12% quando seca (SANTOS, *et al.* 2012). Em termos energéticos, a palha representa 1/3 da energia potencial da cana-de-açúcar que, atualmente, é subaproveitada (SANTOS *et al.*, 2011).

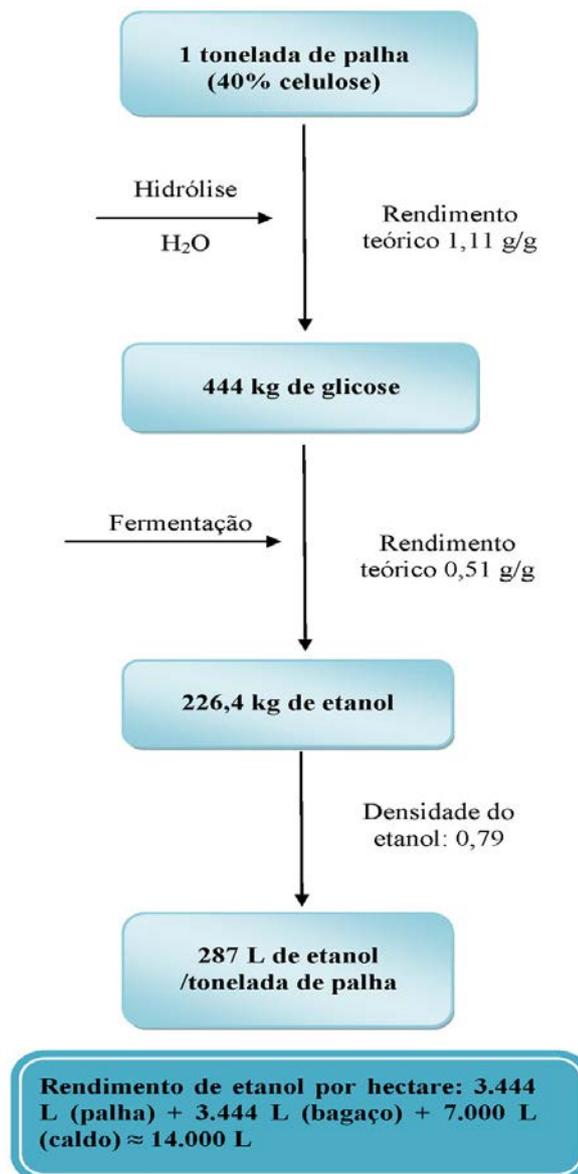


Figura 2.11 - Potencial de produção de etanol a partir da palha de cana-de-açúcar
 Fonte: SANTOS *et al.*, 2012

Diversos estudos foram e estão sendo realizados para avaliar o potencial de produção de etanol utilizando bagaço e palha de cana-de-açúcar, dentre outros materiais lignocelulósicos, empregando diferentes processos de pré-tratamento, tipos de enzimas e estratégias de hidrólise e fermentação. Na Tabela 2.6 estão sumarizados alguns estudos realizados utilizando materiais lignocelulósicos para a produção de etanol.

Tabela 2.6 - Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

		Pré-tratamento					Hidrólise Enzimática						
Material	Tipo	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (min)	Catalisador	Xilose	Carga Enzimática	Atividade Enzimática (FPU/ml)	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (h)	Glicose	Referência
Álamo	Explosão a vapor	210	10	4	-	>99% solubilizada	-	15	50	6	72	>95% solubilizada	Negro et al., 2003
Bagaço de cana-de-açúcar	Explosão a vapor	170-230	>50%	1-46	-	>99% solubilizada	15 FPU/g	-	45	20	72	98% solubilizada	Laser et al., 2002
	Liquid Hot Water	170-230	1-8%	1-46	-	>99% solubilizada	15 FPU/g	-	45	20	72	>99% solubilizada	Laser et al., 2002
	Ácido Diluído	121	1:15	60	0,25-7% H ₂ SO ₄	6,7-11,3g/l	-	-	-	-	-	6,7-11 g/l	Pattra et al. 2008
	Ácido Diluído	121	10	120	1,25% H ₂ SO ₄	63,5g/l	-	-	-	-	-	-	Cheng et al., 2008
	Ácido Diluído	121	1:5 - 1:15	240	1,2% HCl	-	-	-	-	-	-	> 35% de recuperação (açúcares totais)	Hernández-Salas et al., 2009

Tabela 2.6 - Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (cont.)

		Pré-tratamento					Hidrólise Enzimática						
Material	Tipo	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (min)	Catalisador	Xilose	Carga Enzimática	Atividade Enzimática (FPU/ml)	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (h)	Glicose	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Alcalino	121	1-15	240	NaOH (2% m/v)	-	20% m/m de enzima por g de bagaço	Enzimas Variadas	55	6	240	> 54% de recuperação (açúcares totais)	Hernández-Salas et al., 2009
	Moagem	-	-	-	-	72,1% solubilizada	15 FPU/g	Enzimas Variadas	45	5	72	78,7% solubilizada	Silva et a., 2010
	Ácido Diluído	190	1.5:10 e 1:10	10	1% H ₂ SO ₄ e 1% ácido acético	>90% solubilizada	2,84g/g de sólidos secos	65-376 FPU/ml	-	-	72	> 76% de recuperação de glicose	Rocha et al., 2011.
Bagaço de cashew apple	Ácido Diluído e Alcalino	121	30%	15 / 30	0,8mol/l H ₂ SO ₄ e 4% NaOH m/v	-	15-30 FPU/g	110	30 / 37 / 45	2-16	72	730 mg/g por g de biomassa	Rocha et al., 2009.
Biomassas herbáceas	Liquid Hot Water	200-230	-	15	-	100% solubilizada	-	-	-	-	-	4-22% solubilizada	Mok e Antal Jr, 1992
Douglásia	Impregnação ácida / Explosão a vapor	60 / 215	40%	360 / 2,5	0,35% H ₂ SO ₄	15,6g/l	7-36 FPU/g	91-198	45	7-18	72	> 89% de recuperação de glicose	Schell et al., 2000.

Tabela 2.6 - Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (cont.)

		Pré-tratamento					Hidrólise Enzimática						
Material	Tipo	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (min)	Catalisador	Xilose	Carga Enzimática	Atividade Enzimática (FPU/ml)	Temperatura (°C)	Teor de sólidos (%)	Tempo (h)	Glicose	Referência
Fibra de alfafa	Liquid Hot Water	220	5%	2	-	>60% solubilizada	2% v/v de enzima	-	50	10	72	>40% solubilizada	Koegel et al., 1999.
Folhagens da cana-de-açúcar	Ácido Diluído	121	5-30	30-90	1-5% H ₂ SO ₄	-	20-80 FPU/g	-	50	7,5-15	24-60	0,685g/g de biomassa (açúcares totais)	Sindhu et al., 2011
Folhas da cana-de-açúcar	Ácido Diluído	121	6	30	1,5% H ₂ SO ₄	0,28g/g de biomassa	160FPU/g	265	50	-	6	20,2g/l (açúcares totais)	Jutakanoke et al., 2012
Palha de cana-de-açúcar	Moagem	-	-	-	-	56,8% solubilizada	15 FPU/g	Enzimas Variadas	45	5	72	77,6% solubilizada	Silva et a., 2010
Palha de trigo	Ácido Diluído	121	7,8	30	0,75% H ₂ SO ₄	255mg/g por g de biomassa	-	-	45	-	72	272 mg/g por g de biomassa	Saha et al., 2005
Sabugo de milho	Ácido Diluído	106-108	10	360	1,5% H ₂ SO ₄	76,6% solubilizada	20FPU/g	-	50	8	48	81,2% solubilizada	Chen et al., 2009

Na Tabela 2.6 pode-se observar que existem diversos trabalhos utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol, porém, não existem muitos com foco no aproveitamento da palha. Por serem biomassas provenientes da mesma cultura, é interessante que um processo de produção de bioetanol que utilize o bagaço como matéria-prima também fosse capaz de processar a palha, aumentando a disponibilidade de matéria-prima e capacidade de produção de etanol da usina de 2ª geração. Sendo assim, se torna interessante o estudo do potencial de utilização da palha usando um processo de produção de etanol empregando bagaço, para permitir uma melhor comparação dos resultados obtidos para as duas biomassas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela Usina Guarani (SP). Ele apresentava umidade média de 50% m/m. O bagaço foi seco em estufa à 110°C por 24 horas, apresentando umidade média de 10% m/m. Posteriormente, ele foi fragmentado em um moinho centrífugo simples (Moinho Vieira - modelo MCS350). As partículas de bagaço ficaram com diâmetro inferior a 0,3mm. A Figura 3.1 apresenta o bagaço utilizado neste estudo.



Figura 3.1 - Bagaço de cana-de-açúcar utilizada no estudo.

A palha de cana-de-açúcar foi fornecida pela Usina Equipav (SP). A palha foi recebida previamente moída, com um tamanho de partícula em torno de 20mm e apresentava umidade média de 10% m/m. Para os testes que foram realizados em escala de laboratório para comparação com o bagaço, a palha sofreu o mesmo processo do bagaço (secagem e fragmentação). A secagem não diminuiu de forma significativa a umidade da palha. Para os testes realizados em piloto, a palha foi utilizada conforme fornecida pela usina. A Figura 3.2 apresenta a palha utilizada neste estudo.



Figura 3.2 - Palha de cana-de-açúcar utilizada no estudo.

3.2 Caracterização do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

3.2.1 Umidade

A determinação da umidade é um parâmetro importante nas reações de hidrólise ácida e enzimática. Como os materiais lignocelulósicos absorvem umidade, deve-se considerar a água presente no material para a determinação correta das relações sólido:líquido.

A análise da umidade é realizada de acordo com o procedimento determinado pelo Laboratory Analytical Procedure (LAP) do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER *et al.*, 2008a).

A umidade do material é determinada utilizando um analisador automático de umidade por infravermelho (Sartorius – modelo MA45). As análises são realizadas, no mínimo, em duplicata. Neste procedimento, o equipamento é aquecido à 105°C e estabilizado por 30 minutos. Uma quantidade de 1 a 5 gramas de amostra é introduzida ao equipamento, que procede com a análise até que se tenha a amostra seca a peso constante. O equipamento fornece o percentual de umidade em seu display.

3.2.2 Fração mássica de extrativos

Com a necessidade de realizar a caracterização química das biomassas, torna-se necessária a remoção de extrativos das amostras antes das análises, uma vez que esses são interferentes nesta caracterização.

A determinação da fração de extrativos é realizada de acordo com o procedimento determinado pelo Laboratory Analytical Procedure (LAP) do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER *et al.*, 2008b).

O processo é realizado através da extração destas substâncias utilizando um solvente (normalmente, água ou etanol). Este procedimento é realizado em um extrator automático (ASE – Dionex, modelo 200), utilizando pressão igual a 1500psi e temperatura igual a 100°C. O produto desta extração é uma solução de solvente contendo os extrativos da biomassa. Esta solução é levada a uma estufa a 40°C, onde ocorre a completa evaporação do solvente (peso constante). A fração de extrativos é calculado através da Equação 3, expresso em percentual em base seca:

$$\% \text{Extrativos} = \frac{\text{massa}_{\text{extrativos}} \text{ (g)}}{\frac{\text{massa}_{\text{amostra}} \text{ (g)} \times (100 - \% \text{umidade})}{100}} \times 100 \quad (3)$$

3.2.3 Fração mássica de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas – Método Klason

A caracterização da biomassa é realizada para determinar as quantidades de polissacarídeos disponíveis no material, assim como as frações de lignina (solúvel e insolúvel) e cinzas. Isto é extremamente importante para mensurar o potencial de produção de açúcares após os processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática e, conseqüentemente, o potencial de produção de etanol.

A caracterização de materiais lignocelulósicos é realizada de acordo com o procedimento determinado pelo Laboratory Analytical Procedure (LAP) do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER *et al.*, 2008c).

Para a caracterização, a biomassa foi fragmentada para se ter um tamanho de partícula entre 20 e 80 mesh, ideal para a caracterização. Após, deve-se efetuar a remoção dos extrativos da biomassa, pois os mesmos prejudicam a reprodutibilidade do ensaio. Para a remoção dos extrativos, consultar a seção 3.2.2.

Posteriormente, 300mg de biomassa foram hidrolisadas por 60 minutos a 40°C utilizando 3mL de solução de 72%*m/m* de H₂SO₄. Após a hidrólise, 84mL de água deionizada foram adicionadas ao meio, fazendo com que a concentração do ácido fique em 4% *m/m*. O recipiente contendo o meio é levado à autoclave (121°C) por 1 hora. A mistura reacional é filtrada através de sistema millipore e kitassato, contendo filtro de fibra de vidro. Parte do hidrolisado (fração líquida) é levada ao espectrofotômetro para medida das absorvâncias. Estas medidas foram utilizadas para a determinação da lignina solúvel. Outra parte do hidrolisado foi analisada utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para determinação da concentração dos carboidratos e do ácido acético (ver sessão 3.7).

O sólido remanescente no filtro é levado à estufa a 105°C até peso constante. Posteriormente, o sólido é colocado em uma mufla para calcinação à 575°C por 3 horas. A taxa de aquecimento é de 10°C/min para evitar que ocorra queima do material. A amostra, após resfriamento, é levada a balança analítica para determinação da massa. A massa antes da calcinação foi utilizada para o cálculo da fração de lignina insolúvel e a massa após a calcinação foi utilizada para o cálculo da fração de cinzas.

3.3 Enzimas e quantificação da atividade celulásica

Para a realização da hidrólise enzimática, foi utilizado um extrato enzimático pré-comercial desenvolvido para hidrólise de celulose proveniente de materiais lignocelulósicos que sofreram algum tipo de pré-tratamento. A origem do extrato não pode ser divulgada publicamente.

A quantificação da atividade celulásica da enzima foi realizada incubando-se em um tubo de ensaio 500µL de extrato enzimático diluído com 1 tira de papel de filtro Whatman nº1 de 1 x 6 cm (cerca de 50mg) e 1mL de tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 °C por 1 hora. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após o tempo determinado, foram adicionados 3mL de reagente DNS aos tubos e estes foram incubados a 100°C por 5min. Em seguida, adicionou-se 20mL de água e as soluções contidas nos tubos foram homogeneizadas. Por fim, as absorvâncias a 540nm foram registradas, utilizando um espectrofotômetro.

A Equação 4 relaciona valores de absorvância aos de atividade, obtida a partir da curva padrão, que foi construída adicionando-se 3 mL de reagente de DNS original a tubos contendo 500µL de soluções de glicose com concentrações na faixa de 1,4 a 18,5 mM e 1mL de água destilada. Estes tubos

foram incubados a 100 °C por 5 min, seguido de diluição com 20 mL de água, homogeneização e leitura em espectrofotômetro.

$$\text{Atividade (FPU/ml)} = 0,37 \times \text{absorvância} \times \text{diluição} \quad (4)$$

O teste em branco do ensaio foi realizado em tubo de ensaio contendo 500µL de extrato enzimático diluído, 1 tira de papel de filtro Whatman e 1mL de tampão citrato de sódio. Imediatamente após a adição do extrato enzimático, foi adicionado 3mL de reagente DNS aos tubos e estes foram incubados a 100°C por 5min. A partir deste ponto, o procedimento é o mesmo realizado para as amostras.

3.4 Pré-tratamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

3.4.1 Hidrólise ácida – Laboratório

Para a avaliação da comparação das hidrólises do bagaço e da palha, foram realizados pré-tratamentos em laboratório. Como foi analisada apenas a fração líquida (concentração de açúcares e inibidores através de HPLC), a reação em laboratório já produz quantidade suficiente de líquido necessária para a análise. Uma mistura de biomassa com solução de ácido sulfúrico em uma relação sólido:líquido determinada foi levada a autoclave (121°C) por um período de tempo. Estas reações foram realizadas em frascos de vidro de 100mL. Antes de levar os frascos à autoclave, os frascos eram fechados com tampas de rosca específicas para os mesmos (a pressão dentro dos frascos era exclusivamente dependente da temperatura do processo).

A solução de ácido foi preparada utilizando uma solução 5%v/v de H₂SO₄ e água destilada para ajuste da concentração desejada na reação. A quantidade de solução 5%v/v é determinada através da Equação 5.

$$\text{Volume H}_2\text{SO}_4 \text{ 5\% (ml)} = \frac{\left(M_{\text{biomassa}} \text{ (g)} - M_{\text{biomassa}} \text{ (g)} \times \frac{\text{Umidade(\%)}}{100} \right)}{\text{Relação sólido : líquido}} \times \frac{\% \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ na hidrólise}}{0,05 \times 100} \quad (5)$$

A quantidade de água adicionada é determinada através da Equação 6.

$$\text{Água destilada (ml)} = \frac{\left(M_{\text{biomassa}} (\text{g}) - M_{\text{biomassa}} (\text{g}) \times \frac{\text{Umidade} (\%)}{100} \right)}{\text{Relação sólido : líquido}} - M_{\text{biomassa}} (\text{g}) \times \frac{\text{Umidade} (\%)}{100} \quad (6)$$

Após a reação, o meio reacional foi levado a uma balança analítica para determinação de sua massa. Uma alíquota do meio foi retirada para determinação de umidade. O restante da amostra foi introduzido em um sistema de filtração por pressão utilizando algodão e seringa, para separação do líquido. Posteriormente, o líquido foi neutralizado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, gerando CaSO_4 , que se deposita no fundo do recipiente. Uma alíquota foi separada para análise de quantificação de açúcares e inibidores formados na reação de hidrólise. O sólido remanescente foi descartado.

A Figura 3.3 apresenta o aspecto do bagaço e da palha antes e após a hidrólise ácida realizada em laboratório.

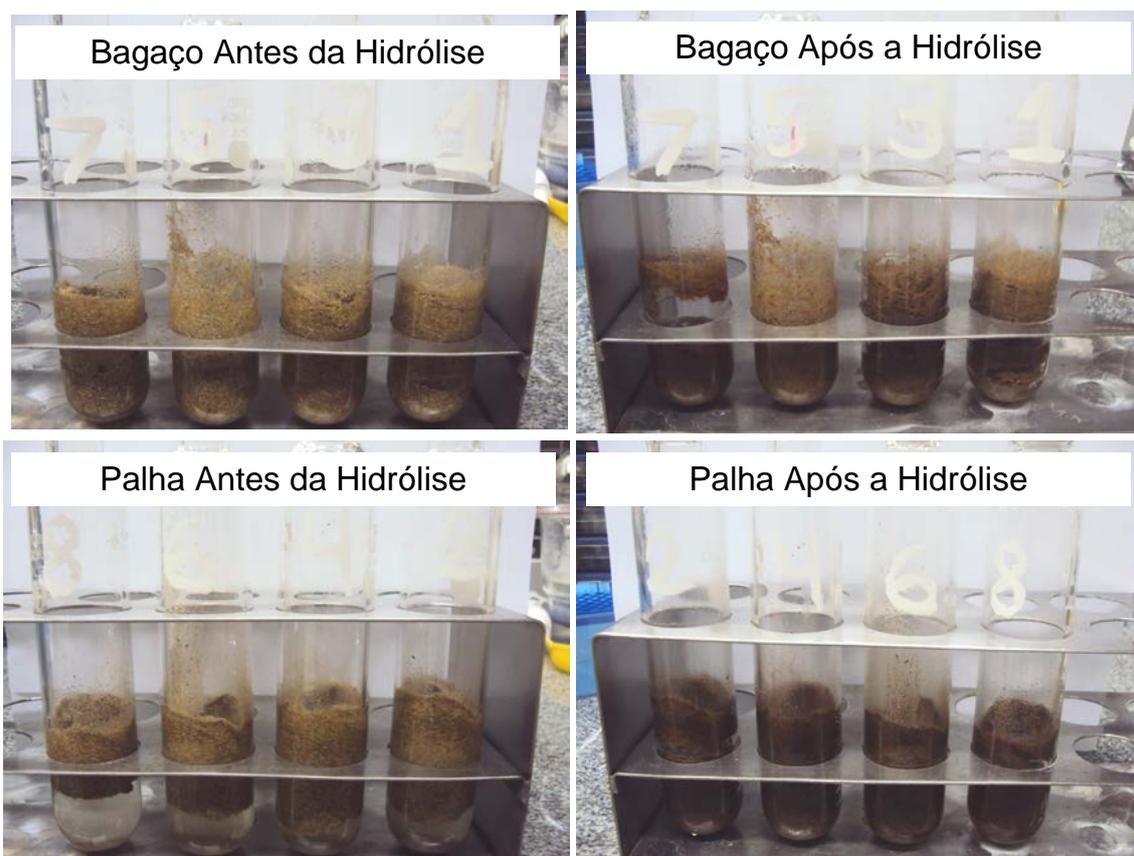


Figura 3.3 - Aspecto do bagaço e da palha antes e após a hidrólise ácida realizada em laboratório

3.4.2 Hidrólise ácida – Planta piloto

Para avaliação do potencial de produção de açúcares utilizando a palha, foram realizadas hidrólises ácidas em planta piloto, uma vez que é necessária uma quantidade maior de sólidos para as reações de hidrólise enzimática, comparado com as reações em laboratório. Uma mistura de biomassa com solução de ácido sulfúrico em uma relação sólido:líquido determinada foi levada a um reator que possui uma rosca misturadora montada em um braço orbital que trabalha paralelamente à geratriz do reator. O reator é pressurizado com nitrogênio a 1,5kgf/cm² de pressão. A reação de hidrólise transcorreu por um tempo determinado. A temperatura da operação para todas as reações de pré-tratamento foi de 121°C. A pressão do processo não é controlada e é função da pressão inicial do reator e do aquecimento do mesmo.

A solução de ácido foi preparada utilizando H₂SO₄. e água destilada para ajuste da concentração desejada na reação. A quantidade de ácido é determinada através da Equação 7.

$$\text{Volume H}_2\text{SO}_4 \text{ (ml)} = \frac{\left(M_{\text{biomassa}} \text{ (kg)} - M_{\text{biomassa}} \text{ (kg)} \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} \right)}{\text{Relação sólido : líquido}} \times \frac{\% \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ na hidrólise}}{100} \times 1000 \quad (7)$$

A quantidade de água adicionada é determinada através da Equação 8.

$$\text{Água destilada (l)} = \frac{\left(M_{\text{biomassa}} \text{ (kg)} - M_{\text{biomassa}} \text{ (kg)} \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} \right)}{\text{Relação sólido : líquido}} - M_{\text{biomassa}} \text{ (kg)} \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} \quad (8)$$

Após a reação, o reator foi descarregado e sua massa foi determinada. O meio reacional foi introduzido em um sistema de filtração por pressão existente na própria planta piloto, para efetuar a separação entre o sólido e o líquido. As massas de líquido e sólido após a separação foram determinadas. Posteriormente, uma alíquota do líquido foi neutralizada e utilizada para análise de quantificação de açúcares e inibidores formados na reação de hidrólise. O restante do líquido foi descartado. Uma alíquota do sólido foi retirada para determinação de umidade. O sólido remanescente foi armazenado em câmara fria até sua utilização na reação de hidrólise enzimática.

As variáveis e os níveis escolhidos foram os mesmos que foram avaliados em laboratório. A matriz de experimentos pode ser observada na Tabela 3.1, no tópico 3.6 (Planejamento Experimental).

A Figura 3.4 apresenta o aspecto do sólido obtido após a hidrólise ácida realizada em reator piloto e após a separação da fração líquida.



Figura 3.4 - Aspecto do sólido após a hidrólise ácida realizada em planta piloto

3.5 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas adicionando 40 gramas de biomassa pré-tratada em um erlenmeyer de 250mL contendo solução tampão citrato 100mM (pH = 5,0) e biocida na concentração de 1mg/L. O volume da solução tampão é calculado para que se tenha uma relação sólido:líquido de 1:10 e, para este cálculo, é necessária a determinação da umidade da biomassa. A Equação 9 apresenta o cálculo do volume de tampão citrato:

$$\text{Tampão (ml)} = 10 \times \left(M_{\text{biomassa}} (\text{g}) - M_{\text{biomassa}} (\text{g}) \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} \right) - M_{\text{biomassa}} (\text{g}) \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} - V_{\text{enzima}} (\text{ml}) \quad (9)$$

A enzima é adicionada ao meio reacional e o mesmo é levado a um Shaker Automático, onde a mesma permaneceu durante 72 horas a uma temperatura de 50°C com uma rotação de 300rpm. A carga enzimática adicionada é de 10 FPU/g. O volume de enzima é calculado pela Equação 10.

$$\text{Volume de enzima (ml)} = \frac{\left(M_{\text{biomassa}}(\text{g}) - M_{\text{biomassa}}(\text{g}) \times \frac{\text{Umidade}(\%)}{100} \right) \times \text{Carga enzimática}(\text{FPU/g})}{\text{Atividade enzimática (FPU/ml)}} \quad (10)$$

Amostras foram recolhidas após 72 horas e centrifugadas a 9000rpm durante 5 minutos para separação do sólido e do líquido. Uma alíquota da fração líquida é utilizada para determinação da concentração de açúcares e inibidores. Para cada condição de pré-tratamento realizado em piloto, foram realizadas triplicatas das reações de hidrólise enzimática, para determinação do erro experimental desta etapa.

A Figura 3.5 apresenta as reações de hidrólise enzimática realizadas com os produtos provenientes das hidrólises ácidas.



Figura 3.5 - Aspecto das reações de hidrólise enzimáticas realizadas neste estudo

3.6 Planejamento experimental

Para avaliar os efeitos das variáveis operacionais do pré-tratamento, foi realizado um planejamento fatorial experimental 2^3 . Neste planejamento, foram avaliadas em dois níveis a relação sólido:líquido (RSL), a concentração

de ácido e o tempo de reação. Apesar de ser um parâmetro importante no pré-tratamento, a temperatura não foi avaliada por causa das limitações dos equipamentos utilizados. As faixas operacionais da autoclave e do reator da planta piloto são muito restritas (115-131°C). Diversos estudos utilizam a temperatura de 121°C, pois grande parte destas reações é realizada em autoclave e esta é a temperatura normal de operação deste equipamento. Assim, esta também foi a temperatura escolhida neste trabalho.

A Tabela 3.1 apresenta o planejamento realizado, apresentando os fatores de cada ensaio e os níveis de cada variável.

Tabela 3.1- Planejamento fatorial 2³, com fatores dos ensaios e níveis das variáveis

Ensaio	Fatores				Níveis	
	Tempo (min)	% ácido (v/v)	RSL (m/m)		Inferior (-1)	Superior (1)
1	-1	-1	-1	Tempo (min)	15	60
2	-1	-1	1	% ácido (v/v)	0,5	3
3	-1	1	-1	RSL (m/m)	0,1	0,2
4	-1	1	1			
5	1	-1	-1			
6	1	-1	1			
7	1	1	-1			
8	1	1	1			

Este planejamento foi realizado em laboratório utilizando o bagaço e a palha moídos (diâmetro de partícula próximo a 0,3mm) para comparação do rendimento de açúcares entre as duas biomassas. Cada ensaio foi realizado em triplicata para determinação do erro experimental do modelo.

Para avaliação da influência das variáveis do pré-tratamento no rendimento da hidrólise enzimática, este planejamento foi realizado em reator piloto utilizando a palha conforme fornecida. Estes ensaios foram realizados em uma única réplica, devido à limitação de biomassa disponível para a realização de tais experimentos. O sólido proveniente de cada ensaio foi utilizado nas reações de hidrólise enzimática, que foram realizadas em triplicata.

3.7 Determinação da concentração de açúcares, co-produtos e inibidores na fração líquida

As concentrações dos compostos produzidos nas reações de hidrólise ácida e hidrólise enzimática (celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo Agilent modelo 1100, equipado com bandeja para solventes, degaseificador, amostrador automático, sistema de bomba binária, compartimento de coluna termostaticado e detector de índice de refração (RID) e detector de arranjo de diodos (DAD) para varreduras de comprimentos de onda na faixa UV/Vis, coluna cromatográfica, marca Thermo e modelo HyperREZ XP Organic acid column, com dimensões de 300 x 7,7 mm e tamanho de partícula de 8µm, pré-coluna, marca Thermo e modelo HyperREZ XP Carbohydrate H+ Guard; dimensões: 50 x 7,7 mm e tamanho de partícula de 8µm). As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se especificadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Condições Operacionais do Cromatógrafo

Fase móvel:	Solução de H ₂ SO ₄ 0,1 mmol/L
Volume de injeção:	5,0µl
Vazão de fase móvel:	0,7 mL/min
Tempo de análise:	25 min
Temperatura da coluna:	57,0°C
Temperatura do detector:	35,0°C

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida, com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento. Destes gráficos, obtém-se o modelo de calibração (Área = A x concentração + B), bem como o coeficiente de correlação (R²) para cada analito. A correlação utilizada para o cálculo das concentrações das amostras é apresentada na Equação 11:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Área} - B}{A} \times f \quad (11)$$

3.8 Variáveis de resposta

Como variáveis de resposta dos ensaios realizados neste estudo, foram calculados os seguintes parâmetros: rendimento de xilose, rendimento de glicose e produção de furfural. Os rendimentos de xilose e glicose representam a quantidade de xilose e de glicose, respectivamente, produzida após o processo de pré-tratamento ácido e após a hidrólise enzimática comparada com a quantidade de polissacarídeo disponível na biomassa. A Equação 12 mostra o cálculo de rendimento de xilose, enquanto a Equação 13 mostra o cálculo de rendimento de glicose. A xilana representa o polissacarídeo composto por unidades de xilose, enquanto a glucana representa o polissacarídeo composto por unidades de glicose. Na Equação 12, os números 132 e 150 representam, respectivamente, a massa molar do monômero que compõem a xilana e a massa molar da xilose. Quando hidrolisadas, uma molécula de água é adicionada ao monômero da xilana, gerando a xilose (a diferença entre as massas molares é justamente de 18kg/kmol, que é a massa molar da água). O mesmo vale para os números 162 e 180 que aparecem na Equação 13, que são a massa molar do monômero que compõem a glucana e a massa molar da glicose.

$$\text{Rendimento de xilose(\%)} = \frac{\text{massa de xilose produzida (g)}}{\frac{\text{massa teórica de xilana (g)} \times 150}{132}} \times 100 \quad (12)$$

$$\text{Rendimento de glicose(\%)} = \frac{\text{massa de glicose produzida (g)}}{\frac{\text{massa teórica de glucana (g)} \times 180}{162}} \times 100 \quad (13)$$

A produção de furfural representa a massa de furfural que foi produzida nas reações de pré-tratamento e é expressa em mg/g ou g/kg. A Equação 14 mostra este cálculo.

$$\text{Furfural(mg/g ou g/kg)} = \frac{\text{Massa de furfural (mg ou g)}}{\text{Massa seca de biomassa (g ou kg)}} \quad (14)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do bagaço e da palha de cana de açúcar e potencial de produção de açúcares e etanol

Inicialmente, a composição química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar utilizados no presente estudo foi determinada com o intuito de descobrir qual o potencial de açúcares fermentáveis gerados nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática de cada biomassa. A Tabela 4.1 apresenta as composições mássicas (em base seca).

Tabela 4.1 - Composição química do bagaço e da palha

Componente	Bagaço (%m/m)	Palha (%m/m)
Glucana	42,1 ± 0,7	39,2 ± 0,7
Xilana	22,6 ± 0,7	22,7 ± 0,6
Arabinana	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Acetato	4,7 ± 0,4	2,8 ± 0,2
Cinzas	4,8 ± 0,5	11,7 ± 0,6
Lignina	20,1 ± 0,5	19,2 ± 0,4
Extrativos	8,7 ± 0,2	6,9 ± 0,3

De acordo com composição apresentada na Tabela 4.1, verifica-se que a palha possui uma quantidade similar dos principais polissacarídeos constituintes da biomassa se comparada ao bagaço. A fração mássica de glucanas (celulose) do bagaço é superior ao da palha, porém esta diferença não é muito significativa (apenas 3% da composição total). A fração mássica de xilana (principal constituinte da hemicelulose) e de lignina são similares para as duas materiais-primas.. A fração mássica de acetato na palha é menor do que o no bagaço, o que indica que a produção de ácido acético durante o pré-tratamento da palha também será menor. O ácido acético é um dos inibidores dos processos enzimáticos e fermentativos presentes no processo de produção de etanol (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Entretanto, percebe-se uma diferença muito acentuada na fração mássica de cinzas presentes em cada biomassa. Observa-se que a palha possui mais de duas vezes a quantidade de cinzas presentes no bagaço. Em um processo de produção cujo objetivo é aproveitar a palha em uma unidade que utilize bagaço, isto pode ser um problema. Uma alta quantidade de cinzas na biomassa pode provocar maior abrasão e corrosão nos equipamentos, além de causar um efeito tamponante à matéria-prima, levando a uma neutralização parcial dos ácidos que são utilizados nos processos de pré-tratamento (PITARELO, 2007).

As frações de polissacarídeos encontrados nas biomassas utilizadas nestes estudos são semelhantes aos encontrados na literatura, apesar de algumas discrepâncias serem encontradas. Castro (2006) realizou um levantamento onde mostrou que tanto o bagaço quanto a palha possuem frações semelhantes de celulose (36% para as duas biomassas). Já a fração de hemicelulose para o bagaço era superior ao da palha (28% e 21%, respectivamente).

Santos *et al.* (2012) mostraram que as quantidades de celulose no bagaço podem variar de 32 a 48%, enquanto que a palha possui uma fração mássica de celulose de 40 a 44%. Isto mostra que os valores encontrados neste estudo são similares aos reportados na literatura. Para a hemicelulose, as frações podem variar de 19 a 24% para o bagaço e de 30 a 32% para a palha. Neste trabalho, as frações de lignina encontrados foram 20,1% para o bagaço e 19,2% para a palha. Para a lignina, as frações podem variar de 23 a 32% para o bagaço e de 22 a 25% para a palha. As frações de lignina encontrados nas biomassas deste estudo se mostraram inferiores ao reportado na literatura, o que pode auxiliar em resultados positivos na hidrólise enzimática do material pré-tratado (menor percentual de lignina na biomassa facilita a digestibilidade frente à ação enzimática).

Utilizando os valores encontrados para glucanas e para xilanas na palha e no bagaço, verifica-se que a palha de cana-de-açúcar tem um potencial de produção de 693kg de açúcares fermentáveis (glicose + xilose) por tonelada de biomassa seca, enquanto o bagaço possui um potencial de 724 kg por tonelada. Isto leva a um potencial de produção de 447 litros de etanol anidro para a palha e 467 litros de etanol anidro para o bagaço.

4.2 Comparação dos resultados do pré-tratamento do bagaço e da palha – escala de laboratório

Os testes de pré-tratamento realizados em laboratório para o bagaço e para a palha foram realizados com o intuito de comparar os resultados de produção de açúcares e de inibidores para as duas biomassas, avaliando o mesmo tipo de pré-tratamento para as duas biomassas. Os ensaios foram realizados de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 3.1. As Tabelas 4.2 e 4.3 apresentam os resultados obtidos nestes experimentos para a palha e para o bagaço, respectivamente.

Tabela 4.2 - Resultados da hidrólise ácida realizada para a palha

Réplica	Ensaio	Tempo (min)	Ácido (%)	RSL (m/m)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (mg/L)	5-HMF (mg/L)
1	1	15	0,5	0,1	0,00	0,69	12,49	2,47	1,85	34,11	5,49
	2	15	0,5	0,2	0,00	1,01	14,30	4,26	2,46	34,52	5,80
	3	15	3	0,1	0,96	3,02	21,85	3,39	2,74	532,88	31,92
	4	15	3	0,2	2,13	5,68	40,86	6,41	5,31	709,07	53,78
	5	60	0,5	0,1	0,97	1,32	18,73	2,73	2,21	109,93	16,20
	6	60	0,5	0,2	0,00	1,78	25,87	5,13	4,69	115,90	28,42
	7	60	3	0,1	0,79	3,97	23,01	3,94	3,73	973,79	50,97
	8	60	3	0,2	1,78	6,45	42,57	7,11	6,15	1126,37	99,52
2	1	15	0,5	0,1	0,00	0,72	13,01	2,57	1,93	38,35	5,66
	2	15	0,5	0,2	0,00	1,05	14,87	4,41	2,54	35,57	5,98
	3	15	3	0,1	0,99	3,14	22,70	3,52	2,83	559,90	33,24
	4	15	3	0,2	2,21	5,92	42,47	6,67	5,54	736,87	55,91
	5	60	0,5	0,1	1,00	1,38	19,50	2,84	2,31	115,80	18,79
	6	60	0,5	0,2	0,00	1,86	26,89	5,34	4,79	120,21	21,31
	7	60	3	0,1	0,82	4,13	23,92	4,10	3,88	1030,38	52,52
	8	60	3	0,2	1,73	6,61	44,17	7,42	6,41	1173,26	96,10
3	1	15	0,5	0,1	0,00	0,67	12,18	2,41	1,80	34,57	5,33
	2	15	0,5	0,2	0,00	0,98	13,92	4,14	2,38	33,47	5,62
	3	15	3	0,1	0,93	2,94	21,27	3,30	2,66	521,69	31,11
	4	15	3	0,2	2,07	5,54	39,79	6,24	5,18	690,37	52,37
	5	60	0,5	0,1	0,94	1,29	18,25	2,66	2,16	107,76	16,69
	6	60	0,5	0,2	0,00	1,74	25,19	5,00	4,53	112,73	23,82
	7	60	3	0,1	0,77	3,87	22,41	3,84	3,63	956,73	49,42
	8	60	3	0,2	1,67	6,24	41,42	6,93	6,00	1097,95	93,47

Tabela 4.3 - Resultados das hidrólises ácidas realizadas para o bagaço

Réplica	Ensaio	Tempo (min)	Ácido (%)	RSL (m/m)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (mg/L)	5-HMF (mg/L)
1	1	15	0,5	0,1	0,00	0,67	11,35	1,76	2,74	23,80	2,11
	2	15	0,5	0,2	0,00	1,07	16,46	3,38	4,29	28,17	3,74
	3	15	3	0,1	1,16	3,40	22,23	2,45	4,12	412,24	22,23
	4	15	3	0,2	2,28	6,61	41,14	4,67	7,98	732,89	43,74
	5	60	0,5	0,1	1,15	1,59	17,77	1,92	3,38	110,70	17,07
	6	60	0,5	0,2	2,26	2,53	29,78	3,93	7,28	119,45	10,27
	7	60	3	0,1	0,76	3,74	21,93	2,59	4,21	978,76	45,60
	8	60	3	0,2	1,52	6,92	41,45	4,90	8,27	1180,39	83,24
2	1	15	0,5	0,1	0,00	0,66	10,92	1,72	2,67	24,37	2,62
	2	15	0,5	0,2	0,00	1,04	15,85	3,31	4,19	26,23	3,56
	3	15	3	0,1	1,12	3,26	21,32	2,33	3,95	431,66	21,38
	4	15	3	0,2	2,20	6,35	39,51	4,46	7,66	703,01	42,02
	5	60	0,5	0,1	0,99	1,29	16,83	1,69	3,25	105,00	17,49
	6	60	0,5	0,2	2,16	2,39	28,56	3,72	6,98	114,13	10,32
	7	60	3	0,1	0,71	3,59	21,04	2,49	4,05	924,57	47,19
	8	60	3	0,2	1,45	6,63	39,78	4,71	7,99	1126,38	91,24
3	1	15	0,5	0,1	0,00	0,70	11,70	1,83	2,84	25,33	2,49
	2	15	0,5	0,2	0,00	1,11	16,98	3,52	4,46	28,58	3,83
	3	15	3	0,1	1,20	3,50	22,88	2,51	4,24	443,88	22,92
	4	15	3	0,2	2,36	6,81	42,38	4,80	8,22	754,57	45,07
	5	60	0,5	0,1	0,00	1,51	18,18	1,90	3,48	113,33	18,18
	6	60	0,5	0,2	2,32	2,59	30,66	4,02	7,50	122,74	10,83
	7	60	3	0,1	0,77	3,85	22,58	2,67	4,34	1000,05	48,80
	8	60	3	0,2	1,56	7,12	42,69	5,05	8,55	1212,16	91,82

Avaliando os resultados, pode-se observar que os rendimentos de xilose (açúcar de maior interesse durante o pré-tratamento) e de glicose são muito similares para as duas biomassas. Rendimentos de xilose de 42,72g/L e 41,31g/L para a palha e para o bagaço, respectivamente, foram obtidos em uma das condições mais severas de pré-tratamento do planejamento (tempo = 60min; % ácido = 3,0; RSL (m/m) = 0,2). Nesta mesma condição, foram obtidos rendimentos de glicose de 6,43g/L (palha) e de 6,89g/L (bagaço) e de furfural de 1132mg/L e 1173mg/L para a palha e para o bagaço, respectivamente.

Pattra *et al.* (2008) obtiveram rendimentos de xilose de 6,7 a 11,3g/L utilizando bagaço de cana-de-açúcar em condições muito similares às realizadas neste estudo (temperatura = 121°C; tempo = 60min; % ácido = 7,0; RSL (m/m) = 0,067). Apesar da maior diluição dos experimentos realizados por Pattra *et al.*, o rendimento de xilose neste estudo foi ligeiramente superior. Para a glicose, Pattra conseguiu rendimentos superiores, mesmo trabalhando em diluições maiores (6,7 a 11g/L comparado a 6,89g/L deste estudo).

Rendimentos de 63,5g/L de xilose foram obtidos por Cheng *et al.* (2008) também utilizando bagaço em condições semelhantes (temperatura = 121°C; tempo = 120min; % ácido = 1,25%; RSL (m/m) = 0,1). Os melhores rendimentos obtidos por Cheng podem ser explicados pelo maior tempo de reação em seus experimentos (120 minutos comparado com 60 minutos).

A inibição dos processos fermentativos com concentrações superiores a 1,0g/L de furfural foram relatadas por Cordona *et al.* (2010). Os valores encontrados neste estudo estão próximos a este limite (valor máximo de 1173mg/L – 1,17g/L), o que significa que há a possibilidade de inibição da fermentação dos produtos líquidos gerados no ensaio 7. Keating *et al.* (2006) mostraram uma baixa interferência do furfural no processo de fermentação com concentrações de 8g/L. Porém, com concentrações de 16g/L, observaram um grande efeito inibitório da ação da levedura.

Para uma análise mais detalhada sobre os resultados obtidos, foram calculados os rendimentos de xilose e a produção de inibidores para as duas biomassas em estudo. O rendimento de xilose é um parâmetro que mede a quantidade de açúcares que foi produzida em relação à quantidade disponível na biomassa. Como existem quantidades diferentes de xilanas em cada biomassa e foram utilizados dois níveis de relação sólido:líquido (RSL), o que

afeta a concentração de xilose no líquido (ensaios com menor relação tendem a ter concentrações menores de açúcares), este parâmetro elimina todos estes efeitos. A produção de inibidores em mg/g também elimina os efeitos negativos da relação sólido:líquido para uma comparação entre os ensaios.

As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam os rendimentos de xilose e a produção de furfural para as trélicas dos ensaios realizados para a palha e para o bagaço. O único inibidor que foi avaliado foi o furfural por ser o inibidor de maior impacto nos processos enzimáticos e fermentativos (PATTRA *et al.*, 2008). Keating *et al.* (2006) mostraram em seu estudo que concentrações de ácido acético de até 15g/L não influenciam de maneira significativa o processo de fermentação.

Tabela 4.4 - Rendimentos de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para a palha

Réplica	Exp.	Tempo (min)	% Ácido	RSL (m/m)	Rendimento de xilose (%)	Produção de furfural (mg/g)
1	1	15	0,5	0,1	43,7	0,31
	2	15	0,5	0,2	22,2	0,14
	3	15	3	0,1	76,4	4,80
	4	15	3	0,2	63,4	2,83
	5	60	0,5	0,1	65,3	0,99
	6	60	0,5	0,2	40,2	0,46
	7	60	3	0,1	80,3	8,75
	8	60	3	0,2	66,2	4,51
2	1	15	0,5	0,1	45,5	0,35
	2	15	0,5	0,2	23,1	0,14
	3	15	3	0,1	79,4	5,04
	4	15	3	0,2	65,9	2,94
	5	60	0,5	0,1	68,0	1,04
	6	60	0,5	0,2	41,8	0,48
	7	60	3	0,1	83,5	9,26
	8	60	3	0,2	68,7	4,70
3	1	15	0,5	0,1	42,6	0,3
	2	15	0,5	0,2	21,6	0,1
	3	15	3	0,1	74,4	4,7
	4	15	3	0,2	61,7	2,8
	5	60	0,5	0,1	63,7	1,0
	6	60	0,5	0,2	39,2	0,5
	7	60	3	0,1	78,2	8,60
	8	60	3	0,2	64,4	4,4

Tabela 4.5 - Rendimentos de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para o bagaço

Réplica	Exp.	Tempo (min)	% Ácido	RSL (m/m)	Rendimento de xilose (%)	Produção de furfural (mg/g)
1	1	15	0,5	0,1	39,8	0,21
	2	15	0,5	0,2	25,6	0,11
	3	15	3	0,1	78,0	3,71
	4	15	3	0,2	64,0	2,92
	5	60	0,5	0,1	62,5	1,00
	6	60	0,5	0,2	46,4	0,48
	7	60	3	0,1	77,1	8,83
	8	60	3	0,2	64,6	4,72
2	1	15	0,5	0,1	38,3	0,22
	2	15	0,5	0,2	24,6	0,10
	3	15	3	0,1	74,8	3,89
	4	15	3	0,2	61,4	2,80
	5	60	0,5	0,1	59,2	0,95
	6	60	0,5	0,2	44,5	0,46
	7	60	3	0,1	74,0	8,34
	8	60	3	0,2	62,0	4,50
3	1	15	0,5	0,1	41,1	0,23
	2	15	0,5	0,2	26,4	0,11
	3	15	3	0,1	80,3	4,00
	4	15	3	0,2	65,9	3,01
	5	60	0,5	0,1	63,9	1,02
	6	60	0,5	0,2	47,8	0,49
	7	60	3	0,1	79,4	9,02
	8	60	3	0,2	66,5	4,85

A primeira observação que deve ser realizada é a similaridade nos resultados obtidos com duas biomassas. Para todas as condições experimentadas, não foi observada diferença significativa de resultados entre a palha e o bagaço, o que evidencia que este tipo de pré-tratamento que normalmente é utilizado para o bagaço pode ser utilizado para a palha.

Dentro da gama de ensaios realizados, as condições do experimento 7 foram as que geraram maior rendimento de xilose tanto para a palha (80,6% – média das réplicas). Para o bagaço, as condições representadas pelo experimento 3 que mostraram maior rendimento de xilose (77,7% - média das réplicas). O experimento 7 foi o que produziu maior quantidade de furfural (8,87mg/g para a palha e 8,73mg/g para o bagaço – média das réplicas) tanto para o bagaço quanto para a palha.

Observando mais atentamente os resultados das Tabelas 4.4 e 4.5, verifica-se que a melhor condição é a representada pelo experimento 3. Tanto para o bagaço quanto para a palha, nesta condição, o rendimento de xilose se aproxima do máximo obtido no planejamento proposto, com uma produção de furfural relativamente baixa, em concentrações que ainda não provocam inibição dos processos subseqüentes.

Comparado com outros estudos da literatura, que utilizaram biomassas e pré-tratamento similares ou diferentes a deste estudo, observou-se que foram encontrados altos rendimentos de xilose. Rocha *et al.* (2011) atingiram um rendimento superior a 90%, utilizando temperaturas de 190°C, relações sólido-líquido iguais a 0,1, tempo de 10 minutos e concentrações de ácido de 1,0%. Silva *et al.* (2010) conseguiram rendimentos de 72,1% para o bagaço e 56,8% para a palha utilizando a moagem como pré-tratamento. Vale lembrar que as biomassas utilizadas nas reações em laboratório também sofreram um processo de cominuição. Laser *et al.* (2002) obtiveram rendimentos superiores a 99% utilizando bagaço e o processo de explosão a vapor como pré-tratamento. Hernández-Salas *et al.* (2009) conseguiram rendimentos superiores a 35%, porém inferiores a deste estudo. Os experimentos de Hernández-Salas também foram realizados em autoclave e de maneira estática (sem agitação).

Para realizar uma avaliação mais detalhada sobre o comportamento dos resultados da palha em relação ao bagaço, os resultados das Tabelas 4.4 e 4.5 foram analisados no programa STATISTICA V.7.0 para verificação da análise de variância, determinação dos efeitos que mais influenciam no rendimento de xilose e na produção de inibidores e observação do comportamento destas variáveis de resposta em relação às modificações realizadas em cada parâmetro de processo. Nestas tabelas, o efeito "A" representa a variável "tempo", o efeito "B" representa a variável "concentração de ácido" e o efeito "C" representa a variável "relação sólido-líquido".

As Tabelas 4.6 e 4.7 apresentam um resumo da análise de variância (ANOVA) para o rendimento de xilose para as duas biomassas em questão, avaliando quais são as variáveis mais influentes na produção de xilose para o pré-tratamento utilizado.

Tabela 4.6 - Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de xilose (%) para a palha

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Prob > F
Modelo	79249,22	1	79249,22	19986,87	0,000000
A	811,33	1	811,33	204,62	0,000000
B	4975,54	1	4975,54	1254,84	0,000000
C	2066,13	1	2066,13	521,08	0,000000
A*B	413,28	1	413,28	104,23	0,000000
A*C	8,39	1	8,39	2,12	0,165139
B*C	144,13	1	144,13	36,35	0,000018
A*B*C	2,34	1	2,34	0,59	0,453227
Erro Puro	63,44	16	3,97		

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Tabela 4.7 - Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de xilose (%) para o bagaço

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Prob > F
Modelo	77999,60	1	77999,60	17067,23	0,000000
A	677,65	1	677,65	148,28	0,000000
B	4479,65	1	4479,65	980,20	0,000000
C	1183,18	1	1183,18	258,89	0,000000
A*B	696,69	1	696,69	152,44	0,000000
A*C	0,00	1	0,00	0,00	0,986027
B*C	4,46	1	4,46	0,98	0,338079
A*B*C	3,18	1	3,18	0,70	0,416499
Erro Puro	73,12	16	4,57		

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

De acordo com a tabela do ANOVA, o efeito principal mais significativo no rendimento de xilose para a palha é a concentração de ácido (maior valor de soma quadrática), seguido da RSL e, com menor impacto, o tempo. Percebe-se ainda, que existem duas interações de segunda ordem que possuem significância (Tempo x ácido e ácido x RSL). Não foi identificada significância nas interações de terceira ordem. As interações não significativas estão destacadas nas tabelas.

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de rendimento de xilose para a palha foi de 0,989. Tal modelo, apresentado em valores codificados, pode ser apresentado na Equação 15.

$$\text{Rendimento de xilose (\%)} = 57,46 + 5,81A + 14,4B - 9,28C - 4,15AB + 2,45BC$$

erro padrão = $\pm 0,41$ (15)

Para o bagaço, o principal efeito também é a concentração de ácido, sendo os efeitos de tempo e da RSL também significantes, porém com menor intensidade. Os efeitos da RSL e do tempo são similares aos encontrados para a palha. Diferentemente da palha, apenas uma interação de segunda ordem possui significância (tempo x concentração de ácido). A interação de terceira ordem não é significativa.

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de rendimento de xilose para o bagaço foi de 0,985, e tal modelo, também apresentado em valores codificados, é apresentado na Equação 16.

$$\text{Rendimento de xilose (\%)} = 57,01 + 5,31A + 13,7B - 7,02C - 5,39AB$$

erro padrão = $\pm 0,44$ (16)

O estudo realizado por Neureither *et al.* (2002), onde foram avaliados os efeitos das variáveis temperatura, tempo, relação sólido:líquido e concentração de ácido na produção de xilose, também mostrou que o maior efeito é o da concentração de ácido, seguido da relação sólido:líquido e do tempo. Esse trabalho também constatou que a concentração de ácido e o tempo tinham influência positiva no rendimento de xilose, enquanto a relação sólido:líquido tinha efeito negativo nesta variável, assim como determinado neste estudo.

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam as superfícies de resposta para o rendimento de xilose para as duas biomassas. Estes gráficos representam a maior influência da concentração de ácido. Isto pode ser observado pela maior inclinação das superfícies nos eixos referentes a concentração de ácido nas Figuras 4.1 e 4.3. Na Figura 4.2, onde verifica-se o efeito da RSL e do tempo,

observa-se que a inclinação da superfície nos eixos de RSL e de tempo não são muito significativos, evidenciando o menor efeito destes dois fatores.

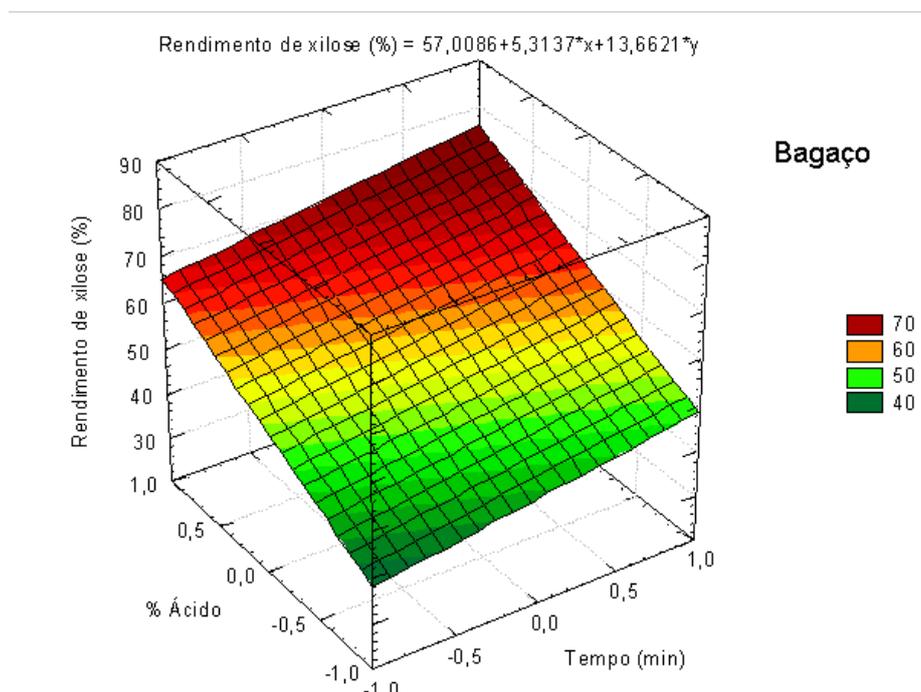
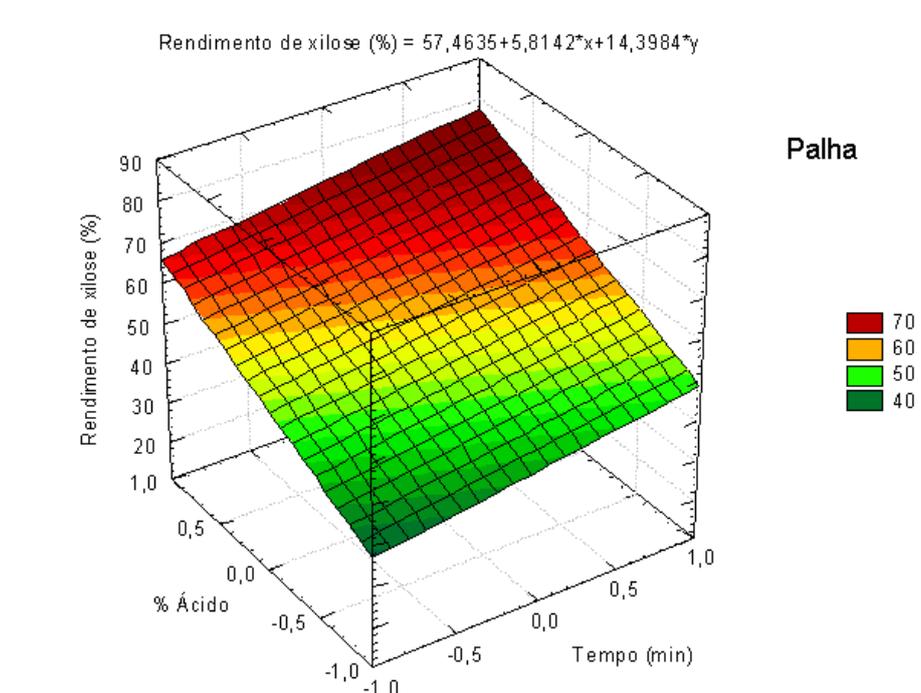


Figura 4.1 - Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Tempo x Ácido

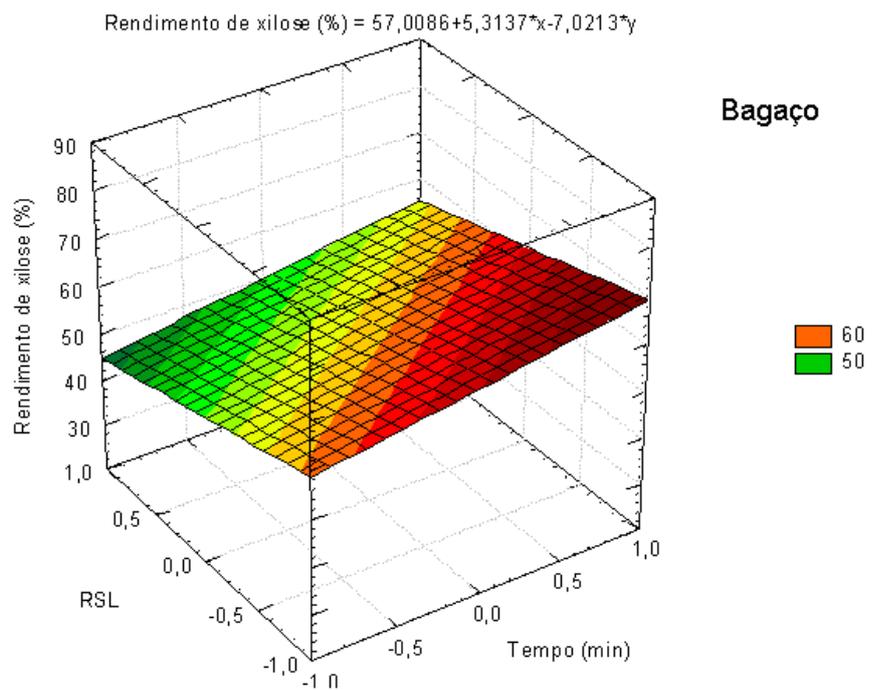
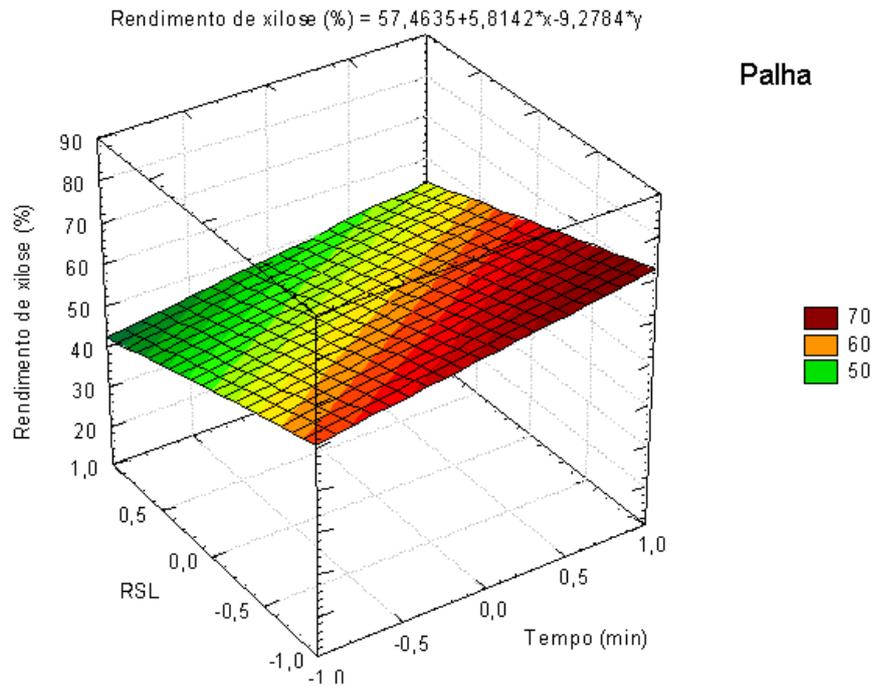


Figura 4.2 - Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Tempo x RSL

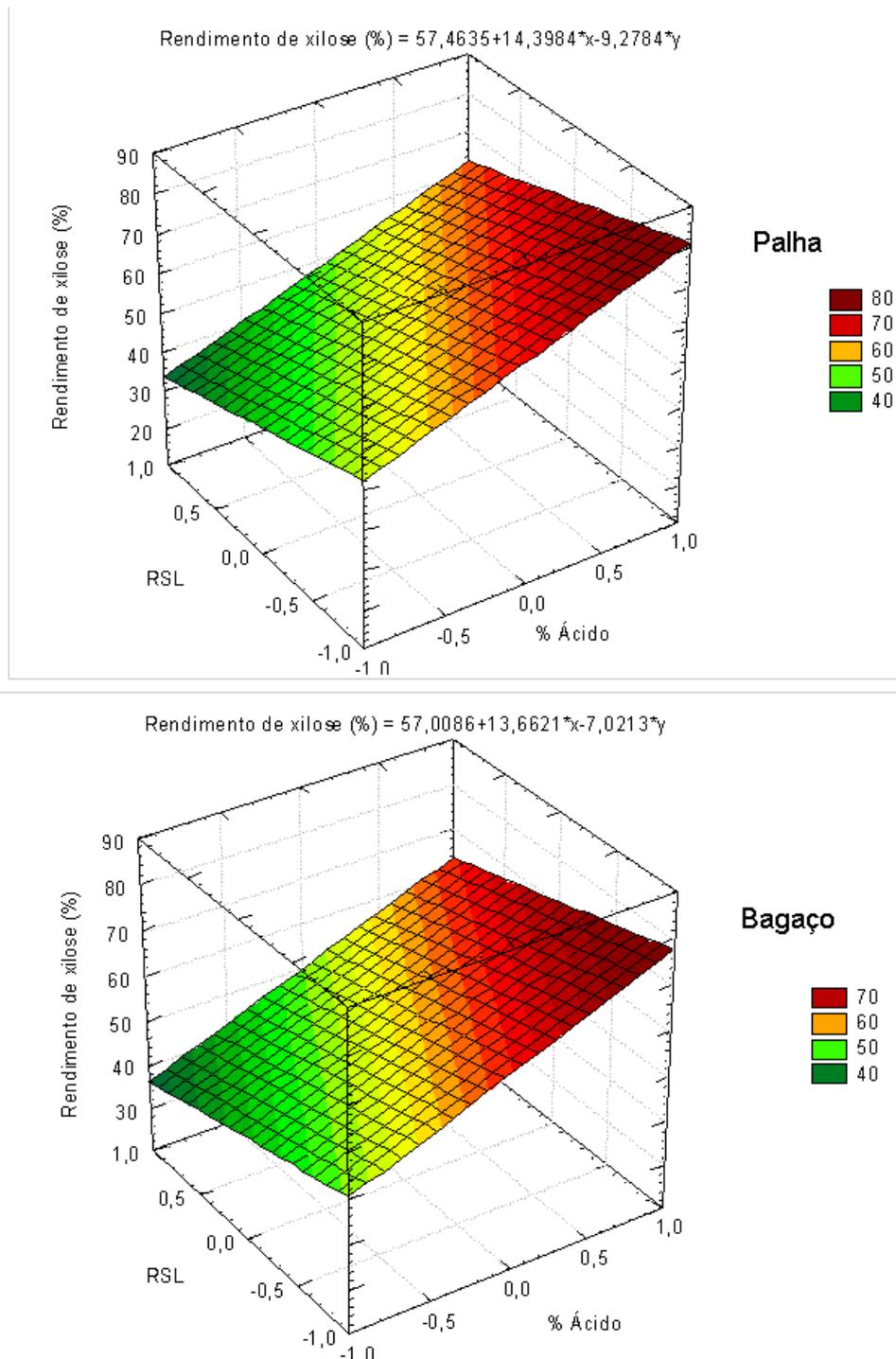


Figura 4.3 - Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – Ácido x RSL

A mesma análise realizada para o rendimento de xilose também foi realizada para a produção de furfural. As Tabelas 4.8 e 4.9 apresentam o resumo da análise de variância (ANOVA) para a produção de furfural também para as duas biomassas em estudo, avaliando quais são as variáveis mais influentes na degradação de xilose, ou seja, produção do inibidor.

Tabela 4.8 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural (mg/g) para a palha

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Prob > F
Modelo	198,78	1	198,78	8578,35	0,000000
A	16,92	1	16,92	730,00	0,000000
B	137,88	1	137,88	5950,45	0,000000
C	18,66	1	18,66	805,11	0,000000
A*B	8,30	1	8,30	358,35	0,000000
A*C	2,69	1	2,69	116,12	0,000000
B*C	11,84	1	11,84	511,12	0,000000
A*B*C	1,47	1	1,47	63,41	0,000001
Erro Puro	0,37	16	0,02		

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Tabela 4.9 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural (mg/g) para o bagaço

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Prob > F
Modelo	181,28	1	181,28	7782,59	0,000000
A	22,65	1	22,65	972,52	0,000000
B	126,92	1	126,92	5449,01	0,000000
C	11,82	1	11,82	507,43	0,000000
A*B	11,37	1	11,37	488,15	0,000000
A*C	4,57	1	4,57	196,15	0,000000
B*C	7,15	1	7,15	306,78	0,000000
A*B*C	2,70	1	2,70	115,85	0,000000
Erro Puro	0,37	16	0,02		

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Os resultados obtidos na tabela do ANOVA mostram que o efeito principal mais significativo para a produção de furfural também é a concentração de ácido (apresenta maior soma quadrática). Para a palha, os efeitos de tempo e da RSL são muito similares, sendo muito menos significativos que a concentração de ácido. Percebe-se, ainda, que todas as

interações de segunda ordem possuem significância, assim como as interações de terceira ordem.

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de produção de furfural para a palha foi de 0,997. Tal modelo, apresentado em valores codificados, pode ser apresentado na Equação 17.

$$\text{Furfural(mg/g)} = 2,88 + 0,84A + 2,40B - 0,88C + 0,59AB - 0,33AC - 0,70BC + 0,25ABC \quad \text{erro padrão} = \pm 0,03 \quad (17)$$

Para o bagaço, o principal efeito também é a concentração de ácido, sendo os efeitos de tempo e da RSL também significantes, porém com menor intensidade. De maneira similar à palha, todas as interações de segunda ordem possuem significância, assim como a interação de terceira ordem.

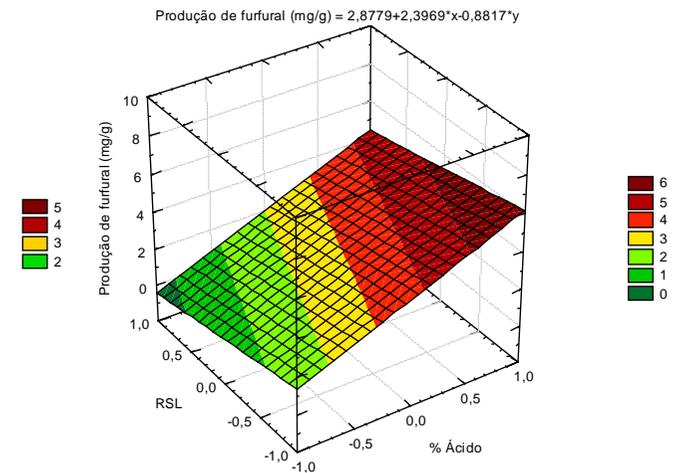
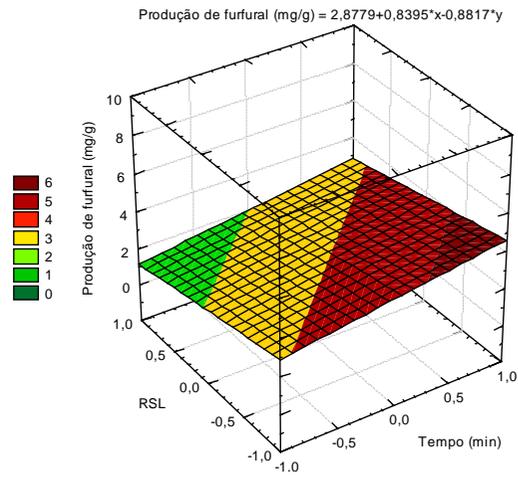
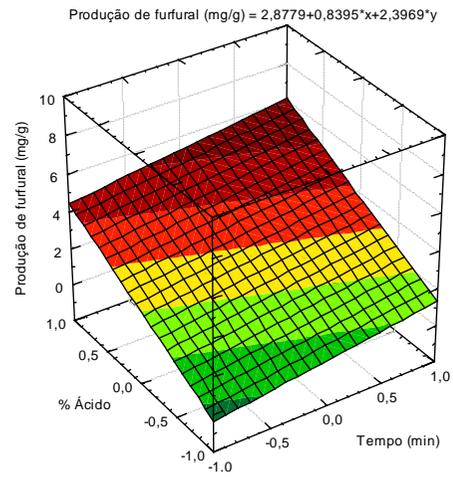
O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de produção de furfural para o bagaço foi de 0,997, e tal modelo, também apresentado em valores codificados, é apresentado na Equação 18.

$$\text{Furfural(mg/g)} = 2,78 + 0,97A + 2,30B - 0,70C + 0,69AB - 0,44AC - 0,55BC + 0,34ABC \quad \text{erro padrão} = \pm 0,03 \quad (18)$$

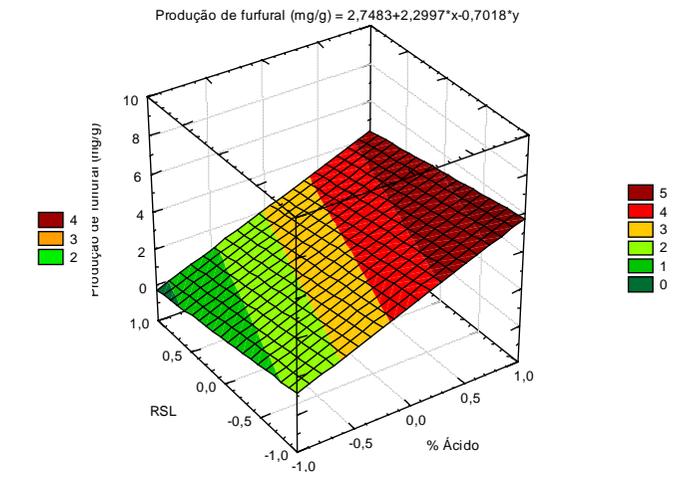
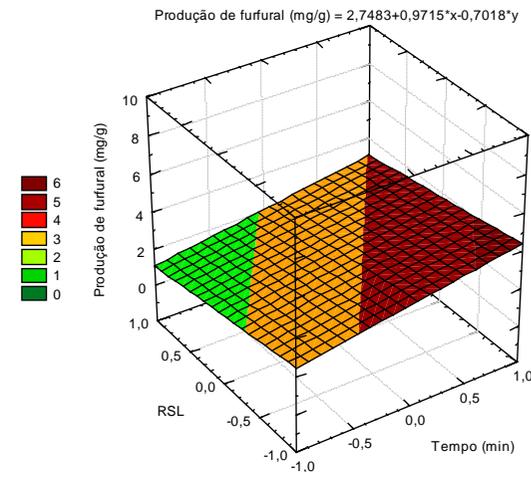
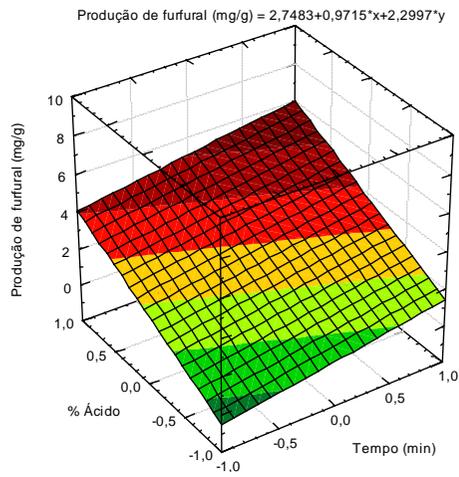
Neureither *et al.* (2002) também avaliaram os efeitos das variáveis temperatura, tempo, relação sólido:líquido e concentração de ácido na produção de furfural. Tal estudo mostrou que o maior efeito é o da temperatura, seguido da concentração de ácido e do tempo. Como no presente estudo não foram avaliados os efeitos da temperatura, fica evidente que os resultados obtidos por Neureither corroboram com os resultados obtidos neste estudo. Os autores verificaram que a concentração de ácido e o tempo tinham influência positiva na produção de furfural, enquanto a relação sólido:líquido tinha efeito negativo nesta variável. Vale ressaltar que, no estudo de Neureither, interações de segunda ordem como concentração de ácido x temperatura se mostraram mais influentes que a relação sólido:líquido. Neste estudo, o efeito da relação sólido:líquido se mostrou similar ou superior a estas interações.

A Figura 4.4 apresenta as superfícies de resposta para a produção de furfural para as duas biomassas. Estes gráficos representam a maior influência

da concentração de ácido nesta variável. Mais uma vez, pode-se observar que a inclinação das superfícies nos eixos de concentração de ácido são maiores que a inclinação nos eixos das duas outras variáveis. Na mesma figura, verifica-se que tal mudança para os efeitos de RSL e do tempo não é tão acentuada, evidenciando o menor efeito destes dois fatores.



Palha



Bagaço

Figura 4.4 - Superfícies de resposta para Produção de Furfural

4.3 Avaliação das variáveis do pré-tratamento da palha no rendimento de glicose

Para avaliar como as variáveis do pré-tratamento da palha influenciam no rendimento de glicose, foram realizados ensaios em reator de planta piloto de acordo com planejamento apresentado na sessão 3.6. Estes ensaios foram feitos em uma única réplica devido à grande quantidade de biomassa necessária para realização dos experimentos. A palha disponível para tais experimentos foi suficiente apenas para a realização de um conjunto de ensaios.

Após o pré-tratamento, o material líquido gerado foi separado do material sólido. O líquido foi analisado com o objetivo principal de determinar a concentração de xilose e de inibidores. Com estes dados, foi determinado o rendimento de xilose e a produção de furfural. A Tabela 4.10 apresenta os resultados de concentração de produtos e inibidores gerados nas reações de hidrólise ácida (pré-tratamento) realizadas em reator em planta piloto.

Tabela 4.10 - Concentração de produtos e inibidores nas reações de pré-tratamento em escala piloto

Ensaio	Tempo (min)	% ácido	RSL	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Furfural (mg/L)	5-HMF (mg/L)
1	15	0,5	0,1	0,00	0,85	16,18	2,37	2,20	119,49	10,31
2	15	0,5	0,2	0,04	3,49	18,52	2,91	2,68	0,00	60,51
3	15	3	0,1	0,00	1,73	26,12	3,79	3,19	880,77	29,39
4	15	3	0,2	1,16	5,25	32,86	4,95	4,38	1591,17	61,11
5	60	0,5	0,1	0,25	2,76	19,95	3,01	2,61	273,59	18,19
6	60	0,5	0,2	0,00	2,44	31,61	4,59	4,31	498,30	33,03
7	60	3	0,1	0,16	5,20	28,77	4,63	4,14	2028,84	49,92
8	60	3	0,2	0,23	6,34	35,20	5,38	5,26	3034,94	88,22

Das reações de hidrólise ácida, observa-se que uma concentração máxima de 35,2g/L de xilose foi atingida na condição de 60min, RSL igual a 0,2 e concentração de ácido de 3%. Conforme descrito anteriormente, esta concentração é superior a muitas referências encontradas na literatura para outras biomassas (PATTRA *et al*, 2008; SCHELL *et al*, 2000; JUTAKANOKI *et al*, 2012). Entretanto, nesta condição, a concentração de furfural obtida foi de 3035mg/L. Nesta concentração, é esperado que se tenha uma grande interferência/inibição do processo de fermentação (concentrações superiores a 1000mg/L já provocam inibição).

Com o material sólido de cada ensaio, foram realizadas réplicas de ensaios de hidrólise enzimática em escala de laboratório. Para a realização destes ensaios, foi utilizada uma enzima pré-comercial específica para utilização em reações deste tipo. A atividade enzimática desta enzima foi determinada conforme descrito na sessão 3.3 e o valor obtido nesta determinação foi de 176 FPU/mL.

A determinação da concentração de açúcares no líquido gerado na hidrólise enzimática foi realizada com o objetivo principal de determinar a concentração de glicose. Com estes dados, foram determinados os rendimentos de glicose de cada ensaio. A Tabela 4.11 apresenta os resultados de concentração de produtos gerados nas reações de hidrólise enzimática.

Tabela 4.11 - Concentração de produtos nas reações de hidrólise enzimática em laboratório

Réplica	Amostra	Tempo (min)	% ácido	RSL	Celbiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)
1	1	15	0,5	0,1	0,11	6,38	4,85	0,75	0,10
	2	15	0,5	0,2	0,15	3,80	2,21	0,31	0,00
	3	15	3	0,1	0,13	27,22	8,55	0,72	0,21
	4	15	3	0,2	0,16	4,96	2,49	0,31	0,10
	5	60	0,5	0,1	0,97	23,99	7,03	0,52	0,27
	6	60	0,5	0,2	0,19	4,25	4,73	0,65	0,17
	7	60	3	0,1	1,51	27,24	5,53	0,31	0,09
	8	60	3	0,2	0,18	5,72	3,63	0,66	0,20
2	1	15	0,5	0,1	0,11	5,86	4,41	0,60	0,09
	2	15	0,5	0,2	0,14	3,64	2,14	0,31	0,00
	3	15	3	0,1	0,13	26,26	8,22	0,67	0,20
	4	15	3	0,2	0,16	4,77	2,38	0,30	0,10
	5	60	0,5	0,1	0,96	23,26	6,84	0,52	0,26
	6	60	0,5	0,2	0,17	4,10	4,55	0,63	0,17
	7	60	3	0,1	1,48	26,04	5,31	0,28	0,10
	8	60	3	0,2	0,16	5,49	3,47	0,64	0,17
3	1	15	0,5	0,1	0,11	6,25	4,74	0,69	0,10
	2	15	0,5	0,2	0,15	3,81	2,23	0,32	0,00
	3	15	3	0,1	0,13	27,21	8,52	0,71	0,21
	4	15	3	0,2	0,17	4,95	2,47	0,31	0,10
	5	60	0,5	0,1	0,98	24,02	7,05	0,53	0,27
	6	60	0,5	0,2	0,18	4,24	4,72	0,65	0,17
	7	60	3	0,1	1,53	27,32	5,54	0,30	0,10
	8	60	3	0,2	0,17	5,73	3,63	0,66	0,19

Do planejamento realizado para as reações de hidrólise enzimática, observa-se que uma concentração máxima de 27,32g/L de glicose foi atingida na condição de 60min, RSL igual a 0,1 e concentração de ácido de 3%. Pattra *et al.* (2008) conseguiram uma concentração de 6,7 a 11,0g/L em seus experimentos. Jutakanoke *et al.* atingiram uma concentração de 20,2g/L utilizando pré-tratamento similar ao realizado neste estudo, porém com carga enzimática muito superior. O tempo utilizado nos ensaios de Jutakanoke foi inferior ao utilizado neste estudo (6 horas comparado com 72 horas).

Para uma análise mais detalhada sobre os resultados obtidos, foram calculados os rendimentos de xilose e de produção de inibidores utilizando a mesma metodologia empregada para os resultados das reações realizadas em laboratório. A Tabela 4.12 apresenta os rendimentos de glicose e xilose e a produção de furfural para os ensaios realizados para a palha em planta piloto e laboratório. Vale lembrar que os rendimentos de xilose e produção de furfural foram calculados nos resultados

obtidos nas reações de hidrólise ácida em planta piloto e os rendimentos de glicose com os resultados obtidos na hidrólise enzimática realizada em laboratório. Como não foram realizadas réplicas das reações de hidrólise ácida, a Tabela 4.12 apresenta os rendimentos de xilose de apenas um conjunto de experimentos.

Tabela 4.12 - Rendimentos de glicose (%) e de xilose (%) e produção de furfural (mg/g) para a palha – escala piloto (pré-tratamento) e laboratório (HE)

Réplica	Exp.	Tempo (min)	% Ácido	RSL (m/m)	Rendimentos de glicose (%)	Rendimentos de xilose (%)	Produção de furfural (g/kg)
1	1	15	0,5	0,1	13,65	55,89	1,06
	2	15	0,5	0,2	7,26	30,37	0,00
	3	15	3	0,1	53,80	94,27	8,19
	4	15	3	0,2	10,78	48,86	6,10
	5	60	0,5	0,1	52,15	61,29	2,17
	6	60	0,5	0,2	6,47	45,44	1,85
	7	60	3	0,1	64,83	~100,00	18,45
	8	60	3	0,2	11,87	54,65	12,14
2	1	15	0,5	0,1	12,71	-	-
	2	15	0,5	0,2	7,10	-	-
	3	15	3	0,1	52,04	-	-
	4	15	3	0,2	10,59	-	-
	5	60	0,5	0,1	50,79	-	-
	6	60	0,5	0,2	6,30	-	-
	7	60	3	0,1	62,54	-	-
	8	60	3	0,2	11,63	-	-
3	1	15	0,5	0,1	13,43	-	-
	2	15	0,5	0,2	7,26	-	-
	3	15	3	0,1	53,78	-	-
	4	15	3	0,2	10,76	-	-
	5	60	0,5	0,1	52,24	-	-
	6	60	0,5	0,2	6,46	-	-
	7	60	3	0,1	65,01	-	-
	8	60	3	0,2	11,88	-	-

Apesar da condição referente ao ensaio 8 ter produzido um líquido com uma maior concentração de xilose, verificou-se que as condições do ensaio 3 e do ensaio 7 foram as que geraram maiores rendimentos de xilose (94,27 e ~100,00%, respectivamente). Isto é uma evidência de que a diminuição da RSL provoca a diluição do produto líquido do pré-tratamento, porém aumenta o rendimento de xilose.

Rocha *et al.* (2011), Negro *et al.* (2003), Mok e Antal Jr. (1992) e Laser *et al.* (2002) também atingiram rendimentos de xilose superiores a 90%, utilizando outras biomassas e diversos pré-tratamentos. Esta diversidade de resultados satisfatórios dificulta a seleção de um pré-tratamento para um determinado tipo de biomassa, avaliando-se apenas os resultados experimentais. Há necessidade de conciliar o estudo experimental com o estudo econômico para, assim, determinar qual o processo mais adequado.

A condição relativa ao ensaio 7, além de produzir maior concentração de xilose, também foi a condição que proporcionou maior rendimento de glicose (64,13% - média das replicas). Neste caso, o efeito de diluição não se apresenta com fator negativo para a comparação entre os ensaios, porque a relação sólido:líquido das reações de hidrólise enzimática foram as mesmas para todos os ensaios.

No entanto, a condição relativa ao ensaio 3 pode ser mais interessante em termos de produção de etanol comparada com a condição do ensaio 7. No ensaio 3, foram obtidos bons rendimentos de xilose e de glicose se comparados com o ensaio 7, porém com uma produção de furfural bem menor (8,2g/kg contra 18,5g/kg). No ensaio 3, a inibição provocada pelo furfural será bem menor, o que poderá acarretar em rendimentos maiores de etanol após a fermentação. Entretanto, este fato seria confirmado apenas se a etapa de fermentação estivesse contemplada neste estudo.

Diversas referências mostraram resultados inferiores e superiores ao encontrado neste estudo. Monk e Antal Jr. (1992) conseguiram um rendimento máximo de glicose de 22% em seu estudo. Hernández-Sallas *et al.* (2009) obtiveram um rendimento superior a 35%. Koegel *et al.* (1999) conseguiram rendimentos superiores a 40%. Entretanto, Negro *et al.* (2003) atingiram rendimentos superiores a 95%. Os estudos realizados por Rocha *et al.* (2011) mostraram um rendimento superior a 76%. Laser *et al.* atingiram rendimentos superiores a 99%. Em todos estes estudos, foram utilizadas cargas enzimáticas superiores a do presente estudo.

Da mesma maneira que foi realizada para os experimentos em laboratório, os resultados da Tabela 4.12 foram analisados no programa STATISTICA V.7.0 para verificação da análise de variância, determinação dos efeitos que mais influenciam nos rendimentos de glicose e xilose e na produção de inibidores e no comportamento destas variáveis de resposta em relação às modificações realizadas em cada parâmetro de processo. Nestas tabelas, o efeito "A" representa a variável

“tempo”, o efeito “B” representa a variável “ácido” e o efeito “C” representa a variável “relação sólido-líquido”.

A Tabela 4.13 apresenta um resumo da análise de variância (ANOVA) para o rendimento de xilose para a palha, avaliando o efeito de cada variável na produção de xilose para o pré-tratamento utilizado.

Tabela 4.13 - Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de xilose – testes em planta piloto

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	30293,83	1	30293,83
A	140,46	1	140,46
B	1412,58	1	1412,58
C	2232,96	1	2232,96
A*B	6,90	1	6,90
A*C	8,38	1	8,38
B*C	324,02	1	324,02
A*B*C	15,49	1	15,49

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Na Tabela 4.13, observa-se que, diferentemente das reações realizadas em laboratório, o fator de maior significância no rendimento de xilose é a relação sólido:líquido (maior soma quadrática), seguida da concentração de ácido e, em menor proporção, do tempo. Uma explicação para isto pode estar no fato de que as reações realizadas em laboratório foram feitas sem agitação. Como a transferência de massa no meio reacional (contato ácido-fibra) era prejudicada pela falta de agitação, a quantidade de ácido que estava disponível para a reação de hidrólise era somente aquela que estava próxima à fibra da biomassa no início do processo. Desta forma, o aumento da concentração de ácido tinha grande influência no resultado. Sem agitação, a maior quantidade de líquido presente em alguns ensaios não afetava de forma significativa o rendimento. Com a agitação nos ensaios realizados em planta piloto, o efeito da relação sólido-líquido ficou mais evidente, pois há um aumento na taxa de transferência de massa. Outro fato importante é que,

quanto menor a relação sólido-líquido, para uma mesma concentração de ácido, maior é a quantidade de ácido disponível para a hidrólise.

As interações de segunda ordem são pouco significativas, exceto a interação BC (concentração de ácido + relação sólido:líquido), que possui significância maior que a do efeito do tempo. A interação de terceira ordem também possui pouca significância. Não foi possível a realização do teste F pelo fato de não termos réplicas dos ensaios. O modelo, apresentado em valores codificados, pode ser apresentado na Equação 19.

$$\text{Rendimento de xiose (\%)} = 61,54 + 4,19A + 13,29B - 16,71C - 0,93AB + 1,02AC - 6,36BC + 1,39ABC \quad (19)$$

A Figura 4.5 apresenta as superfícies de resposta para o rendimento de xilose para as reações realizadas em piloto. Estes gráficos representam a maior influência da relação sólido:líquido e do ácido (maior inclinação da superfície). Observa-se que o efeito do tempo não é tão significativo, pois as variações de valores nos eixos destas variáveis não são tão intensas quanto às das outras duas variáveis.

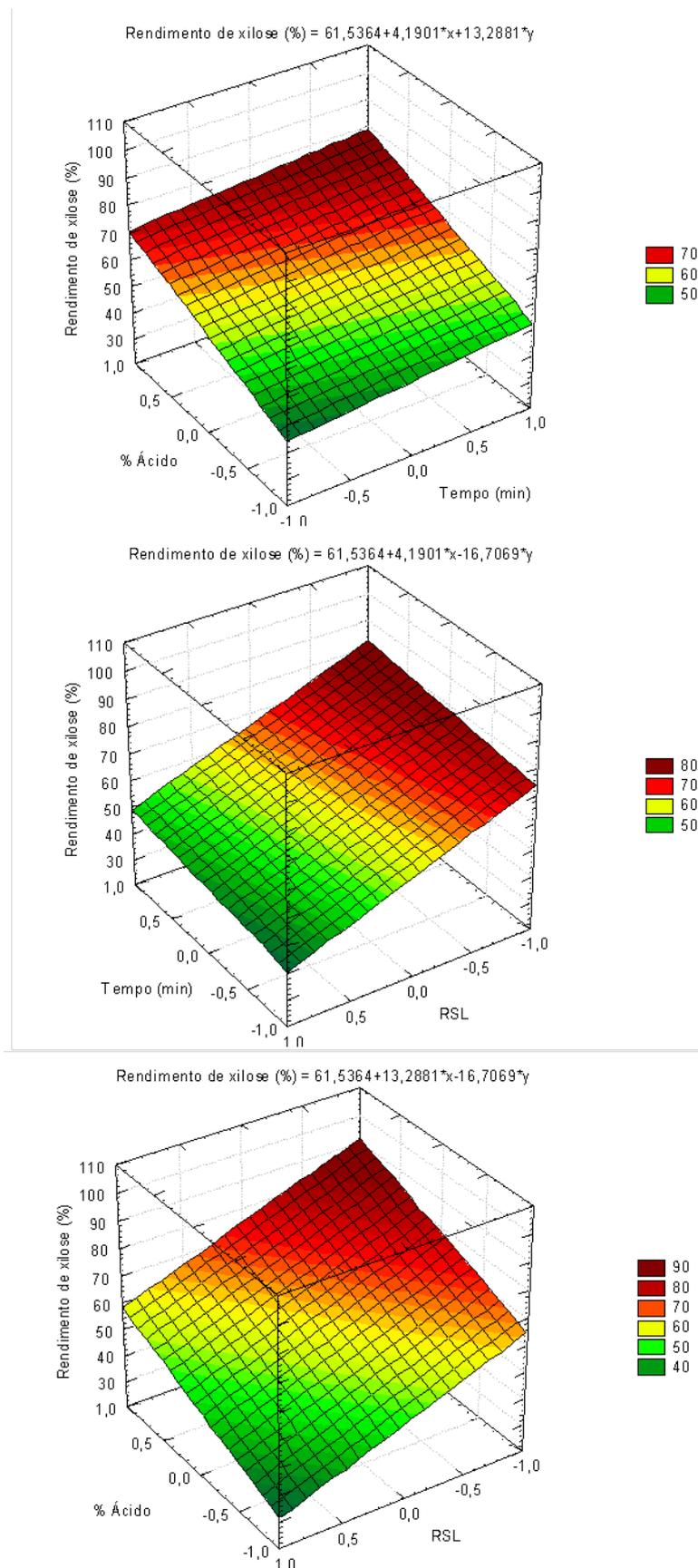


Figura 4.5 - Superfícies de resposta para o rendimento de xilose – testes em planta piloto

A mesma análise foi realizada para a produção de furfural. A Tabela 4.14 apresenta o resumo da análise de variância (ANOVA) para este parâmetro, avaliando quais são as variáveis mais influentes.

Tabela 4.14 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de furfural – testes em planta piloto

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	311,76	1	311,76
A	46,30	1	46,30
B	197,93	1	197,93
C	11,97	1	11,97
A*B	22,28	1	22,28
A*C	1,51	1	1,51
B*C	6,16	1	6,16
A*B*C	3,07	1	3,07

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Assim como nos testes realizados em laboratório, os resultados obtidos na planta piloto mostram que o efeito principal mais significativo para a produção de furfural é a concentração de ácido, fator que apresenta maior soma quadrática. Os efeitos de tempo e da RSL são muito similares, sendo o tempo mais significativo. Não é possível avaliar quais efeitos e interações são significativos, uma vez que estes experimentos não foram realizados com réplicas. O modelo, apresentado em valores codificados, pode ser apresentado na Equação 20.

$$\text{Furfural}_{(g/kg)} = 6,24 + 2,41A + 4,97B - 1,22C + 1,67AB - 0,43AC - 0,88BC + 0,62ABC \quad (20)$$

A Figura 4.6 apresenta as superfícies de resposta para a produção de furfural para as reações realizadas em piloto. Estes gráficos representam da concentração de ácido nesta variável (maior inclinação da superfície ao longo do eixo da concentração de ácido). Observa-se também que o efeito do tempo e da relação sólido-líquido não é tão significativo.

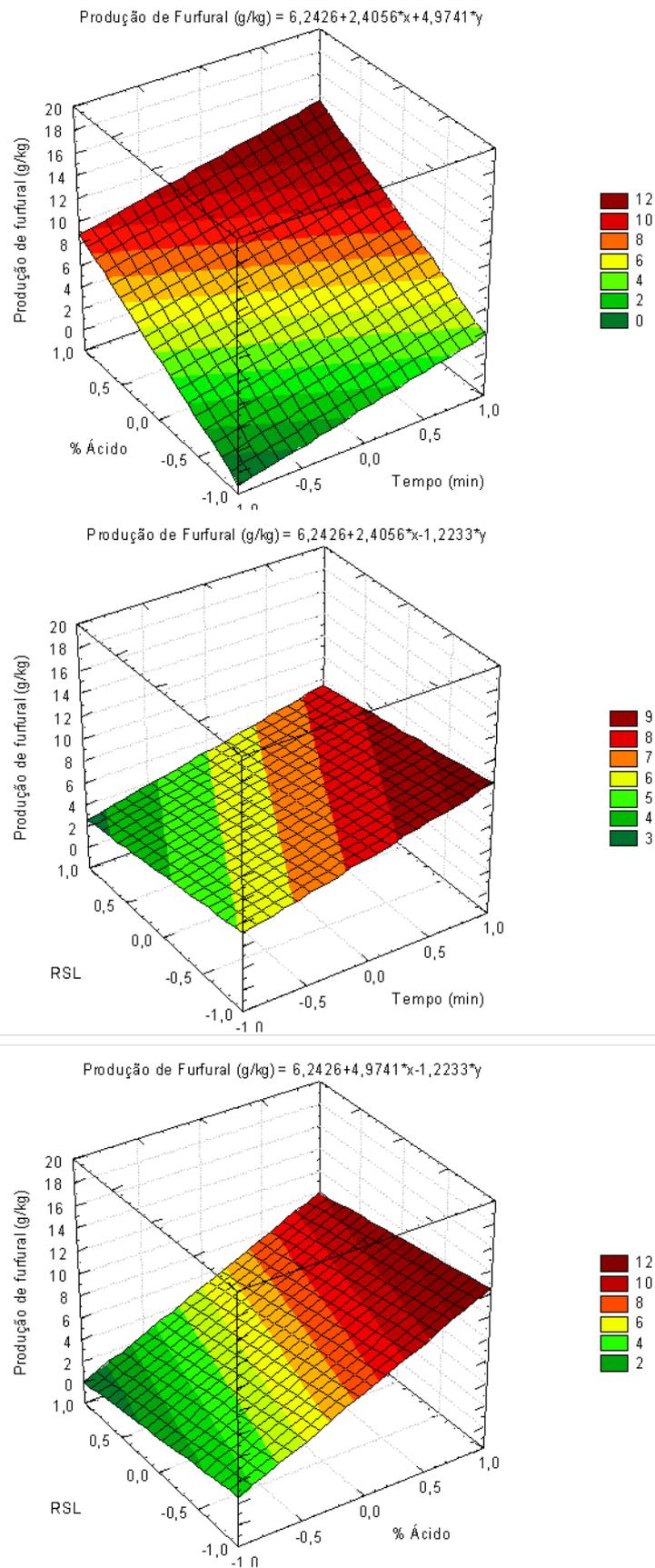


Figura 4.6 - Superfícies de resposta para a produção de furfural – testes em planta piloto

Finalmente, a análise de variância foi realizada para os dados de rendimento de glicose obtidos nas reações de hidrólise enzimática da palha pré-tratada. A Tabela 4.15 apresenta um resumo desta análise, avaliando quais são as variáveis do pré-tratamento mais influentes na produção de glicose.

Tabela 4.15 - Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento de glicose – testes em planta piloto

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Prob > F
Modelo	17893,38	1	17893,38	36929,57	0,000000
A	925,40	1	925,40	1909,91	0,000000
B	1405,85	1	1405,85	2901,49	0,000000
C	8016,12	1	8016,12	16544,22	0,000000
A*B	246,95	1	246,95	509,68	0,000000
A*C	904,20	1	904,20	1866,15	0,000000
B*C	708,10	1	708,10	1461,43	0,000000
A*B*C	324,67	1	324,67	670,07	0,000000
Erro puro	7,75	16	0,48		

(A- tempo; B- concentração de ácido; C- relação sólido:líquido)

Na Tabela 4.15, observa-se que, da mesma maneira que na avaliação de rendimento de xilose, o fator de maior significância no rendimento de glicose é a relação sólido:líquido (maior soma quadrática), seguida, em menor proporção, da concentração de ácido e do tempo. A mesma explicação que foi utilizada para o rendimento de xilose pode ser utilizada para o rendimento de glicose. Em relações sólido:líquido menores, a quantidade de ácido disponível é maior. Como a agitação favorece a transferência de massa na reação, a extensão da hidrólise ácida é maior nestas relações. Isto favorece a digestibilidade da fibra pré-tratada, facilitando a ação da enzima.

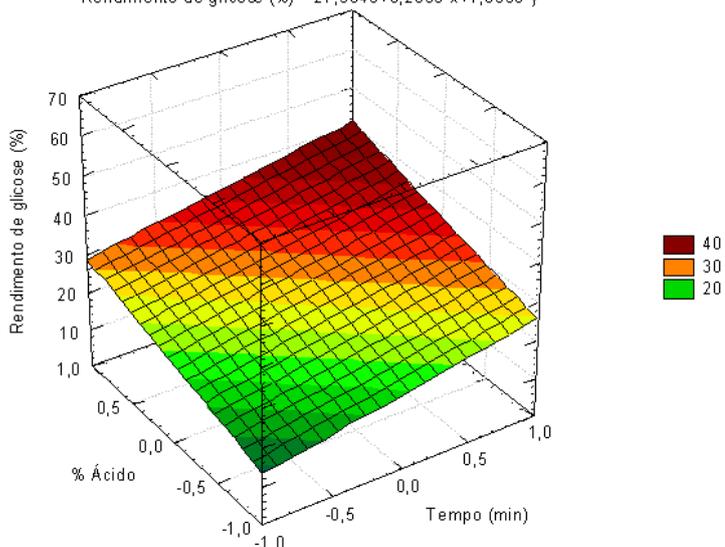
As interações de segunda ordem apresentam significâncias similares a do tempo, sendo que a interação tempo-concentração de ácido apresenta um menor efeito. A interação de terceira ordem também possui pouca significância. O teste F mostrou que todos os efeitos e interações foram significantes para este parâmetro.

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo de rendimento de glicose foi 0,999. Tal modelo, apresentado em valores codificados, pode ser apresentado na Equação 21.

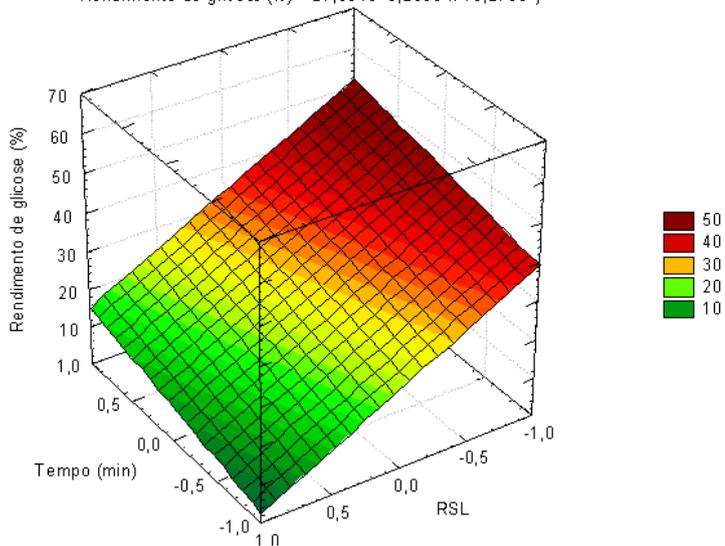
$$\text{Rendimento de glicose (\%)} = 27,30 + 6,21A + 7,65B - 18,28C - 3,21AB - 6,14AC - 5,43BC - 3,68ABC \quad \text{erro padrão} = \pm 0,14 \quad (21)$$

A Figura 4.7 apresenta as superfícies de resposta para o rendimento de glicose. Nestes gráficos, pode-se observar a maior influência da relação sólido:líquido e do ácido, evidenciada pela maior inclinação da superfície ao longo do eixo destas duas variáveis..

$$\text{Rendimento de glicose (\%)} = 27,3049 + 6,2095 \cdot x + 7,6536 \cdot y$$



$$\text{Rendimento de glicose (\%)} = 27,3049 + 6,2095 \cdot x - 18,2758 \cdot y$$



$$\text{Rendimento de glicose (\%)} = 27,3049 + 7,6536 \cdot x - 18,2758 \cdot y$$

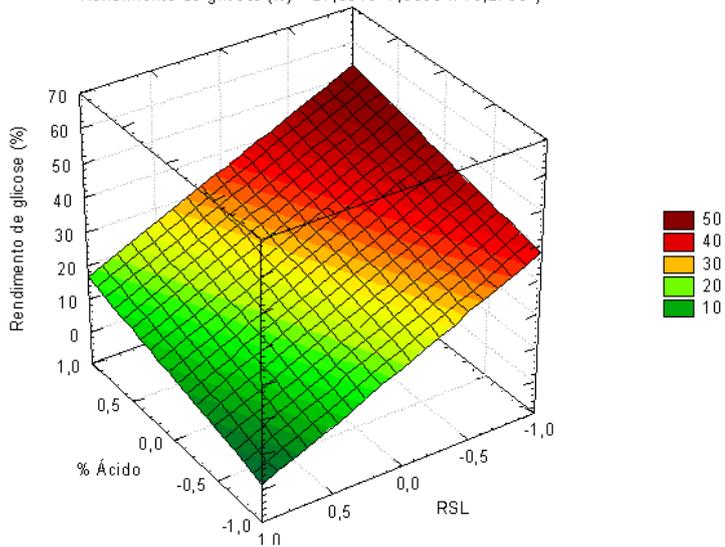


Figura 4.7 - Superfícies de resposta para o rendimento de glicose – testes em laboratório

Do conjunto de experimentos realizados nesta etapa, verificou-se que as condições representadas pelo ensaio 7 foram as que proporcionaram maiores rendimento de xilose e glicose (~100,00% e 64,13%, respectivamente). Entretanto, vale ressaltar que as condições do ensaio 3 também apresentaram altos rendimentos (94,27% para a xilose e 53,21% para a glicose), porém com menor geração de furfural (8,19g/kg do ensaio 3 contra 18,45g/kg do ensaio 7), o que indica uma menor inibição do processo de fermentação e, conseqüentemente, maior rendimento de etanol.

Tomando por base os rendimentos de açúcares do ensaio 7, o potencial de produção de etanol teórico é de 346 litros de etanol por tonelada de palha em base seca (180 litros provenientes da fermentação da glicose e 166 provenientes da fermentação da xilose). Entretanto, estes são valores teóricos que devem ser confirmado experimentalmente através da fermentação. Ainda existem desafios a serem vencidos com relação à fermentação, principalmente no sentido de desenvolvimento de um micro-organismo que seja resistente aos interferentes e inibidores da fermentação e que seja capaz de realizar a fermentação dos dois tipos de açúcares simultaneamente. Somente vencidas estas etapas é que se chegará a rendimentos próximos aos teóricos.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) A caracterização química das biomassas mostrou que as quantidades disponíveis de celulose e de hemicelulose do bagaço e da palha foram muito próximas, indicando que, em base seca, as duas biomassas têm potenciais similares para a produção de açúcares (447 litros de etanol anidro para a palha e 467 litros de etanol anidro para o bagaço).
- b) Nas reações de hidrólise ácida realizadas em laboratório, foram obtidas concentrações de xilose de 42,72g/L e de 41,31g/L para a palha e para o bagaço, respectivamente, alcançando rendimentos de xilose de 80,6% para a palha e 76,8% para o bagaço, resultados alcançados em uma das condições mais severas do planejamento (tempo = 60min; % ácido = 3,0; RSL (m/m) = 0,2), sendo superiores a de muitos estudos encontrados na literatura.
- c) O efeito mais significativo para o rendimento de xilose, tanto para palha quanto para o bagaço, foi a concentração do ácido. Os outros efeitos foram menos significativos.
- d) Foram observadas concentrações de furfural de 1132mg/L para a palha e 1173mg/L para o bagaço, atingindo produções de furfural de 4,93mg/g para a palha e 4,85mg/g para o bagaço, em uma das condições mais severas do planejamento (tempo = 60min; % ácido = 3,0; RSL (m/m) = 0,2), sendo similares a valores reportados na literatura. Essas concentrações já podem interferir no processo de fermentação dos açúcares.
- e) O efeito mais significativo para a produção de furfural para as duas biomassas também foi a concentração do ácido, sendo os outros efeitos menos significativos.

- f) Já para as reações realizadas em escala piloto, foi atingida uma concentração máxima de 35,2g/L de xilose e 27,3g/L de glicose, concentrações altas se comparadas com as reportadas na literatura, alcançando rendimentos de 64.13% para a glicose e de 100,00% para a xilose
- g) Para as reações realizadas em planta piloto, diferentemente do que foi determinado nos ensaios de laboratório, foi verificado que o efeito da relação sólido:líquido é muito mais significativo para o rendimento de glicose e xilose do que as outras variáveis. Isto foi devido à agitação presente nestes experimentos, o que aumenta a transferência de massa no meio reacional.
- h) Foi observada uma concentração de furfural de 3035mg/L (produção de 18,45g/kg) nas reações realizadas em planta piloto, obtida em uma das condições mais severas do planejamento (tempo = 60min; % ácido = 3,0; RSL (m/m) = 0,2), sendo superior a valores encontrados nas reações em laboratório. É esperada que esta concentração de furfural provoque uma interferência significativa no processo de fermentação.
- i) O efeito mais significativo para a produção de furfural para as reações em planta piloto continuou sendo a concentração de ácido, sendo os outros efeitos menos significativos.
- j) Teoricamente, a produção de etanol esperada é de 346 litros de etanol por tonelada de palha em base seca.

5.2 Sugestões

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões são destacadas:

- a) Incluir o efeito da temperatura nas reações com palha e com bagaço.
- b) Realizar os ensaios de fermentação para verificar o real rendimento de etanol.
- c) Realizar réplicas das reações de hidrólise ácida da palha para determinação do erro experimental do modelo.
- d) Caracterizar os sólidos pré-tratados para verificar qual foi o percentual de remoção de lignina da biomassa.

- e) Realizar em planta piloto as reações com bagaço, avaliando em uma escala maior o rendimento de açúcares para esta biomassa e comparar com os resultados obtidos com a palha.
- f) Ampliar o modelo de rendimento de glicose incluindo as variáveis carga enzimática e atividade enzimática no modelo (principais variáveis da hidrólise enzimática).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.M. Hidrólise Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos Utilizando Celulases Produzidas pelo Fungo *Aspergillus Niger*, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, (dissertação de mestrado), 2010.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, p. 340–349, 2007.

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

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP 36/2005. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/index.asp>. Acesso em: dezembro de 2012.

AVGERINOS, G. C. WANG, D. I. C. Selective delignification for fermentation of enhancement. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 25, p. 67-83, 1983.

AWAFO, V. A. et al. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 60868) and *Pichia stipitis* Y-7124: A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of wheat straw. *Journal of Food Biotechnology*, v. 22, p. 49-97, 1998.

BALABAN, M. UCAR, G. The effect of the duration of alkali pretreatment on the solubility of polyoses. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. v. 23, p. 667-71, 1999.

BALAN, V. et al. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*). *Biotechnology Progress*, v. 25, p. 365–375, 2009.

BALLAT. M. et. al. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p: 551-573, 2008.

BALS, B. et al. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 102 (2), p. 1277-1283, 2011.

BNDES . CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Acessado em 22/11/2012 pelo site www.bioetanoldecana.org – Rio de Janeiro, 2008.

BP (British Petroleum). Statistical Review of World Energy. Acessado em 11/12/12 no site www.bp.com/statisticalreview. 2012

BROWNELL, H. H. SADDLER, J. N. Steam pretreatment of lignocellulose materials for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 29, p. 228-35, 1987.

CANTARELLA, M. et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1533-1542, 2004.

CARA, C. et al.. Liquid hot water of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V.136-140, p. 379–394, 2007.

CARA, C. et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. v. 99, p.1869–1876, 2008.

CARDONA, C. A. et al. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARERE, C.R. et. al. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, v.9, p.1342–60, 2008.

CARVALHEIRO, F. et al.. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 67, p. 849–864, 2008.

CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de celulasas de fungos filamentosos obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil. 2006.

CHANG, V. S. HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 84, p. 5-37, 2000.

CHANDRA, R.P.et al. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHEN, M. et al. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, p. 1381 -1385, 2009.

CHENG, K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.105-109, 2005.

CHEUNG, S.W., ANDERSON, B.C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. *Bioresource Technology* v. 59, p. 81–96, 1997.

CHUNDAWAT, S.P.S. et al. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 96, p. 219–231, 2007.

CONVERSE, A. O. Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. In: SADDLER, J.N. (ed). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. p. 93-106, 1993.

COUGHLAN, M. P. LJUNGDAHL L. G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems FEMS Symposium - Federation of European Microbiological Societies, v. 43, p. 11-30, 1988.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. Applied Energy, v. 86, 151-161, 2009.

DESVAX M. Clostridium cellulolyticum: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. FEMS Microbiology, v.29, p. 741-64, 2005.

DIEN, B. S. et al. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 63, issue 3, p. 258-266, 2003.

DUFEY, Annie. Biofuels production trade and sustainable development: emerging issues. IIED, 2006.

DUFF, S. J. B. MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology, v. 55, p. 1–33, 1996.

FENGEL, D. WEGENER, G. Wood - chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin and New York, 613pp, 1984

FERREIRA, S., et al.. Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum*—an evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. Bioresource Technology, v.101, p. 7797–7803, 2010.

FNS. Bioetanol – o futuro renovável. Confederação Nacional da Indústria. Fórum Nacional Sucroenergético. – Brasília, 2012. Acessado em 11/12/12 em www.cnisustentabilidade.com.br/docs/FNS_RIO20_web.pdf

FULTON, L. HOWES, T.; HARDY, J. Biofuels for Transport: An International Perspective, Paris: International Energy Agency, 2004.

GARCÍA-CUBERO, M.T. et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. Bioresource Technology, v. 100, p. 1608–1613, 2009.

GARDNER, B. Fuel Ethanol Subsidies and Farm Price Support: Boon or Boondoggle?. Department of Agricultural and Resource Economics, University of Maryland, 2003.

GIRIO, F.M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. Bioresource Technology, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

HAAGENSEN, F. et al. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass and Bioenergy*. V. 33, p. 1643–1651, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B. et. al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, v. 126, issue 4, p. 488–498, 2006.

HAMELINCK C. N. et al. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384–410, 2005.

HAZELL, P. PACHAURI, R. K. *Bioenergy and Agriculture: Promises and Challenges*. International Food Policy Research Institute, Focus No. 14, 2006.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M. et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, v. 100, issue 3, p. 1238–1245, 2009.

HENDRICKS, A.T. ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. V. 100, p. 10-18, 2009.

HUANG, X.L. PENNER, M.H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p. 2096–2100, 1991.

JUTAKANOKKE, R. et al. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, Article in Press, 2012.

KARUNANITHY, C. et al. A comparative study of acid and enzymatic hydrolysis of prairie cord grass pretreated using high shear bioreactor. *American Society of Agricultural and Biological Engineers. Annual International Meeting*, v. 6, p. 3687–3696. 2008a.

KARUNANITHY, C. et al. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated in high shear bioreactor. *American Society of Agricultural and Biological Engineers. Annual International Meeting*, v. 6, p. 3603–3611, 2008b.

KARUNANITHY, C. et al. Effect of Extruder Parameters and Moisture Content of Switchgrass, Prairie Cord Grass on Sugar Recovery from Enzymatic Hydrolysis. *Applied Biochemical and Biotechnology*. doi: 10.1007/ s12010-010-8959-3, 2010a.

KARUNANITHY, C. et al. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 162, p. 264–279, 2010b.

KEATING, J.D. et al. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeast to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 93, p. 1196–1206, 2006.

KELLER, F. A. et al. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v 105–108, p. 27–41, 2003

KLINKE, H.B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 15–26, 2002.

KLINKE, H.B. et al. Potential Inhibitors From wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 81, p. 738–747, 2003.

KLINKE, H.B. et al. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 10–26, 2004.

KOEGEL, R. G. et al. Alfalfa fiber as feedstock for ethanol and organic acids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.77-79, p.105-115, 1999.

KONDO, A. et al. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, issue 6, p. 1136-1143, 2006.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, v.46, p.126–131, 2009.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* . v. 48, p. 3713–3729, 2009.

LAMSAL, B. et al. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy*. V. 34, p. 1703–1710, 2010.

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

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 121-124, p.1081–99, 2005.

LENIHAN, P. et al. Diluted acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineer Journal*, v. 156, p. 395-403, 2010.

LEVAN, S. L. ROSS, R. J. WINANDY, J. E. Effects of fire retardant chemical bending properties of wood at elevated temperatures. Research paper FPF-RP-498 Madison, WI: USDA, forest service. 1990.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 21, p. 403–465, 1996.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, p. 506-77, 2002.

MARTIN, C. et al. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 40, p. 426-432, 2007.

MARTIN, C. et al. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ruegrass mixtures. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 8777–8782, 2008.

MCKENDRY P. Energy Production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 37-46, 2002.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. em: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, p.. 292–324, 1994.

MILANEZ, A. Y. et al. *Perspectivas para o etanol brasileiro*. Rio de Janeiro: Departamento de Biocombustíveis/BNDES, 2008.

MOK, W.S. ANTAL Jr, M. J. Uncatalyzed Solvolysis of Whole Biomass Hemicellulose by Hot Compressed Liquid Water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 31, p.1157-1161, 1992.

MORAIS, S. A. L. et al. Chemical analysis of *Pinus oocarpa* wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives. *Revista Árvore*, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MOSIER, N. et al. A comparison between hot liquid water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, v. 40, p. 2934–2941, 2001.

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

NEGRO, M. J. et al. Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105-108, p. 87-100, 2003.

NEGRO, M. J. et al. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, v. 25, p. 301-308, 2005.

NEUREITHER, M. DANNER, H. THOMASSER, C. SAIDI, B. BRAUN, R. Dilute-acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. *Applied Chemistry and Biotechnology*. v. 98-100, p. 49-58, 2002.

NLEWEM, K.C., THRASH, J. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5426–5430, 2010.

OGIER, J.C. et al. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology – Revue de l'IFP*, v. 54, p. 67-94, 1999.

PALMQVIST, E. HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. v. 74. p: 17-24. 2000a.

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

PALONEN, H. et al. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 117, p. 1–17, 2004.

PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 5256–5265, 2008.

PENNER, M.H., LIAW, E.-T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma cellulase*. em: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 363–371, 1994.

PEREZ, J.A. et al.. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. V. 82, p. 929–938, 2007.

PEREZ, J.A. et al. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, v. 87, p. 3640–3647, 2008.

PITARELO, A. P. Avaliação da Susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação de mestrado. UFPR, 2007.

RAJAGOPAL, Deepak; ZILBERMAN, David. Review of Environmental, Economic and Policy Aspects of Biofuels. The World Bank. Development Research Group. Sustainable Rural and Urban Development Team, 2007.

RANALLI. P (ed.), *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, 209–251, 2007.

ROCHA, M. V. et al.. Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric Acid for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 155, p.407–417, 2009.

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass e Bioenergy*, v.35, p.663-670, 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. V. 30, p. 279–91, 2003.

SAHA, B.C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v.40, p. 3693–3700, 2005.

SANTOS, F. et al. *Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas*; Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol. *Química Nova*, v.35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHELL, D. et al. Modeling the Enzymatic Hydrolysis of Dilute-Acid Pretreated Douglas Fir. *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 77-79, p. 67–81, 2000.

SCHELL, D. J. et al. Dilute–Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor Investigation of Yields, Kinetics, and Enzymatic Digestibilities of Solids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105–108, p. 69-85, 2003.

SENDELIUS, J. Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production. Tese de Doutorado. Department of Chemical Engineering, Lund University, Suécia, 2005.

SHATALOV, A. A.. Arundo donax L. reed: new perspectives for pulping and bleaching. 5. Ozone-based TCF bleaching of organosolv pulps. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 472–478, 2008.

SINDHU, R. et al. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v.102, p.10915-10921, 2011.

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

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

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

SLUITER. A. et al. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples NREL/TP-510-42621 - Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2008a. Acessado no site www.nrel.gov.

SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass Procedure, Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42619, 2008b. Acessado no site www.nrel.gov.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-510-42618, 2008c. Acessado no site www.nrel.gov.

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

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.

UGARTE, D. G. de la Torre. “Developing Bioenergy: Economic and Social Issues,” in *Bioenergy and Agriculture: Promises and Challenges*, International Food Policy Research Institute, Focus No. 14, 2006.

VARGA, E. et al. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 88, p. 567–574, 2004.

VERMERRIS, W. (ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. University of Florida, 2008.

WINGREN, A. et al.. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 1109-1117, 2003.

WORLD ENERGY COUNCIL. *Biofuels: Policies, Standards and Technologies*, resumo de 2010.

WU, Z., LEE, Y. Y. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters*, v. 19, issue 10, p. 977-979 , 1997.

WYMAN, C.E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959–1966, 2005a.

WYMAN, C.E. et al. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 2026–2032, 2005b.

ZHAO, X. et al.. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 815–827, 2009.

ZHU, J.Y., PAN, X.J.. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4992–5002, 2010.